

Valorisation des travaux de thèse

Publications

Terme M., Dorvillius M., Cochonneau D., Chaumette T., Xiao W., Diccianni M.B., Barbet J., Yu A.L., Paris F., Sorkin L.S., Birklé S. "Chimeric antibody to O-acetyl-GD2 mediates the same efficient anti-neuroblastoma effects as therapeutic ch14.18 antibody to GD2 without antibody induced allodynia". (2014). *PLoS One*. 9(2):e87210.

Cochonneau, D., **Terme M.**, Michaud A., Dorvillius M., Gautier N., Frikeche J., Alvarez-Rueda N., Bougras G., Aubry J., Paris F., Birklé S. "Cell cycle arrest and apoptosis induced by O-acetyl-GD2-specific monoclonal antibody 8B6 inhibits tumor growth in vitro and in vivo". (2013). *Cancer Lett*. 333:194-204.

Brevets

Terme M., Dorvillius M., Cochonneau D., Birklé S., Le Doussal J.M. Dépositant : Atlab Pharma/Université de Nantes. "Targeting O-acetylated GD2 ganglioside as a new therapeutic and diagnostic strategy for cancer stem cells cancer". 29 avril 2013. EP13002268.

Terme M., Dorvillius M., Birklé S., Le Doussal J.M. Dépositant : Atlab Pharma/Université de Nantes. "Antibody against GD2-O-acetylated ganglioside with pro-apoptotic activity". 10 novembre 2013. EP13005298.

Communications

Terme M., Dorvillius M., Cochonneau D., Paris F., Le Doussal J.M., Birklé S. "Le GD2 O-acétylé: une nouvelle cible pour l'immunothérapie du neuroblastome et des cancers à problématique cellules souches tumorales ". 8emes journées du Cancéropôle Grand-Ouest. 19-20 avril 2014, Les sables d'Olonne. (*communication orale*)

Terme M., Dorvillius M., Cochonneau D., Paris F., Yu A.L., Sorkin L., Birklé S., Le Doussal J.M. "Monoclonal antibody directed against O-acetylated GD2 ganglioside as a candidate for cancer stem cell therapy". Réunion GDR Anticorps et ciblage thérapeutique. 26 novembre 2013, Montpellier. (*communication orale*)

Terme M., Dorvillius M., Cochonneau D., Paris F., Yu A.L., Sorkin L., Birklé S., Le Doussal J.M. "Monoclonal antibody directed against O-acetylated GD2 ganglioside as a candidate for cancer stem cell therapy". European antibody congress. 10-12 novembre 2013, Genève. (*communication affichée*)

Introduction générale

L'immunothérapie par administration d'anticorps monoclonaux s'est aujourd'hui imposée comme une nouvelle stratégie de traitement contre le cancer en complément de la chirurgie, de la chimiothérapie et de la radiothérapie. L'efficacité thérapeutique et la toxicité des anticorps dépendent de l'antigène ciblé, des caractéristiques intrinsèques de l'anticorps utilisé et agents potentiels couplés à cette molécule (radionucléides, toxines). Actuellement, plus de trente anticorps thérapeutiques commerciaux ont obtenu une autorisation de mise sur la marché et plus de trois cent sont en phase de développement clinique (Reichert, 2014a). Les mécanismes d'action cytotoxique de ces anticorps ont été largement documentés qu'ils agissent principalement en activant la réponse immunitaire de l'hôte ou par une action directe sur la signalisation cellulaire, ils n'en restent pas moins efficace dans la lutte anti-tumorale.

De nombreuses cibles tumorales, dont le ganglioside GD2, ont été considérées pour l'immunothérapie. Les gangliosides sont des glycosphingolipides acides composés d'une région hydrophile oligosaccharidiques associée à une partie hydrophobe constituée par un céramide de longueur variable (Svennerholm, 1964). Les gangliosides peuvent comporter un ou plusieurs acides sialiques qui peuvent être *O*-acétylés et sont retrouvés dans tous les types cellulaires, mais leur concentration et leur répartition varient selon les tissus de l'organisme. Il est donc possible de définir, pour chaque type cellulaire, un profil gangliosidique caractéristique qui peut être modifié durant l'embryogénèse, ou la transformation tumorale; Ainsi, le disialoganglioside GD2 est reconnu comme un marqueur des tumeurs d'origine neuroectodermique, principalement le neuroblastome et le mélanome (Cheresh et al., 1986a; Schulz et al., 1984).

Deux anticorps anti-GD2 ont été évalués aux Etats-Unis dans des études cliniques (Yu et al., 2010). Cependant, l'utilisation chez le patient se heurte à des problèmes de neurotoxicité liés à la présence du GD2 à la surface des fibres sensibles des nerfs périphériques (Yuki et al., 1997). Cette observation limite la dose maximale injectée d'anticorps anti-GD2 aux patients et par là leur efficacité clinique.

Par le passé, un AcM spécifique du dérivé *O*-acétylé du GD2 a été obtenu au laboratoire (Cerato et al., 1997). Une première étude montre que cet AcM ne présente pas de réactivité croisée vis à vis des nerfs périphériques (Alvarez-Rueda et al., 2011). Ces résultats suggèrent que les anticorps spécifiques du GD2 *O*-acétylé seraient mieux tolérés chez les patients et présentent ainsi une alternative aux anticorps thérapeutiques neurotoxiques. La poursuite du développement de cet AcM a motivé la création de l'entreprise Atlab Pharma. Atlab Pharma (Nantes) est une jeune société innovante en biotechnologie qui a pour vocation le développement d'anticorps thérapeutiques notamment pour l'immuno-radiothérapie.

SOMMAIRE

| | |
|--|-----------|
| SOMMAIRE | 3 |
| LISTE DES ILLUSTRATIONS | 5 |
| LISTE DES ABREVIATIONS | 6 |
| PARTIE I | 8 |
| INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE | 8 |
| I- PROPRIETES DES GANGLIOSIDES | 9 |
| I.A. STRUCTURE DES GANGLIOSIDES | 10 |
| I.A.1. Structure du céramide | 10 |
| I.A.2. Structure de l'oligosaccharide | 11 |
| I.B. NOMENCLATURE DES GANGLIOSIDES | 13 |
| I.C. METABOLISME DES GANGLIOSIDES | 15 |
| I.C.1. Biosynthèse | 15 |
| I.C.1.a. Synthèse du céramide | 15 |
| I.C.1.b. Glycosylation du céramide | 15 |
| I.C.1.c. O-acétylation des gangliosides | 18 |
| I.C.2. Catabolisme | 20 |
| I.C.3. Régulation du métabolisme des gangliosides | 22 |
| I.D. DISTRIBUTION DES GANGLIOSIDES | 25 |
| I.D.1. Les gangliosides tissulaires | 25 |
| I.D.2. Les gangliosides tumoraux | 26 |
| I.D.3. Les gangliosides exosomaux et sériques | 26 |
| I.D.4. Localisation cellulaire | 27 |
| I.D.5. Les gangliosides en tant que marqueur des cellules souches | 28 |
| I.E. ISOLATION ET PURIFICATION DES GANGLIOSIDES | 30 |
| I.F. PROPRIETES BIOLOGIQUES DES GANGLIOSIDES | 31 |
| I.F.1. Gangliosides et interactions cellules-pathogènes | 32 |
| I.F.2. Implication des gangliosides dans les interactions cellules-matrice extracellulaire | 32 |
| I.F.3. Fonctions immunorégulatrices des gangliosides | 33 |
| I.F.4. Gangliosides et modulation des signaux transmembranaires | 33 |
| I.F.5. Propriétés biologiques des gangliosides tumoraux | 34 |
| I.F.6. Propriétés biologiques des gangliosides exprimés par les cellules souches tumorales | 40 |
| I.F.7. Propriétés biologiques des gangliosides O-acétylés | 40 |
| II. IMMUNOCIBLAGE THERAPEUTIQUE DU MARQUEUR GANGLIOSIDIQUE TUMORAL GD2 | 42 |
| II.A. INDICATIONS DES ANTICORPS THERAPEUTIQUES ANTI-GD2 | 44 |
| II.B. PROPRIETES DES ANTICORPS THERAPEUTIQUES | 47 |
| II.B.1. Mécanismes anti-tumoraux des anticorps thérapeutiques | 47 |
| II.B.1.a. Mécanismes anti-tumoraux indépendants du système immunitaire | 48 |
| II.B.1.b. Mécanismes anti-tumoraux dépendants du système immunitaire | 49 |
| II.B.1.c. Les anticorps renforçant l'activité immunitaire anti-tumorale | 52 |
| II.C. ANTICORPS MONOCLONAUX DE SOURIS DIRIGES CONTRE LE GD2 | 53 |
| II.C.1. Obtention d'anticorps ciblant les gangliosides | 53 |
| II.C.2. L'anticorps de souris 3F8 | 55 |
| II.C.3. Les anticorps monoclonaux de souris 14.18 et 14G2a | 57 |
| II.C.4. Autres anticorps monoclonaux de souris anti-GD2 | 58 |
| II.D. ANTICORPS ANTI-GD2 HUMANISES | 60 |
| II.D.1. L'anticorps humanisé 3F8 | 62 |
| II.D.2. L'anticorps chimérique ch14.18 | 63 |

| | |
|--|------------|
| II.D.3. L'anticorps humanisé hu14.18K322A | 65 |
| II.E. LES ANTICORPS MONOCLONAUX CONJUGUES CIBLANT LE GD2 | 67 |
| II.E.1. Les anticorps monoclonaux anti-GD2 radioconjugués | 68 |
| II.E.2. L'anticorps de souris 14G2a immunoconjugué | 68 |
| II.E.3. Immunocytokine ch14.18-IL2 | 69 |
| II.E.4. Immunocytokine hu14.18-IL2 | 69 |
| II.F. AUTRES STRATEGIES D'IMMUNOTHERAPIE CIBLANT LE GD2 | 71 |
| II.F.1. Les anticorps bispécifiques | 71 |
| II.F.2. La Technologie Triomab® | 72 |
| II.F.3. Chimeric Antigen Receptor anti-GD2 | 73 |
| II.F.4. Vaccination anti-idiotype | 75 |
| PARTIE II | 79 |
| TRAVAUX EXPERIMENTAUX | 79 |
| INTRODUCTION | 80 |
| CHAPITRE I | 81 |
| PROPRIETES APOPTOTIQUES DES ANTICORPS MONOCLONAUX CIBLANT LE MARQUEUR | |
| GANGLIOSIDIQUE TUMORAL GD2 O-ACETYLE | 81 |
| Article 1 : Cell cycle arrest and apoptosis induced by O-acetyl-GD2-specific monoclonal | |
| antibody 8B6 inhibits tumor growth in vitro and in vivo | 82 |
| CHAPITRE II | 94 |
| CARACTERISATION DES PROPRIETES ANTI-TUMORALES DE L'ANTICORPS CHIMERIQUE HOMME- | |
| SOURIS C.8B6 SPECIFIQUE DU MARQUEUR GANGLIOSIDIQUE TUMORALE GD2 O-ACETYLE | 94 |
| Article 2 : Chimeric antibody c.8B6 to O-Acetyl-GD2 mediates the same efficient anti- | |
| neuroblastoma effects as therapeutic ch14.18 antibody to GD2 without antibody induced | |
| allodynia. | 95 |
| CHAPITRE III | 108 |
| OBTENTION D'ANTICORPS CHIMERIQUES SPECIFIQUES DU GD2 O-ACETYLE PRESENTANT UNE | |
| ACTIVITE APOPTOTIQUE | 108 |
| Introduction | 109 |
| Matériels et Méthodes | 110 |
| Résultats et discussion | 111 |
| Conclusion | 119 |
| CHAPITRE IV | 120 |
| NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES POUR LES ANTICORPS CIBLANT LE MARQUEUR TUMORAL | |
| GD2 O-ACETYLE | 120 |
| Introduction | 121 |
| Matériels et Méthodes | 122 |
| Résultats | 123 |
| A. Immunociblage des cellules souches tumorales par des AcM anti-GD2-Oac dans le cancer du sein | 123 |
| B. Activité anti-tumorale des anticorps ciblant le GD2-Oac dans le cancer du poumon à petites cellules | 125 |
| Discussion | 126 |
| DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES | 129 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 136 |

Liste des illustrations

Figures:

| | |
|--|-----------|
| <i>Figure 1 : Formule semi-développée de la sphingosine (C18:1).....</i> | <i>10</i> |
| <i>Figure 2 : Représentation schématique de la biosynthèse du céramide.</i> | <i>16</i> |
| <i>Figure 3 : Représentation schématique de la biosynthèse des gangliosides.</i> | <i>17</i> |
| <i>Figure 4 : Représentation schématique de la dégradation des gangliosides.....</i> | <i>21</i> |
| <i>Figure 5 : Représentation schématique du métabolisme des gangliosides.....</i> | <i>22</i> |
| <i>Figure 6 : Signalisation associée à la surexpression de la GD3 synthétase dans le mélanome.....</i> | <i>35</i> |
| <i>Figure 7 : Signalisation associée à la surexpression de la GD3 synthétase dans le cancer du sein.....</i> | <i>36</i> |
| <i>Figure 8 : Signalisation associée aux gangliosides GD3 et GD2 dans l'ostéosarcome.</i> | <i>37</i> |
| <i>Figure 9 : Signalisation apoptotique associée au GD2 dans le cancer du poumon à petites cellules</i> | <i>38</i> |
| <i>Figure 10 : Médiation de l'apoptose par le GD3</i> | <i>39</i> |
| <i>Figure 11: Structure schématique d'une immunoglobuline G.</i> | <i>48</i> |
| <i>Figure 12 : Les anticorps de souris, chimérique, humanisé et humain</i> | <i>61</i> |
| <i>Figure 13 : Mécanisme d'action proposé pour les Triomab.....</i> | <i>72</i> |

Tableaux:

| | |
|---|-----------|
| <i>Tableau 1 : Core des différentes séries de glycosphingolipides.</i> | <i>11</i> |
| <i>Tableau 2 : Nomenclature des principaux gangliosides.</i> | <i>14</i> |
| <i>Tableau 3 : Classification du neuroblastome selon l'INSS.</i> | <i>46</i> |
| <i>Tableau 4 : Classification du neuroblastome selon le COG.....</i> | <i>46</i> |
| <i>Tableau 5: Fonctions et expressions des récepteurs aux IgG humaines.</i> | <i>51</i> |
| <i>Tableau 6: Propriétés pharmacologiques des anticorps monoclonaux humains chez l'homme.</i> | <i>61</i> |
| <i>Tableau 7 : Principaux essais cliniques réalisés avec les anticorps monoclonaux ciblant le GD2.</i> | <i>76</i> |

Liste des abréviations

| | |
|---------------|--|
| AcM | Anticorps monoclonal |
| ADC | <i>Antibody Drug Conjugate</i> |
| ADCC | <i>Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity</i> |
| ADCP | <i>Antibody Dependent Cellular Phagocytosis</i> |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| AMM | Autorisation de mise sur le marché |
| ARN | Acide ribonucléique |
| BiTE | <i>Bispecific T-cell Engaging</i> |
| CAR | <i>Chimeric Antigen Receptor</i> |
| CDC | <i>Complement Dependent Cytotoxicity</i> |
| CDCC | <i>Complement Dependent Cell Cytotoxicity</i> |
| CDR | <i>Complementarity determining region</i> |
| Cer | Céramide |
| CERT | <i>CERamide Transport protein</i> |
| CHO | <i>Chinese Hamster Ovary</i> |
| CMH | Complexe majeur d'histocompatibilité |
| COG | <i>The Children's Oncology Groups</i> |
| DMT | Dose maximale tolérée |
| EGFR | <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> |
| EMA | <i>European Medicines Agency</i> |
| ERK | <i>Extracellular signal-regulated kinases</i> |
| FAK | <i>Focal Adhesion Kinase</i> |
| Fc | Fragment cristalisable |
| Fc γ R | Fc- γ -Récepteur |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FGF | <i>Fibroblast Growth Factor</i> |
| FR | <i>Framework Region</i> |
| GalCer | Galactosylcéramide |
| GD2-Oac | GD2 O-acétylé |
| GlcCer | Glucosylcéramide |
| GM-CSF | Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor |
| GPI | Glycophosphatidylinositol |
| GSL | Glycosphingolipide |
| HACA | <i>Human Anti-Chimeric Antibodies</i> |
| HAMA | <i>Human Anti-Mouse Antibodies</i> |
| HAT | Hypoxanthine Aminoptérine Thymidine |
| HDL | <i>High-density lipoprotein</i> |
| HER2 | <i>Human epidermal growth factor receptor 2</i> |
| HGFR | <i>Hepatocyte Growth Factor Receptor</i> |
| HGPRT | Hypoxanthine-Guanine PhosphoRibosyl Transférase |
| I-TLC | <i>Immuno-Thin Layer Chromatography</i> |
| ICK | Immunocytokine |

| | |
|---------|--|
| Ig | Immunoglobuline |
| IGFR | <i>Insulin Growth Factor Receptor</i> |
| IKL-Akt | <i>Integrin-Linked Kinase-Akt</i> |
| IL- | Interleukine |
| INF | Interferon |
| INSS | <i>International Neuroblastoma Staging System</i> |
| IT | Immunotoxines |
| LacCer | Lactosylcéramide |
| LDL | <i>Low Density Lipoprotein</i> |
| MAPK | <i>Mitogen-activated protein kinases</i> |
| MIBG | <i>Meta-iodo benzylguanine scanning</i> |
| MYCN | <i>V-myc myelocytomatosis viral related oncogene neuroblastoma derived</i> |
| Neu5Ac | <i>N-5-acétylneuraminique</i> |
| NK | <i>Natural Killer</i> |
| PBMC | <i>Peripheral blood mononuclear cell</i> |
| PDGFR | <i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor</i> |
| PDMP | 1-phényl-2-décanoylamino-3-morpholino-1-propanol |
| PI3K | <i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i> |
| PKA/C | Phosphokinases A/C |
| PPPP | 1-phényl-2-hexadécanoylamino-3-pyrrolidino-1-propanol |
| PSMA | <i>Prostate specific membrane antigen</i> |
| RIT | Radioimmunothérapie |
| SOAT | Sialate O-acétyl transférases |
| ST | Sialyltransférases |
| TNFR | <i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i> |
| TRAIL | <i>Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing</i> |
| VEGFR | <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i> |
| VLDL | <i>Very low density lipoprotein</i> |

Partie I

Introduction bibliographique

I- Propriétés des gangliosides

I.A. Structure des gangliosides

Les gangliosides représentent une famille importante des glycosphingolipides porteurs d'acide sialique. Les glycosphingolipides sont des lipides complexes qui représentent les composants principaux de la membrane plasmique chez les eucaryotes. Ces molécules amphiphiles sont présentes de façon ubiquitaire et leur structure est entièrement conservée entre les espèces. Les gangliosides sont ancrés au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique par un céramide sur lequel est greffé un oligosaccharide. Bien que ces structures soient simples, les gangliosides présentent une grande hétérogénéité de structure du céramide et de l'oligosaccharide.

I.A.1. Structure du céramide

Le céramide résulte de la combinaison entre un acide gras et une base sphingoïde. Les acides gras de longues chaînes carbonées, 16 à 24 carbones, peuvent être de surcroît saturés, mono-insaturé ou α -hydroxylé. L'acide gras le plus représenté dans les céramides chez l'homme est l'acide lignocérique C24:0 (c'est-à-dire 24 carbones et aucune insaturation). Ces acides gras sont reliés par une liaison amide à une base sphingoïde. A ce jour, plus de 60 bases sphingoïdes ont été caractérisées (Degroote et al., 2004). Ces bases sphingoïdes peuvent varier en longueur, en degré de saturation et en nombre d'hydroxylation. La sphingosine C18:1 (c'est à dire une chaîne de 18 carbones avec une insaturation) constitue la base la plus représentée chez l'homme avant ses dérivés shinganine et phytosphingosine (Figure 1). Les conséquences fonctionnelles de l'hétérogénéité structurale des céramides sont encore mal définies. Toutefois, il semblerait que la structure du céramide puisse influencer la localisation et les fonctions des glycosphingolipides au sein même de la membrane plasmique, notamment dans les interactions directes avec le cholestérol, les phospholipides et certains domaines transmembranaires des protéines.

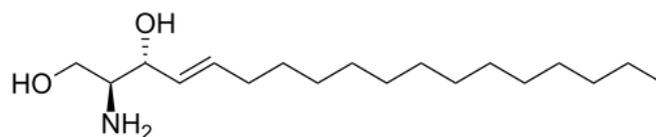


Figure 1 : Formule semi-développée de la sphingosine (C18:1).

I.A.2. Structure de l'oligosaccharide

La partie hydrophile des gangliosides est composée d'un oligosaccharide plus ou moins complexe qui participe à la formation du glycocalix de la cellule de la même façon que les chaînes glycaniques portées par les glycoprotéines et les protéoglycanes. Les hexoses principaux composants les gangliosides sont le glucose (Glc), le galactose (Gal) et la *N*-acétylgalactosamine (GalNAc). On trouve plus rarement le fucose et la *N*-acétylglucosamine. Dans certaines famille de glycosphingolipides ont trouve des acides sialiques comme le *N*-5-acétylneuraminique ou le *N*-5-glycosylneuraminique. Un sulfate peut également être ajouté. Actuellement plus de 300 structures d'oligosaccharides différentes ont été identifiées dans les gangliosides (Degroote et al., 2004). Ceci apporte une grande hétérogénéité de structure à ces molécules.

Les glycosphingolipides sont classées en trois séries lacto, globo et ganglio en fonction de la structure centrale de la chaîne oligosaccharidique, appelé core (Tableau 1).

Tableau 1 : Core des différentes séries de glycosphingolipides. Cer : céramide; Glc : glucose; Gal : Galactose; GalNAc : N-acétylgalactosamine.

| Série | Symbole | Structure |
|---------|---------|---|
| Lacto | Lc | Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1Cer |
| Globo | Gb | GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1Cer |
| Ganglio | Gg | Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1Cer |

De façon plus simple les glycosphingolipides peuvent être classés selon trois grandes catégories :

- les glycosphingolipides neutres dont l'oligosaccharide est constitué uniquement de monosaccharides neutres comme le glucosylcéramide (GlcCer).
- les sulfatides, glycosphingolipides contenant un sulfate, notamment le galactosylcéramide-sulfate (HOS₃-3GalCer) et le lactosylcéramide-sulfate (HOS₃-3LacCer).
- les glycosphingolipides acides ou gangliosides dont l'oligosaccharide contient un ou plusieurs acides sialiques.

Les gangliosides sont donc une famille particulière de glycosphingolipides chargés qui se distinguent par la présence d'acides sialiques au sein de l'oligosaccharide. Ils sont aussi appelés sialoglycosphingolipides.

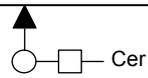
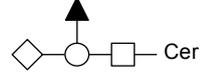
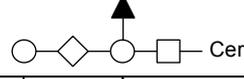
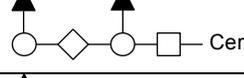
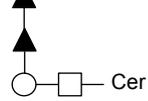
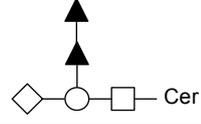
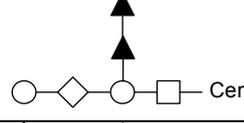
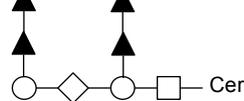
Les acides sialiques sont une famille diversifiée de glucides carboxylés à neuf atomes de carbones. Ils sont habituellement retrouvés comme monosaccharides terminaux des oligosaccharides animaux et sont fortement exprimés chez les mammifères. Le plus commun d'entre eux est l'acide *N*-acétylneuramidique (Neu5Ac). Il est en effet le précurseur de tous les autres acides sialiques. Les acides sialiques des gangliosides L sont principalement greffés sur les galactoses composants l'oligosaccharide. Il est possible que le galactose porte plusieurs acides sialiques greffés en série. La liaison entre le galactose et l'acide sialique quant à elle est une liaison de type $\alpha 2,3$. La liaison entre deux acides sialiques est quand à elle de type $\alpha 2,8$. Dans de plus rares cas, l'acide sialique peut être greffé sur la *N*-acétylgalactosamine par une liaison de type $\alpha 2,6$, c'est le cas par exemple du GD1 α . Ces acides sialiques possèdent des propriétés importantes dans la diversité des gangliosides. En effet, ils peuvent subir plusieurs modifications. Les modifications principalement décrites sont des *O*-acétylations et des *N*-acétylations. La structure de la liaison de l'acide sialique influence ces modifications. Ainsi, les *O*-acétylations sont portées principalement sur le carbone C9 et plus rarement C7 de l'acide sialique terminal greffé sur un autre acide sialique par une liaison de type $\alpha 2,8$. Par exemple, les acides sialiques *N*-acétyl-9- et *N*-acétyl-7-*O*-acétylé-neuramidiques ont été identifiés essentiellement comme constituants des gangliosides tumoraux GD3 et GD2, respectivement dans le mélanome et le neuroblastome (Cheresh et al., 1984a; Manzi et al., 1990). Les acides sialiques 8- et 4-*O*-acétylés sont pour leur part des constituants des glycoprotéines (Fukuda et al., 2005).

I.B. Nomenclature des gangliosides

Bien que les gangliosides présentent une hétérogénéité de structures au niveau des deux composants, le céramide et l'oligosaccharide, ils sont caractérisés et identifiés sur la base structurale de l'oligosaccharide. Ainsi, la nomenclature des gangliosides repose sur la séquence des différents éléments le long de la chaîne glucidique et sur le nombre d'acides sialiques.

La classification la plus ancienne est la classification de Svennerholm qui a été établie pour désigner les gangliosides du cerveau et se définit selon les règles suivantes (Svennerholm, 1964). Les gangliosides sont nommés par deux lettres et un chiffre. La première lettre 'G' correspond au ganglioside ; la deuxième lettre M, D, T ou Q selon qu'il existe un, deux, trois ou quatre résidus d'acide sialique dans l'oligosaccharide (GM pour monosialoganglioside, GD pour disialoganglioside, GT pour trisialoganglioside), le chiffre 4, 3, 2 ou 1 correspond initialement à l'ordre de migration des gangliosides en chromatographie sur couche mince. Par exemple, le GM1 présente le plus faible coefficient de migration des monosialogangliosides du cerveau. Cette nomenclature reste simple et pratique, et est la plus utilisée pour désigner les gangliosides les plus courants. Néanmoins, des gangliosides plus complexes ont été identifiés depuis la mise en place de cette classification. Aussi, une nouvelle nomenclature a été fondée sur la connaissance précise de la structure de l'oligosaccharide. Elle est par ailleurs recommandée par la commission internationale de nomenclature biochimique. Dans ce système, l'abréviation Cer pour céramide est précédée soit de l'abréviation Lac pour indiquer le lactose de la chaîne glucidique, ou si la chaîne est plus complexe, du mot ose indicé du nombre de résidus glucidiques présents et précédé des lettres Gg pour la série ganglio. La position de l'acide sialique substitué est indiquée par le chiffre romain et son point d'ancrage sur le carbone par un chiffre arabe (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Nomenclature des principaux gangliosides. Gg : gangliosides; Cer : céramide; Lac : lactose; Neu5Ac : acide N-acétylneuraminique; □ : Glucose; ○ : Galactose; ◇ : N-acétylgalactosamine; ▲ : acide N-acétylneuraminique.

| Nomenclature de Svennerholm | Nomenclature IUPAC-IUB | Structure |
|-----------------------------|---|---|
| GM3 | II ³ Neu5Ac-Lac-Cer |  |
| GM2 | II ³ Neu5Ac-GgOse ₃ -Cer |  |
| GM1 | II ³ Neu5Ac-GgOse ₄ -Cer |  |
| GD1a | IV ³ Neu5Ac,II ³ Neu5Ac-GgOse ₄ -Cer |  |
| GD3 | (II ³ Neu5Ac) ₂ -Lac-Cer |  |
| GD2 | (II ³ Neu5Ac) ₂ -GgOse ₃ -Cer |  |
| GD1b | (II ³ Neu5Ac) ₂ -GgOse ₄ -Cer |  |
| GQ1b | (IV ³ Neu5Ac) ₂ ,(II ³ Neu5Ac) ₂ -GgOse ₄ -Cer |  |

I.C. Métabolisme des gangliosides

I.C.1. Biosynthèse

I.C.1.a. Synthèse du céramide

La biosynthèse des gangliosides débute par la synthèse d'un céramide au niveau de la face cytosolique du réticulum endoplasmique. Les différentes étapes de la biosynthèse du céramide sont résumées dans la Figure 2.

La première étape de la synthèse du céramide consiste en la formation de la 3-déhydrosphinganine à partir de palmitoyl-CoA et de L-sérine. La sphinganine est quant à elle formée après réduction. Elle est ensuite acétylée par un acétyl-CoA d'un acide gras à longue chaîne pour former la *N*-acétylsphinganine ou dihydrocéramide.

Les modifications biochimiques observées lors de la transformation tumorale des cellules affectent la biosynthèse du céramide. Les modifications se manifestent aussi bien par des variations de longueur de chaîne ou du degré d'insaturation. Ainsi ces variations entraînent une hétérogénéité des glycolipides qui apparaissent homogènes du point de vue de l'oligosaccharide. Ce phénomène est mis en évidence par chromatographie sur couche mince (CCM) où les gangliosides migrent sous forme de doublet. La bande supérieure contient des molécules formées à partir d'acides gras à longue chaîne et la bande inférieure correspond à celles formées à partir d'acides gras plus courts.

I.C.1.b. Glycosylation du céramide

L'étape suivante de la synthèse des gangliosides consiste en la glycosylation du céramide. Cinq grandes familles d'enzymes contrôlent cette glycosylation : des glucosyltransférases, des galactosyltransférases, des *N*-acétylgalactosaminyltransférases, des *N*-acétylglucosaminyltransférases et des sialyltransférases (ST). Cette glycosylation consiste en une addition séquentielle de résidus monosaccharides et d'acides sialiques.

Le céramide précédemment formé est transporté vers l'appareil de Golgi, soit par voie vésiculaire (vers le *cis*-golgi), soit par un transport non vésiculaire impliquant la protéine CERT (*CERamide Transport protein*) (directement vers le *trans*-Golgi) (Figure 5) (Perry and Ridgway, 2005). Par l'action d'une UDP-glucose, le céramide est transformé en GlcCer qui est ensuite transloqué dans la lumière de l'appareil de Golgi. La lactocéramide synthétase permet

la glycosylation du GlcCer pour former le lactocéramide (LacCer ou Gal β 1-4Glc β 1Cer) motif précurseur des gangliosides. Notons le cas particulier du GM4, composé majeur de la myéline, qui est synthétisé à partir du GalCer et non du LacCer (Degroote et al., 2004; Ledeen et al., 1973).

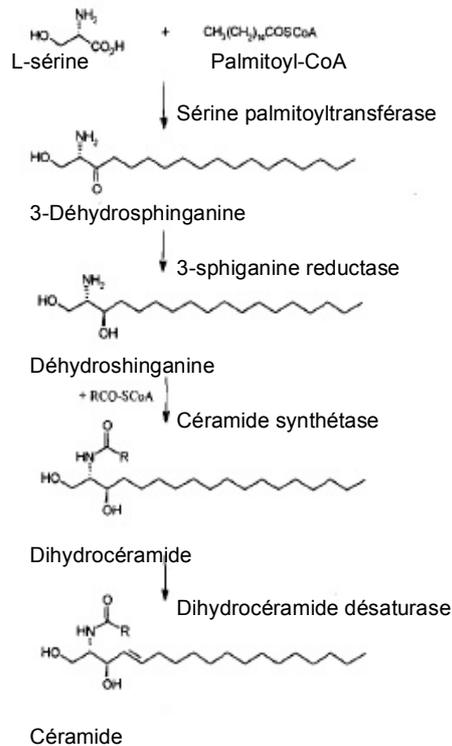


Figure 2 : Représentation schématique de la biosynthèse du céramide (adaptée de van Echten and Sandhoff, 1993).

Au niveau de l'appareil de Golgi différentes sialyltransférases catalysent la synthèse des dérivés du LacCer. Ainsi les ST3Gal V, ST8Sia I et ST8Sia V correspondent respectivement à la GM3 synthétase, GD3 synthétase et GT3 synthétase qui catalysent la synthèse du GM3, du GD3 et du GT3 (Figure 3). Par ailleurs, la plupart des enzymes impliquées dans la biosynthèse des gangliosides ne sont pas spécifiques de leurs substrats. Ainsi, le LacCer et ses trois dérivés gangliosidiques sont glycosylés au niveau du *trans*-golgi par l'action coordonnée et successive de diverses enzymes des *N*-acétylgalactosaminyltransférases (β 4GalNAc T1 nommé aussi GM2/GD2 synthétase), des galactosyltransférases (β 3Gal T4) et des sialyltransférases (ST3Gal I ou II et ST8Sia V) (Figure 3).

Ainsi le schéma actuellement proposé comporte quatre voies métaboliques nommées respectivement 0, a, b, et c. Les différents gangliosides synthétisés dans chacune des voies appartiennent respectivement au série-0, -a, -b, et -c (Figure 3).

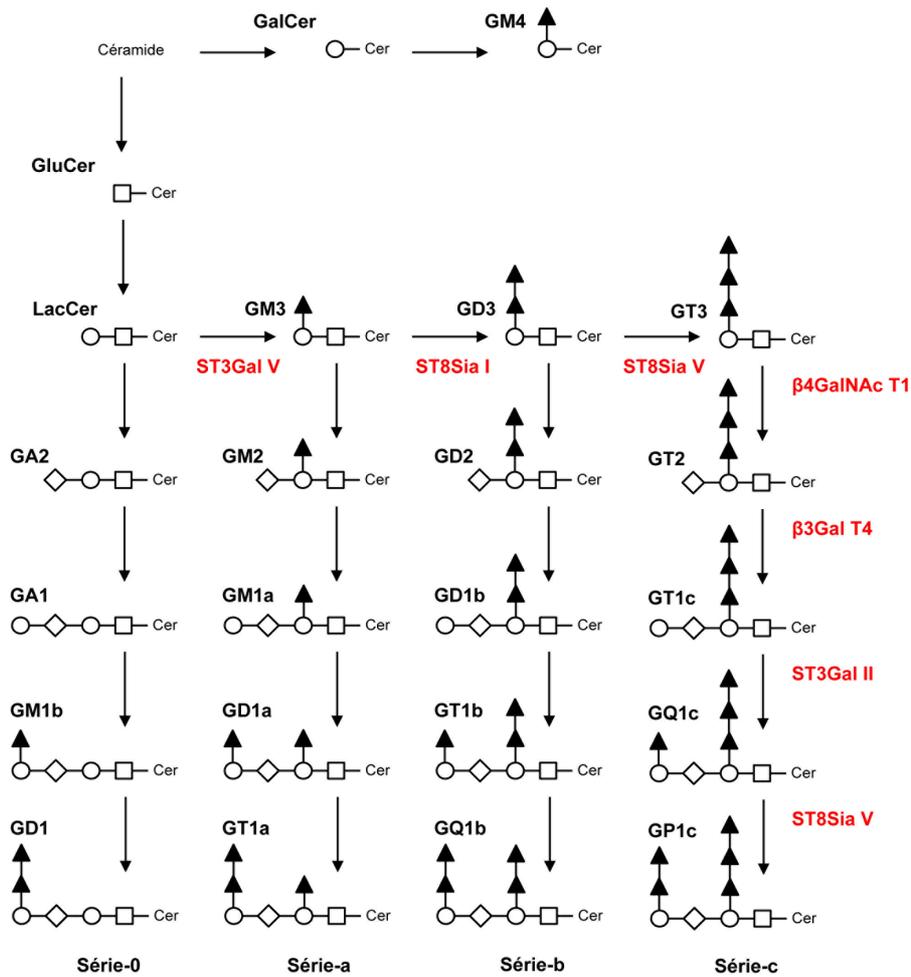


Figure 3 : Représentation schématique de la biosynthèse des gangliosides (adaptée de Liang et al., 2013). □ : Glucose; ○ : Galactose; ◇ : N-acétylgalactosamine; ▲ : acide N-acétylneuraminique. Autres nomenclatures des principales enzymes de la synthèse des gangliosides : ST3Gal V : GM3 synthétase; ST8Sia I : GD3 synthétase; ST8Sai V : GT3 synthétase; βGalNAc T1 : GM2/GD2 synthétase.

Les gangliosides ainsi formés sont transportés vers leur destination principale la membrane plasmique, en utilisant la voie des vésicules d'exocytose. Une fois à la membrane ces gangliosides peuvent être rapidement endocytés puis recyclés par divers mécanismes.

La biosynthèse des gangliosides peut également se dérouler au niveau de la membrane plasmique. L'expression et l'activité enzymatique de la GD3 synthétase ont été ainsi rapportées au niveau de la membrane plasmique des cellules épithéliales et des cellules tumorales de mélanome (Crespo et al., 2010). La sialylation du GM3 peut donc avoir lieu au niveau de la membrane plasmique à partir du précurseur CMP-Neu5Ac endogène.

C'est principalement le niveau d'activité de la GM3 synthétase et de la GD3 synthétase qui détermine la prédominance d'une série ou d'une autre. Par exemple, la transfection de la GD3 synthétase dans une lignée de cancer du sein conduit à l'accumulation de gangliosides appartenant à la série-b (le GD3, le GD2) voire de la série-c (GT3) (Cazet et al., 2009). Malgré cela, les mécanismes précis régissant la synthèse des gangliosides dans un type cellulaire donné demeurent encore imprécis. En effet, la purification de l'ensemble des enzymes impliquées dans la biosynthèse des gangliosides et la caractérisation de leurs activités ne suffit pas à expliquer l'expression spécifique des gangliosides (Degroote et al., 2004).

1.C.1.c. O-acétylation des gangliosides

Les acides sialiques terminaux des gangliosides liés par une liaison de type $\alpha 2,8$ à un autre acide sialique peuvent subir un phénomène d'*O*-acétylation. Cette étape constitue une phase tardive du développement des gangliosides (Higa et al., 1989; Sjoberg and Varki, 1993). Ce phénomène est retrouvé uniquement chez les vertébrés supérieurs. La distribution tissulaire des acides sialiques *O*-acétylés des gangliosides, ainsi que leur expression temporaire au cours du développement suggèrent que leur expression est placée sous un mécanisme de régulation très précis.

En outre, la position exacte de la fonction *O*-acétylée demeure toujours controversée et varie, selon les auteurs, entre les positions C9 et C7 (Kohla et al., 2002; Manzi et al., 1990; Sjoberg and Varki, 1993). En effet, l'ester *O*-acétylé sur le carbone 7 de l'acide sialique peut migrer spontanément dans des conditions physiologiques sur le carbone 9. Cette dernière forme serait la forme préférentiellement détectée car elle est la plus stable (Sjoberg and Varki, 1993). Ainsi, des dérivés 9-*O*-acétylés ont été décrits pour les gangliosides des séries-b et -c, et des formes 7-*O*-acétylées ont été retrouvées uniquement pour le GD3 et le GD2 (Kohla et al., 2002; Manzi et al., 1990; Sjoberg and Varki, 1993).

Les sialyltransférases ne pouvant utiliser les acides sialiques *O*-acétylés comme substrats, différents travaux ont cherché à caractériser une sialo-*O*-acétyltransférases (SOAT) spécifique des gangliosides. Cependant, la fonction *O*-acétylé pouvant migrer spontanément des positions C7 à C9, il n'est pas à exclure que plusieurs *O*-acétyltransférases interviennent dans ce processus.

L'*O*-acétylation du GD3 a été obtenue *in vitro* en présence d'appareil de Golgi purifié à partir de cellules de mélanomes (Cheresh et al., 1984b). Différentes observations mettent en évidence que cette réaction d'*O*-acétylation se déroule dans le *trans*-Golgi, en utilisant comme substrat l'acétyl-CoA. Cependant, jusqu'à présent aucune SOAT assurant spécifiquement l'*O*-acétylation des carbones en position 7 ou 9 de l'acide sialique terminal des gangliosides n'a pu être purifiée. Par conséquent, afin de caractériser cette enzyme, une autre approche utilisée avec succès pour la caractérisation de glycosyltransférases intervenant dans la synthèse des gangliosides a été utilisée. Il s'agit de détecter, par un anticorps ou une autre sonde, les produits de synthèse de l'enzyme suite à un clonage d'expression. Pour cela les cellules CHO et Cos ont été utilisées car elles ne présentent pas de gangliosides *O*-acétylés. De plus, leurs acides sialiques membranaires sont associés par des liaisons de type $\alpha 2,3$ (Shi et al., 1998). Ainsi, ces cellules sont dans un premier temps transfectées par les ADNc codant pour la sialyltransférase ST8Sia I permettant l'ajout d'un second acide sialique par une liaison de type $\alpha 2,8$. Cette seule transfection suffit à induire un processus de 9-*O*-acétylation dans les cellules CHO (Shi et al., 1998). Ces résultats suggèrent donc que les cellules CHO, contrairement aux cellules Cos, expriment des SOAT spécifiques. En utilisant les cellules Cos, différents groupes ont pu mettre en évidence des enzymes capables d'*O*-acétyler les acides sialiques des gangliosides. L'utilisation d'une librairie d'ADNc obtenue à partir de mélanome humain a permis d'isoler un ADNc codant pour une protéine de 47 kDa capable d'*O*-acétyler le GD3. Cette protéine, qui présente une homologie de séquence avec une glycoprotéine membranaire du globule graisseux du lait, est toutefois retrouvée dans des tissus ne présentant pas de ganglioside *O*-acétylé (Ogura et al., 1996). Une autre étude montre qu'une protéine de 61 kDa jouerait le rôle de transporteur d'acétyl-CoA (Kanamori et al., 1997). D'autre part, la présence de SOAT a été mise en évidence dans les glandes sous maxillaires de bovin et dans le colon humain (Shen et al., 2004; Vandamme-Feldhaus and Schauer, 1998). Cependant, ces SOAT n'ont pu être ni purifiées ni clonées. Plus récemment, d'autres protéines candidates ont été identifiées. La protéine Tis21 (ou BTG2), dont l'expression est décrite pour induire un effet anti-prolifératif, est capable d'induire l'*O*-acétylation du GD3 dans des lignées de mélanome et de neuroblastome d'origine humaine (Satake et al., 2003). Cependant ce rôle n'a pu être confirmé dans un modèle murin d'induction de l'expression de Tis21 (Furukawa et al., 2008). Ainsi, l'*O*-acétylation du GD3 ne serait pas directement induite par Tis21. De même, la protéine CASD1 est capable d'*O*-acétyler l'acide sialique terminal du GD3 (Arming et al., 2011). Cependant, l'expression de

cette protéine retrouvée lors de la différenciation et la maturation des lymphocytes T et B, ne permet pas de conclure sur son rôle spécifique (Wipfler et al., 2011).

A ce jour, rien ne permet d'expliquer cette série d'échec, une *O*-acétyltransférase assurant spécifiquement l'*O*-acétylation des acides sialiques terminaux des gangliosides existe-t-elle? Son expression dans les bibliothèques d'ADNc est-elle trop faible? Où sa grande taille fait-elle qu'elle surpasse les limites d'insertion de ces bibliothèques?

I.C.2. Catabolisme

Avant d'être dégradés, les gangliosides intégrés à la membrane plasmique sont tout d'abord internalisés par un mécanisme d'endocytose. Ils sont acheminés aux endosomes par des vésicules recouvertes de cavéoline ou de clathrine. La nature de la vésicule semble dépendre de la fonction et des contraintes (association à un ligand) subies par le ganglioside particulier (Daniotti and Iglesias-Bartolomé, 2011). A ce stade, la majeure partie des gangliosides est acheminée vers les lysosomes, lieu principal de leur dégradation. Les gangliosides internalisés peuvent également être redirigés vers la membrane plasmique pour participer au renouvellement de celle-ci, ou vers l'appareil de Golgi où ils servent de substrat pour la synthèse de nouveaux avant d'être à nouveau acheminés vers la membrane plasmique (Figure 5) (Tettamanti, 2004).

La dégradation des gangliosides est, tout comme leur biosynthèse, un processus séquentiel. Cela débute par le retrait de résidus monosaccharides en position non réductrice par des exoglycosidases (Figure 4). L'action de ces hydrolases est facilitée pour les gangliosides à chaîne glucidique courte (moins de 4 résidus) par la présence de co-facteurs protéiques appelés SPA (*Sphingolipid Activator Proteins*). Le *GM2-Activator Protein* se lie avec une forte affinité au GM2, au GM1 et à l'asialo-GM2 inséré au niveau de la membrane des vésicules lysosomales, et les extraites facilitant ainsi l'action des hydrolases. La protéine Saposine-C (Sap-C) se lie avec la GlcCer- β -glucosidase et le GlcCer permettant ainsi la dégradation de ce dernier (Sandhoff and Kolter, 2003).

Les sialidases (ou neuramidases) hydrolysent les acides sialiques terminaux des gangliosides. Les Neu-1 lysosomale, Neu-2 cytosolique et Neu-4 lysosomale et réticulaire peuvent également hydrolyser les acides sialiques des glycoprotéines et des oligosaccharides libres. Seule la Neu-3 exprimée au niveau de la membrane plasmique est décrite comme étant spécifique des gangliosides. Celle-ci joue un rôle important dans la signalisation cellulaire,

notamment dans les phénomènes d'interactions cellule-cellule, cellule-matrice et dans la régulation de l'apoptose, en contrôlant le taux des gangliosides au niveau de la membrane plasmique (Kakugawa et al., 2002; Miyagi et al., 2008; Tettamanti, 2004).

Enfin, la liaison entre l'acide gras et la base sphingoïde est hydrolysée par la céramidase acide en présence de Saposine-D (Sandhoff and Kolter, 2003).

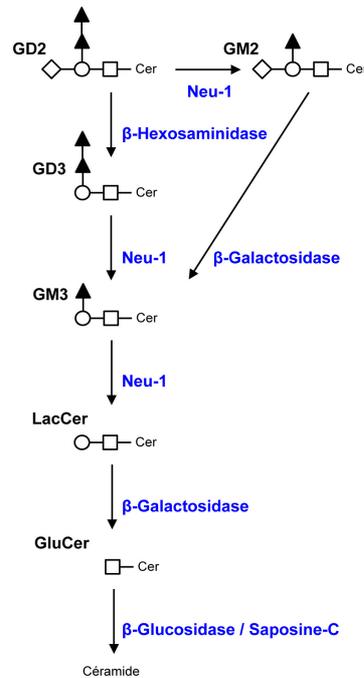


Figure 4 : Représentation schématique de la dégradation des gangliosides (adaptée de Tettamanti, 2004) □ : Glucose; ○ : Galactose; ◇ : N-acétylgalactosamine; ▲ : acide N-acétylneuraminique.

Une autre voie alternative pour dégradation des gangliosides est également identifiée. Elle s'effectue par l'action d'une endoglycocéramidase (ou céramide glycanase) qui hydrolyse la liaison entre le glucose et le céramide, délivrant ainsi deux produits : le céramide et l'oligosaccharide. Cependant si l'activité de cette enzyme est très bien caractérisée chez les bactéries et les invertébrés, celle-ci est encore controversée chez les mammifères (Tettamanti, 2004).

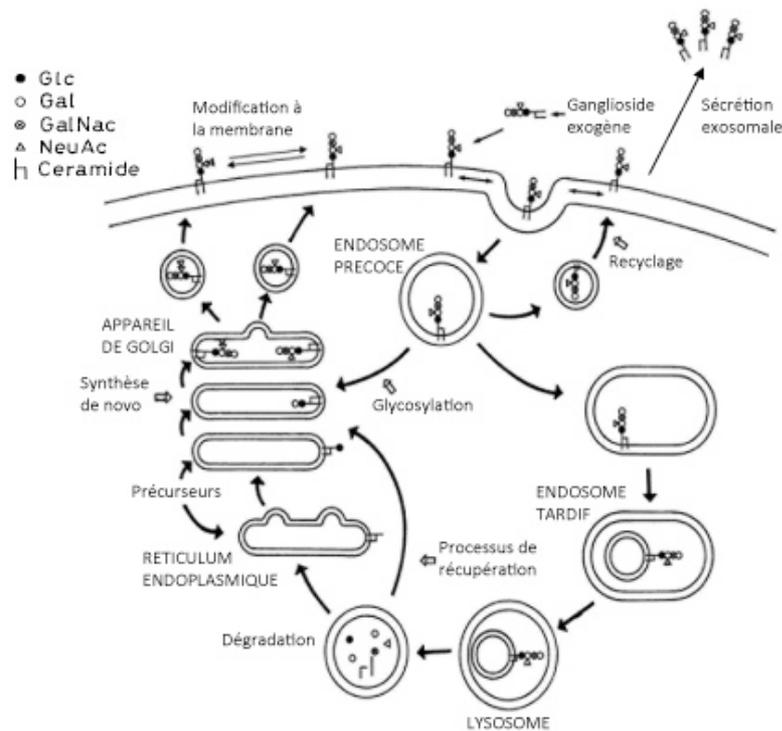


Figure 5 : Représentation schématique du métabolisme des gangliosides (adaptée de Tettamanti et al. 2004). La néosynthèse des gangliosides se déroule le long du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. Les gangliosides exprimés à la surface cellulaire sont internalisés et peuvent être dégradés par les lysosomes ou rapidement réutilisés pour la synthèse *de novo*. Cette dernière a lieu au niveau de l'appareil de Golgi et peut également utiliser des fragments de gangliosides dégradés dans les lysosomes. Après internalisation, les gangliosides peuvent être recyclés à la surface sans subir de modification.

I.C.3. Régulation du métabolisme des gangliosides

L'équilibre entre biosynthèse et catabolisme des gangliosides est finement régulé par un ensemble de phénomènes allant de la disponibilité des substrats à la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des enzymes impliquées dans leur métabolisme (Daniotti and Iglesias-Bartolomé, 2011). Des changements majeurs concernant l'expression des glycosyltransférases ont été décrits au cours du développement de l'embryon et dans des situations pathologiques comme le cancer. Ainsi, la GD3 synthétase est fortement exprimée lors des premiers jours du développement embryonnaire chez la souris alors que la GM2/GD2 synthétase semble être exprimée plus tardivement (Furukawa et al., 2002; Ngamukote et al., 2007). D'autre part, un déséquilibre des processus du métabolisme des gangliosides déclenche différentes pathologies. Par exemple, la maladie de Sandhoff, liée à une anomalie sur des

hexosamidases A et B, entraîne une accumulation lysosomale de gangliosides, notamment le GM2, au niveau des neurones et des tissus périphériques et se traduit par des troubles neurologiques (Xu et al., 2010).

Ces observations sont à l'origine de nombreux travaux mettant en évidence plusieurs mécanismes de régulation dont les trois principaux sont présentés ci-dessous :

1 -Une localisation intracellulaire des substrats et des enzymes.

La régulation du métabolisme des gangliosides dépend directement du taux d'expression, des paramètres cinétiques (K_m), de la spécificité d'action, de l'organisation supramoléculaire, voire de la localisation dans l'appareil de Golgi des différentes glycosyltransférases impliquées. Comme décrit précédemment (Figure 3), une même glycosyltransférase peut agir sur différents substrats gangliosidiques. De même, le profil gangliosidique d'une cellule ou d'un tissu dépend de la disponibilité même des substrats. Différents groupes ont montré que l'expression de ces gangliosides peut être tissu-spécifique. Par exemple, la transfection de la GD3 synthétase dans des lignées de cancer du sein induit une accumulation de GD3, GD2 et GT3 (Cazet et al., 2009), alors que dans des lignées neuronales, elle entraîne l'accumulation de GD1b et GT1b (Kawai et al., 1998).

L'influence de localisation des glycosyltransférases au sein de l'appareil de Golgi sur la composition en ganglioside de la cellule a fait également l'objet de plusieurs travaux. Cependant, aucune étude ne permet actuellement de relier la composition gangliosidique cellulaire à la localisation cellulaire de ces enzymes. Néanmoins, ces études ont pu mettre en évidence l'existence de complexes multienzymatiques (Girauda and Maccioni, 2003; Girauda et al., 2001). L'un des complexes identifié est constitué de la lactosyl synthétase (GalT I) et de la GM3 synthétase qui agissent successivement sur le GlcCer pour former le GM3 (Figure 3). La localisation cellulaire de ce complexe est affectée par la GD3 synthétase. En effet, cette enzyme lorsqu'elle est exprimée s'associe au complexe lactosyl/GM3 synthétases. Ce complexe nouvellement formé se déplace dans les régions distales de l'appareil de Golgi. Cette différence influe sur la biosynthèse des gangliosides. Ce complexe trimérique serait préférentiellement dédié à la formation du GD3 et des gangliosides complexes, alors que le dimère formerait le GM3 (Girauda et al., 2001).

2 - Des régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles

La principale régulation de l'activité des glycosyltransférases s'effectue au niveau transcriptionnel (Nairn et al., 2008). Différentes études ont mis en évidence une expression tissulaire spécifique des ARNm de ces enzymes. Par exemple, les ARNm issus du gène codant pour la GM3 synthétase sont retrouvés de manière abondante au niveau du cerveau humain (Ishii et al., 1998). De plus, une expression spatio-temporelle a pu être mise en évidence, notamment pour la GM2/GD2 synthétase. Celle-ci est exprimée tardivement lors du développement embryonnaire du tissu nerveux et diminue de manière graduelle après la naissance (Yamamoto et al., 1996).

D'autre part, différents travaux ont démontré l'existence d'une régulation post-transcriptionnelle de ces enzymes, notamment par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation et de *N*-glycosylation. Par exemple, il a été montré *in vitro* que l'activité de la GM2/GD2 synthétase est augmentée dans des cellules de neuroblastome suite à l'activation des phosphokinases A et C (PKA, PKC) alors que l'activité des sialyltransférases ST3Gal I et II est diminuée (Yu and Bieberich, 2001).

3 - Un rétrocontrôle de synthèse

Un rétrocontrôle négatif de la biosynthèse des gangliosides par les produits finaux de la réaction a pu être mis en évidence également *in vitro*. Par exemple, l'activité de la GD3 synthétase est inhibée par le GQ1b, le GT1b et le GD1a. De même, l'activité de la GM2/GD2 synthétase est inhibée par le GD1a ainsi que par le précurseur du GM3 (Yusuf et al., 1987).

I.D. Distribution des gangliosides

I.D.1. Les gangliosides tissulaires

Les gangliosides sont largement exprimés dans les tissus des mammifères. Ils sont exprimés selon un profil spécifique, en fonction de l'espèce, de l'organe ou du tissu considéré ainsi que du stade de développement de l'organe ou de la cellule. Il est donc possible de définir pour chaque type cellulaire un profil gangliosidique caractéristique qui est modifié durant l'embryogénèse, l'ontogénèse et la transformation tumorale. En particulier, les gangliosides *O*-acétylés sont souvent retrouvés dans les tissus en croissance, notamment d'origine neuroectodermique (Ye and Cheung, 1992). La concentration la plus importante de ganglioside est mesurée dans le système nerveux central des mammifères, particulièrement au niveau du cortex cérébral (Ledeen and Yu, 1982). Les quatre gangliosides majoritaires du cerveau sont le GM1, le GD1a, le GD1b et le GT1b (Figure 3). Une distribution spécifique des gangliosides a pu être observée en fonction des différentes régions fonctionnelles du cerveau (Kotani et al., 1993; Satoh and Kim, 1995; Satoh et al., 1996). Ces observations suggèrent que ces molécules seraient impliquées dans la transmission de l'influx nerveux. Par ailleurs, les gangliosides simples comme le GM3 et le GD3 sont retrouvés dans l'ensemble des tissus de l'organisme (Yamashita et al., 2005).

D'autre part, la teneur en acide sialique lié aux gangliosides dans le cerveau des poissons est supérieure à celle observée chez les mammifères. De plus, on dénombre une majorité de gangliosides complexes appartenant à la série-c (Figure 3), contenant trois acides sialiques. De même, une forte proportion de gangliosides *O*-acétylés y est également retrouvée (Avrova et al., 1986).

Les gangliosides *O*-acétylés, dont la caractéristique physico-chimique principale est d'être alcali-labile, sont de connaissance récente. En effet, dans les méthodes anciennes d'extraction et de purification des gangliosides, la saponification, préconisée pour éliminer les lipides acides contaminants, détruisait les esters *O*-acétylés. De plus, l'obtention de plusieurs AcM anti-gangliosides a permis de caractériser différentes formes de gangliosides *O*-acétylés (Cerato et al., 1997; Cheresch et al., 1984b). La plupart des gangliosides *O*-acétylés ont une distribution tissulaire spécifique qui est contrôlée en fonction du stade de développement. Ainsi, le GD3-Oac et GT3-Oac sont retrouvés majoritairement dans le cerveau embryonnaire chez le rat (Hirabayashi et al., 1989) alors que les gangliosides GT1b-Oac et GQ1b-Oac sont

retrouvés jusqu'à l'âge adulte (Sonnino et al., 1983). De faibles concentrations de GD3-Oac sont retrouvées ensuite à l'âge adulte dans les tissus en croissance et la rétine. Ainsi, ce ganglioside est exprimé de façon plus abondante dans les tissus cérébraux en régénération et durant la croissance axonale (Ribeiro-Resende et al., 2007). Il a également été décrit dans les lymphocytes T et B comme marqueur de leur activation (Erdmann et al., 2006).

I.D.2. Les gangliosides tumoraux

Alors que l'expression des gangliosides complexes est très limitée dans les tissus sains adultes, une augmentation de leur expression est retrouvée dans différents cancers (Yanagisawa, 2011a). Ainsi, les gangliosides GD2 et GD3 ont été identifiés comme antigènes associés aux tumeurs dans les cancers d'origine neuroectodermique, l'ostéosarcome, les tumeurs cérébrales et le cancer du sein (Cheresh et al., 1986a; Furukawa et al., 2006; Longee et al., 1991; Roth et al., 2014; Schulz et al., 1984). Le GD2 est retrouvé en grande quantité à la surface de ces cellules tumorales et est exprimé dans le reste de l'organisme à l'état de trace, principalement dans les neurones, les mélanocytes et les fibres nerveuses périphériques.

Par ailleurs, l'addition d'un groupement *O*-acétylé sur l'acide sialique terminal initialement décrit au cours du développement embryonnaire, réapparaît au cours du processus de cancérisation sous forme de marqueurs onco-foetaux. Ainsi, le GD3-Oac, décrit durant le développement embryonnaire du cerveau, est retrouvé dans les leucémies aiguës ainsi que dans 50% des cancers du sein d'origine canalaire (Marquina et al., 1996; Merritt et al., 1988; Parameswaran et al., 2013). D'autres gangliosides *O*-acétylés sont également exprimés par les cellules tumorales. C'est notamment le cas du GD2-Oac exprimé dans le mélanome, le neuroblastome et les tumeurs cérébrales (Cheresh et al., 1986b).

I.D.3. Les gangliosides exosomaux et sériques

Les gangliosides peuvent également participer à la communication entre les cellules par voie exosomale. Les exosomes sont de petites vésicules membranaires de diamètre inférieur à 100 nm provenant de corps multi-vésiculaires formés dans les endosomes et qui vont être libérées par exocytose dans l'espace extracellulaire (Marimpietri et al., 2013). Les exosomes sont sécrétés par de nombreux types cellulaires et se retrouvent dans les différents fluides comme le plasma, les urines ou le liquide céphalorachidien. Ils sont également sécrétés dans

le surnageant de culture. Les gangliosides sont des constituants de ces exosomes. Une fois libérés dans le milieu extracellulaire, les gangliosides exosomaux peuvent s'intégrer dans la membrane plasmique des différentes cellules présentes dans le micro-environnement cellulaire comme les cellules endothéliales, les fibroblastes, ou encore, les cellules immunitaires. Ce phénomène modifie par conséquent la composition gangliosidique au sein des radeaux lipidiques de ces cellules du micro-environnement. Il n'est donc pas rare d'observer lors d'expérience d'immunohistochimie un marquage des cellules endothéliales associées au micro-environnement tumoral. Par ailleurs, plusieurs études suggèrent un rôle immunorégulateur des gangliosides exosomaux d'origine tumorale, en inhibant l'activité des lymphocytes (Ladisch et al., 1983; Lee et al., 2012; Li et al., 1996) ainsi qu'un rôle positif sur la croissance tumorale (Ladisch et al., 1987).

Dans le plasma, les gangliosides s'associent aux différentes lipoprotéines qui assurent leur transport au sein de l'organisme. Ainsi, le GM3 fut le premier ganglioside isolé à partir du sérum (Tao et al., 1973). Les gangliosides tumoraux comme le GD3 et le GD2 ont pu être isolés dans le sérum des patients (Schulz et al., 1984; Senn et al., 1989). Les gangliosides identifiés dans les sérums d'individus sains sont transportés dans le sérum par des lipoprotéines, principalement par les LDL (66%), les HDL (25%) et les VLDL (7%) (Senn et al., 1989). Dans cette étude, il a été mesuré en moyenne $10,5 \pm 3,2$ nmol/ml de gangliosides dans les sérums. Ce taux est constant en fonction de l'âge et du sexe. Le GD2 a pu être détecté de façon importante dans des sérums de patients atteints de neuroblastome (Schulz et al., 1984).

I.D.4. Localisation cellulaire

Au niveau cellulaire, les gangliosides sont localisés majoritairement dans des domaines particuliers au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique (Degroote et al., 2004). Ces domaines, appelés radeaux lipidiques, se caractérisent par une teneur élevée en cholestérol, en glycosphingolipides ainsi qu'en protéines impliquées dans la signalisation cellulaire comme des récepteurs de facteurs de croissance. De par leur structure amphiphile, les gangliosides participent aux propriétés physico-chimiques de ces microdomaines. Le céramide interagit avec les autres constituants lipidiques constituant ces domaines alors que l'oligosaccharide peut s'associer aux protéines. Ces radeaux lipidiques sont impliqués dans

l'adhésion et la motilité cellulaire. On parle alors dans ce cas de "glycosynapse" en rapport à la synapse immunologique (Hakomori, 2002). Les gangliosides sont plus particulièrement concentrés dans ces synapses où ils interagissent directement avec les protéines impliquées dans ces phénomènes cellulaires comme les récepteurs à activité tyrosine kinase ou les intégrines (Aixinjueluo et al., 2005; Prinetti et al., 2009).

Dans le cadre de leur processus métabolique, les gangliosides sont retrouvés dans les vésicules d'endocytose et d'exocytose ainsi qu'au niveau des membranes des organelles : appareil de Golgi, endosomes, lysosomes et même au niveau de la membrane nucléaire (Hakomori, 2002). Lors de processus particuliers, comme l'activation des récepteurs de mort cellulaire Fas ou du TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptor*), le GD3 peut être retrouvé au niveau de la mitochondrie. Bien que le mécanisme d'adressage reste inconnu, l'accumulation du GD3 participe à la perméabilisation de la mitochondrie conduisant à la mort programmée de la cellule (Malisan and Testi, 2002).

I.D.5. Les gangliosides en tant que marqueur des cellules souches

Les cellules souches sont définies comme des cellules indifférenciées, capables d'auto-renouvellement et possédant la capacité de donner naissance à un organe. De nombreuses études ont cherché à caractériser des marqueurs spécifiques de ce réservoir cellulaire. Parmi les différents marqueurs identifiés à ce jour, certains gangliosides sont décrits comme des marqueurs intéressants (Moussavou et al., 2013; Xu et al., 2013) Par exemple, les gangliosides GD2 et GD3 sont décrits dans les cellules souches neurales. Le GD2 est également exprimé par les cellules souches mésenchymateuses (Yanagisawa, 2011b). L'expression de ces gangliosides diminue sur les cellules différenciées. A l'inverse, les gangliosides de la série-a, comme le GM1 et le GD1a ne sont pas exprimés sur les cellules souches neurales mais sur les cellules différenciées. Ces observations soulèvent l'hypothèse de l'implication de ces gangliosides dans la biologie de ces cellules et quelques travaux tentent à apporter une réponse. En particulier, des travaux montrent que le GD3 intervient dans l'auto-renouvellement de ces cellules par une interaction directe activatrice avec l'EGFR (Wang and Yu, 2013). D'autre part, le blocage endogène de la biosynthèse du GD2, par un ARN interférent de la GD3 synthétase et de la GD2 synthétase, conduit à l'inhibition de la différenciation neuronale (Jin et al., 2010).

Récemment, l'hypothèse de cellules souches tumorales a été mise en évidence dans différents cancers. Ces cellules, présentant un phénotype particulier, seraient à l'origine de la prolifération tumorale, mais également des phénomènes de résistance et d'extravasation. Les premiers travaux de Al-Hajj et al., ont décrit ces cellules dans le cancer du sein avec un phénotype CD44^{high}/CD24^{low} (Al-Hajj et al., 2003). Ainsi, de nombreux travaux portent sur la caractérisation de nouvelles cibles exprimées spécifiquement par ces cellules. Le GD2 a été défini comme un marqueur des cellules souches tumorales du cancer du sein, impliqué dans la promotion tumorale de ces cellules (Battula et al., 2012). Par spectrométrie de masse, l'expression des gangliosides GD2 et GD3 a également été corrélée au phénotype souche CD44^{high}/CD24^{low} (Liang et al., 2013). Plus récemment, il a été démontré que l'inhibition de la GD3 synthétase, par un ARN interférent ou par des inhibiteurs pharmacologiques chimiques, bloque l'initiation et le maintien de la transition épithélio-mésenchymale caractéristique des cellules souches tumorales (Sarkar et al., 2014). A l'inverse, l'expression de la GD3 synthétase est corrélée avec l'activation de la voie de signalisation du récepteur à l'HGF conduisant à une augmentation des propriétés souches des cellules.

I.E. Isolation et purification des gangliosides

Le protocole de purification des gangliosides commence par une extraction des lipides totaux (tissulaires ou cellulaires) en utilisant des solvants organiques tels que le chloroforme et le méthanol. Les gangliosides sont ensuite séparés des lipides neutres par une partition de Folch ou par chromatographie échangeuse d'anion. L'extrait gangliosidique peut être fractionné jusqu'à purifier chacun des gangliosides par différentes étapes sur HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance) en utilisant une colonne de silice (Liang et al., 2013). De plus, pour un ganglioside donné, les différents variants moléculaires, obtenus par la composition de l'acide gras et du céramide, peuvent être isolés par HPLC en utilisant une colonne hydrophobe ou de copolymère (Popa et al., 2002). Il est essentiel lors de toutes ces étapes de purification de préserver la structure originelle de l'acide sialique. Il est notamment important de prendre en considération le caractère alcali-labile des fonctions *O*-acétyles présentes sur les gangliosides *O*-acétylés. Un grand nombre de méthodes utilisées pour l'analyse structurale des glycoconjugués sont dans ce cas dénaturantes. Par exemple, l'hydrolyse alcaline en méthanol pour éliminer les phospholipides contaminant, la libération des chaînes glycaniques liées *O*-glycosidiquement par le borohydure en vue de leur caractérisation structurale ainsi que tous réactifs de pH alcalin hydrolyse cet ester *O*-acétyle.

La méthode la plus pratique pour mettre en évidence les gangliosides *O*-acétylés est d'analyser l'extrait gangliosidique total par une chromatographie sur couche mince de silice avant et après un traitement alcalin de l'échantillon (Sonnino et al., 1983). Il est également possible d'utiliser des AcM spécifiques dans la limite de leur disponibilité pour détecter ces gangliosides séparés par chromatographie sur couche mince de silice révélée par test immunoenzymatique ou I-TLC (*Immuno-thin layer chromatography*). Cependant, ces techniques ne permettent pas de discriminer la position du groupement *O*-acétyle de l'acide sialique terminal. L'utilisation du *Myxovirus influenzae C* dont l'hémagglutinine lie spécifiquement les acides sialiques 9-*O*-acétylés peut alors s'avérer utile. Quoiqu'il en soit la caractérisation de la localisation de la fonction *O*-acétylée doit être réalisée par spectrométrie de masse par fragmentation et par résonance magnétique nucléaire (RMN). Les améliorations techniques apportées dans ces domaines permettent une détection sensible de ces molécules. Ainsi quelques picomoles de produits suffisent pour être traités par des protocoles de spectrométrie de masse : ESI-MS ou MALDI-TOF-TOF (Garcia et al., 2014; Liang et al., 2013). La position exacte de la fonction *O*-acétylé sera quant à elle déterminée par RMN.

I.F. Propriétés biologiques des gangliosides

De nombreuses études ont permis de mettre en évidence plusieurs fonctions biologiques des gangliosides à la fois *in vitro* et *in vivo*, dans des conditions physiologiques normales et pathologiques, comme le cancer. Dans les premiers travaux décrivant les propriétés biologiques des gangliosides, les auteurs ont utilisés des gangliosides purifiés ajoutés dans le milieu de culture des cellules. La disponibilité d'AcM spécifiques a également permis d'associer certains gangliosides à des processus cellulaires comme l'adhésion ou l'apoptose. Ces dernières années des inhibiteurs des enzymes assurant la biosynthèse des gangliosides ont été développés. La caractérisation et le clonage de ces enzymes permettent également de modifier, de manière endogène, le profil gangliosidique en utilisant différentes techniques d'ADN recombinant.

Les gangliosides ont ainsi été montrés impliqués dans les phénomènes d'adhésion, de prolifération, de migration et de différenciation cellulaire, mais également dans l'organisation et le développement tissulaire notamment lors de l'embryogénèse (Kohla et al., 2002; Yu et al., 2011). Plusieurs travaux soulignent le rôle des gangliosides dans la signalisation cellulaire notamment dans des phénomènes de mort programmée de la cellule (Malisan and Testi, 2002). Les gangliosides sont également décrits pour leurs implications dans le développement et le maintien des tumeurs. Néanmoins, comme décrit précédemment le métabolisme des gangliosides est un mécanisme extrêmement complexe et finement régulé. Il est par conséquent très difficile d'étudier l'importance fonctionnelle d'un ganglioside donné sans influencer l'expression des autres gangliosides. De même, en cas d'utilisation d'anticorps anti-gangliosides, les modifications observées peuvent être dépendantes des propriétés intrinsèques de l'anticorps utilisé.

Par exemple, afin d'élucider les propriétés biologiques du GD3, les cellules sont très souvent transfectées par la GD3 synthétase entraînant une surexpression du GD3. Cependant, le GD3 peut servir de substrat à la biosynthèse du GD2 et des gangliosides de la série -b et -c (Figure 3). De même, l'inactivation de la GD3 synthétase conduit à une accumulation de précurseurs du GD3 comme le GM3, voire un basculement du schéma de la biosynthèse des gangliosides vers la série-a. Enfin, rappelons l'absence de caractérisation d'une *O*-acétyltransférase spécifique de l'acide sialique terminal des gangliosides. Dans ce cas, l'implication fonctionnelle des gangliosides *O*-acétylés se limite soit à l'ajout de gangliosides *O*-acétylés de façon exogène dans le milieu de culture, soit à l'utilisation d'AcM spécifiques,

ou encore à l'utilisation de l'ADNc codant pour l'*O*-acétyl estérase du *Myxovirus Influenza C* qui hydrolyse spécifiquement les fonctions 9-*O*-acétylées des acides sialiques des gangliosides mais également celles présentes sur les acides sialiques des glycoprotéines (Birklé et al., 2003). Toutes ces limitations font qu'ils n'existent à ce jour que des preuves indirectes impliquant les gangliosides dans les différents processus biologiques mise en évidence.

I.F.1. Gangliosides et interactions cellules-pathogènes

De par leur expression au niveau de la surface cellulaire, les gangliosides sont utilisés comme récepteurs par différents virus et bactéries. L'exemple le plus décrit est celui du GM3 qui interagit avec le VIH-1 (Virus de l'Immunodéficience Humaine-1). Il a été montré que cette interaction est l'un des premiers évènements contribuant à la dissémination virale par les cellules dendritiques (Hammache et al., 1998; Puryear et al., 2012). Le GM1a et GM1b servent également de récepteurs pour le *Myxovirus influenzae A* (Suzuki et al., 1985). Différents gangliosides sont également impliqués dans l'internalisation des rotavirus (Martínez et al., 2013).

Les gangliosides sont également utilisés comme récepteurs par différentes toxines bactériennes telle que la toxine cholérique. La première étape du mécanisme d'action de cette exotoxine au niveau des cellules intestinales est la fixation de sa sous-unité B sur le GM1, ce qui induit l'internalisation de la sous-unité A et permet l'action de la toxine au niveau de sa cible intracellulaire. D'autres toxines bactériennes sont décrites pour fixer les gangliosides : la toxine tétanique lie le GD1b et le GT1b ; et la toxine botulique lie le GD1b, le GT1b et le GQ1b (Eidels et al., 1983).

I.F.2. Implication des gangliosides dans les interactions cellules-matrice extracellulaire

Les gangliosides sont impliqués dans les interactions cellules-matrice, soit par liaison directe aux molécules de la matrice comme le collagène, soit par association aux molécules membranaires impliquées dans l'adhésion cellulaire comme les intégrines. Par exemple, le GM1 possède une très forte affinité pour la laminine 1. Cette interaction entraîne le recrutement d'un complexe de molécule de signalisation au sein de la membrane plasmique induisant la croissance neuronale (Ichikawa et al., 2009). Un autre exemple est apporté par le

GT1b qui se fixe à l'intégrine $\alpha 5\beta$. Cette liaison inhibe l'interaction entre l'intégrine et la fibronectine permettant de contrôler la survie et la migration cellulaire de kératinocytes (Wang et al., 2001). Plusieurs gangliosides, comme le GD3-Oac sont aussi impliqués dans la régénération axonale et la germination cérébrale suite par exemple à un traumatisme cérébral (Ribeiro-Resende et al., 2007). D'autre part, des interactions similaires impliquant des gangliosides tumoraux ont été décrites. Enfin, plusieurs travaux ont mis en évidence un rôle essentiel des complexes intégrine-tétraspamine-ganglioside dans les interactions cellules-matrice et dans les signaux transmembranaires (Regina Todeschini and Hakomori, 2008; Todeschini et al., 2007).

I.F.3. Fonctions immunorégulatrices des gangliosides

Comme décrit précédemment, les gangliosides exosomaux libérés par les cellules tumorales peuvent s'intégrer dans les membranes plasmiques des cellules immunitaires du micro-environnement tumoral comme les lymphocytes. Ils exercent alors une action immunorégulatrice en inhibant significativement l'activité de ces lymphocytes (Ladisch et al., 1983; Lee et al., 2012; Li et al., 1996).

Un autre mécanisme immunorégulateur des gangliosides tumoraux implique l'interaction du gangliosides à la surface de la cellule tumorale avec des lectines appartenant à la familles des siglecs (*sialic-acid binding immunoglobulin-like lectins*) exprimées à la surface des lymphocytes NK (Crocker et al., 2007). La siglec-7 reconnaît préférentiellement les deux acides sialiques des gangliosides de la série-b le GD3, le GD2 et le GD1b (Figure 3). Cette siglec est notamment exprimée sur les cellules NK et son interaction avec ces gangliosides diminue l'activité cytotoxique de ces cellules (Nicoll et al., 2003).

I.F.4. Gangliosides et modulation des signaux transmembranaires

Les gangliosides participent à la constitution des glycosynapses (Hakomori, 2002). Au sein de ces structures cellulaires, ils interagissent avec différents récepteurs à activité tyrosine kinase. Il est possible de distinguer trois mécanismes permettant aux gangliosides de moduler l'activité de ces récepteurs : (i) certains gangliosides peuvent jouer le rôle de co-récepteur, par exemple le GM1 peut se lier au FGFR (*Fibroblast Growth Factor Receptor*) et activer la signalisation dépendante de ce récepteur (Rusnati et al., 2002) ; (ii) d'autres gangliosides

possèdent une activité antagoniste à ces récepteurs comme le GM3 qui bloque la dimérisation de l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) (Zhou et al., 1994); (iii) enfin les gangliosides peuvent aussi modifier la localisation subcellulaire du récepteur et ainsi moduler son activité à l'exemple du GM1 qui induit la dispersion du PDGFR (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor*) hors des structures lipidiques conduisant à la suppression des signaux de croissance cellulaire (Mitsuda et al., 2002).

I.F.5. Propriétés biologiques des gangliosides tumoraux

Les gangliosides exprimés par les cellules tumorales contribuent selon de nombreux travaux aux processus de cancérisation en modulant la prolifération, l'adhésion, la motilité cellulaire ainsi que la signalisation intracellulaire.

L'utilisation d'inhibiteurs de la GlcCer synthétase comme le PDMP (1-phényl-2-décanoylamino-3-morpholino-1-propanol) et le PPPP (1-phényl-2-hexadécanoylamino-3-pyrrolidino-1-propanol) conduit à une diminution significative des gangliosides cellulaires dans plusieurs lignées cellulaires tumorales. Bien que cette déplétion en gangliosides tumoraux ne déclenche pas de cytotoxicité ni d'inhibition de la prolifération *in vitro*, elle s'accompagne d'une inhibition de la croissance tumorale et du pouvoir métastatique *in vivo* dans un modèle de mélanome (Deng et al., 2000). De plus, ces molécules n'entraînent pas l'accumulation de céramides, ni de ses produits métaboliques (Cuvillier et al., 1996; Lee et al., 1999; Pukel et al., 1982). Ces observations suggèrent que les gangliosides tumoraux sont impliqués dans la tumorigénèse. Cependant, l'utilisation de ces inhibiteurs présente plusieurs limites. Le blocage de la biosynthèse des gangliosides au niveau du glucosylcéramide peut notamment se traduire par un ensemble de mécanismes d'interférences complexes pouvant modifier différents événements cellulaires. Ceci rend plus difficile l'identification spécifique des molécules impliquées.

D'autres travaux se sont concentrés sur la GD3 synthétase, et ont permis de décrire un rôle de cette enzyme et de ses produits dans les propriétés tumorigénique des cellules cancéreuses. L'inhibition d'expression de la GD3 synthétase, par un ARN interférent, dans un modèle de neuroblastome murin est corrélée à une diminution de la croissance et de la migration cellulaire *in vitro* ainsi qu'une diminution du pouvoir métastatique *in vivo* (Zeng et

al., 2000, 2005). Au contraire, la surexpression de la GD3 synthétase est associée à une augmentation du caractère invasif des cellules de glioblastome (Sottocornola et al., 1998). Des observations similaires ont été décrites en diminuant l'expression du GD3 et de son dérivé *O*-acétylé dans des modèles de mélanome et de neuroblastome (Birklé et al., 2000; Deng et al., 2000). De plus, l'utilisation de clones cellulaires de mélanome déplétés pour la GD3 synthétase montre que l'inhibition de la GD3 synthétase est corrélée à une diminution de la prolifération tumorale (Nakano et al., 1996). D'autre part, le GD3 et le GD2 jouent un rôle fonctionnel dans la fixation des cellules à la matrice extracellulaire par une interaction directe ou indirecte impliquant les intégrines et des molécules de la matrice (collagène, laminine, fibronectine). Cette liaison est associée à l'activité métastatique de ces cellules (Cheresh et al., 1986a; Nakano et al., 1999). Les effets de ces gangliosides sont transmis par l'intermédiaire d'un recrutement des intégrines dans les glycosynapses et des molécules adaptatrices FAK (*Focal Adhesion Kinase*), IKL-Akt (*Integrin-Linked Kinase-Akt*), p130Cas et paxilline (Furukawa et al., 2012; Ohkawa et al., 2010). Il a été également mis en évidence l'existence d'une synergie entre la signalisation induite par le GD3 et celle induite par des récepteurs de facteur de croissance tel que l'HGFR (*Hepatocyte Growth Factor Receptor*) (Figure 6) (Furukawa et al., 2014).

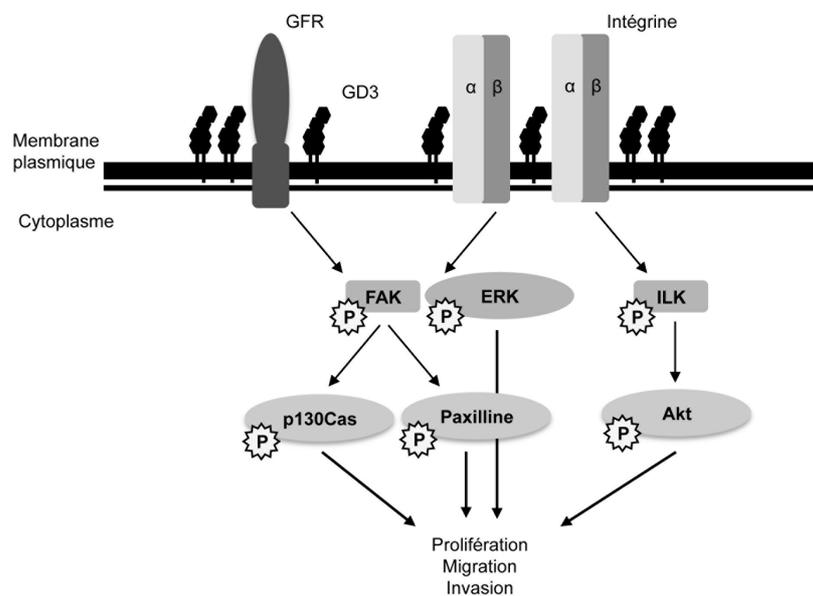


Figure 6 : Signalisation associée à la surexpression de la GD3 synthétase dans le mélanome (adaptée de Furukawa et al., 2012). Suite à la fixation du facteur de croissance sur son récepteur, le GD3 est recruté par ce récepteur. Ce recrutement entraîne une interaction directe avec ce récepteur. Le GD3 peut également s'associer par interaction directe aux intégrines. Ces interactions entraînent la phosphorylation des molécules FAK-p130Cas, paxilline et ILK-Akt à l'origine de la prolifération tumorale.

La GD3 synthétase et le couple GD3/GD2 sont également impliqués dans la prolifération, la croissance et la migration de ces cellules tumorales du cancer du sein (Cazet et al., 2009, 2010, 2012). Différents travaux montrent ainsi que les gangliosides GD3 et GD2 induisent une activation constitutive du récepteur à l'HGF entraînant l'activation des voies de signalisation associées à ce récepteur. L'augmentation de la tumorigénèse dans ces cellules est directement induite par l'auto-activation du récepteur à l'HGF et l'activation des voies PI3K/Akt et MEK/ERK. Cependant, il n'est pas exclu que d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase soient impliqués (Figure 7).

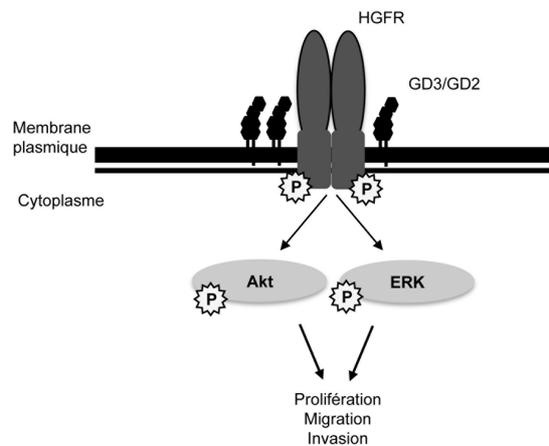


Figure 7 : Signalisation associée à la surexpression de la GD3 synthétase dans le cancer du sein (adaptée de Cazet et al., 2012). Les gangliosides GD3 et GD2 induisent la phosphorylation activatrice constitutive du HGFR entraînant l'activation des voies de signalisation PI3K-Akt et ERK entraînant la prolifération tumorale des cellules de sein.

Une étude récente montre que la surexpression de la GD3 synthétase induit une inhibition de la survie de cellules de cancer du pancréas. Ce phénomène est corrélé à un arrêt du cycle cellulaire et un défaut d'adhésion de ces cellules au niveau de la matrice extracellulaire (Mandal et al., 2014). A l'opposé, différentes études sur d'autres modèles, tels que les lignées cellulaires Cos, CHO et HeLa, ont montré que la surexpression de la GD3 synthétase n'a aucune influence sur la croissance de ces cellules (Malisan and Testi, 2002).

Les résultats décrits ci-dessus décrivent des rôles contradictoires du GD3, soit pro-prolifératifs, soit anti-prolifératifs, voire n'ayant aucune influence. Ainsi, les modèles cellulaires utilisés semblent influencer de façon importante les résultats rapportés. Ces observations sont sans doute à relier au métabolisme des gangliosides.. En effet, la plupart de

ces études ne prennent pas en compte l'ensemble des modifications apportées aux profils gangliosidiques.

D'autres travaux suggèrent également l'implication du GD2 dans les processus tumoraux. L'utilisation d'un ARN interférent ciblant la GD2 synthétase dans la lignée de cancer du sein MDA-MB-231 est associée à une diminution de l'activation du récepteur à l'HGF et une diminution du phénotype hautement cancérigène de ces cellules (Cazet et al., 2012). L'obtention de clones cellulaires d'ostéosarcome transfectés par la GD3 synthétase exprimant soit le GD3 et le GD2, soit uniquement le GD3 ou le GD2, a permis de mettre en évidence un rôle plus spécifique du GD2 dans les phénomènes de migration et d'invasion de ces cellules. Cette étude a aussi démontré que les effets induits par le GD2 et le GD3 sont similaires et que la signalisation dépendant de ces deux gangliosides peut être identique (**Figure 8**) (Shibuya et al., 2012). En parallèle, il a été montré que l'expression du GD2 dans des clones cellulaires de cancer du poumon à petites cellules, obtenus par transfection de l'ADNc codant pour la GD3 synthétase, est corrélée à une augmentation de la croissance et l'invasion tumorale (Yoshida et al., 2001). De même, l'inhibition de l'expression du GD2 par un ARN interférent ciblant la GD3 synthétase, réduit la croissance tumorale (Ko et al., 2006).

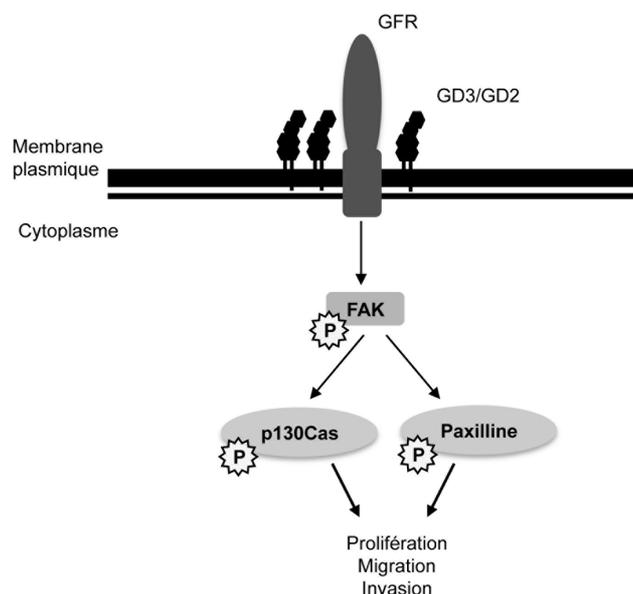


Figure 8 : Signalisation associée aux gangliosides GD3 et GD2 dans l'ostéosarcome (adaptée de Shibuya et al., 2012). Suite à la fixation du facteur de croissance sur son récepteur, le GD3 et le GD2 entre en interaction directe avec ce récepteur. Cette interaction entraîne la phosphorylation de la molécules FAK, p130Cas et paxilline entraînant la prolifération tumorale des cellules d'ostéosarcome.

Enfin, un grand nombre d'études a été mené en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre le GD2 dans différentes lignées tumorales comme le neuroblastome, le cancer du poumon à petites cellules, le mélanome, l'ostéosarcome ou encore dans le cancer du sein. Ces études ont montré que la liaison de ces anticorps au GD2 membranaire déclenche un mécanisme de mort cellulaire. Le traitement par différents anticorps anti-GD2 induit, dans un modèle de mélanome, un détachement des cellules de la fibronectine (Cheresh and Klier, 1986). Ces observations ont été confirmées dans différentes lignées de neuroblastome avec l'anticorps monoclonal de souris 14G2a (IgG2a, κ) (Kowalczyk et al., 2009). De plus, dans des lignées cellulaires de cancer du poumon à petites cellules, il a été rapporté une signalisation apoptotique induite par traitement avec l'anticorps monoclonal de souris 220-51 (IgG3, κ) (Aixinjueluo et al., 2005). La liaison des anticorps au GD2 induit la dissociation du complexe GD2-intégrine. Ce phénomène induit la déphosphorylation de FAK entraînant l'activation de la voie p38/MAPK (Figure 9). Ces études permettent avant tout d'émettre l'hypothèse de nouvelles propriétés pharmacologiques des anticorps ciblant les gangliosides tumoraux à défaut de démontrer un rôle pro-apoptotique du GD2.

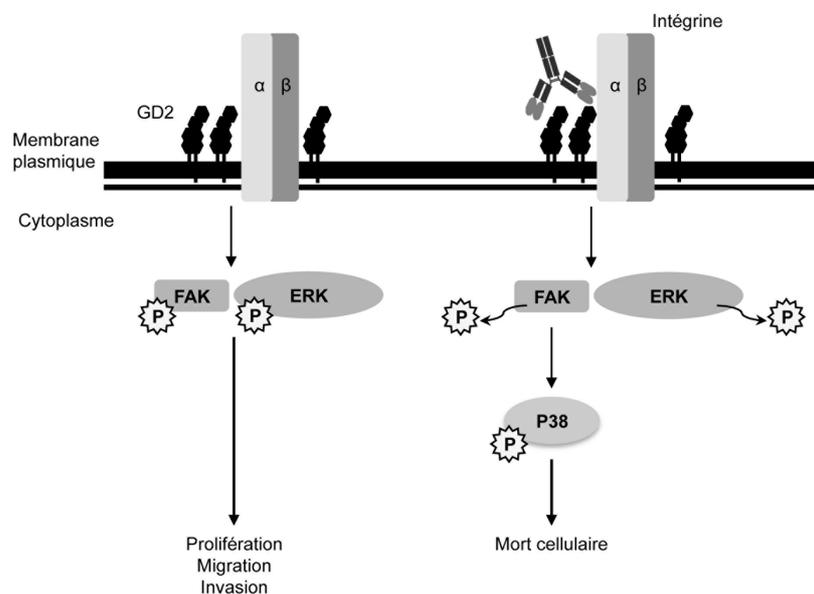


Figure 9 : Signalisation apoptotique associée au GD2 dans le cancer du poumon à petites cellules (adaptée de Aixinjueluo et al., 2005). Le GD2 peut s'associer par interaction directe aux intégrines. Ces interactions ont pour effet d'augmenter la signalisation induite par ces molécules et notamment les voies de prolifération FAK et ERK. Le traitement par un anticorps anti-GD2 entraîne la dissociation du complexe GD2-intégrine et induit la mort cellulaire des cellules tumorales.

A l'opposé, l'utilisation du GD3 purifié exogène a permis démontrer un rôle pro-apoptotique du GD3 par d'interaction directe avec la mitochondrie ou en induisant des signaux apoptotiques (Figure 10) (Malisan and Testi, 2002). D'autre part, la dégradation du GD3, comme celle des autres gangliosides, entraîne la génération du céramide qui peut également déclencher la mort cellulaire. En effet, le céramide et son produit de dégradation, la sphingosine, peuvent agir directement en modulant positivement ou négativement différentes voies des MAPK. Le céramide semble également pour entrer en interaction directe avec la mitochondrie. L'ensemble de ces mécanismes semble régulé par les molécules de la famille Bcl-2 (Cuvillier, 2002; Kolesnick and Krönke, 1998; Woodcock, 2006). Bien qu'aucune preuve ne soit apportée actuellement, l'utilisation des anticorps ciblant les gangliosides pourrait conduire à la génération de céramide et au déclenchement d'apoptose par ce phénomène.

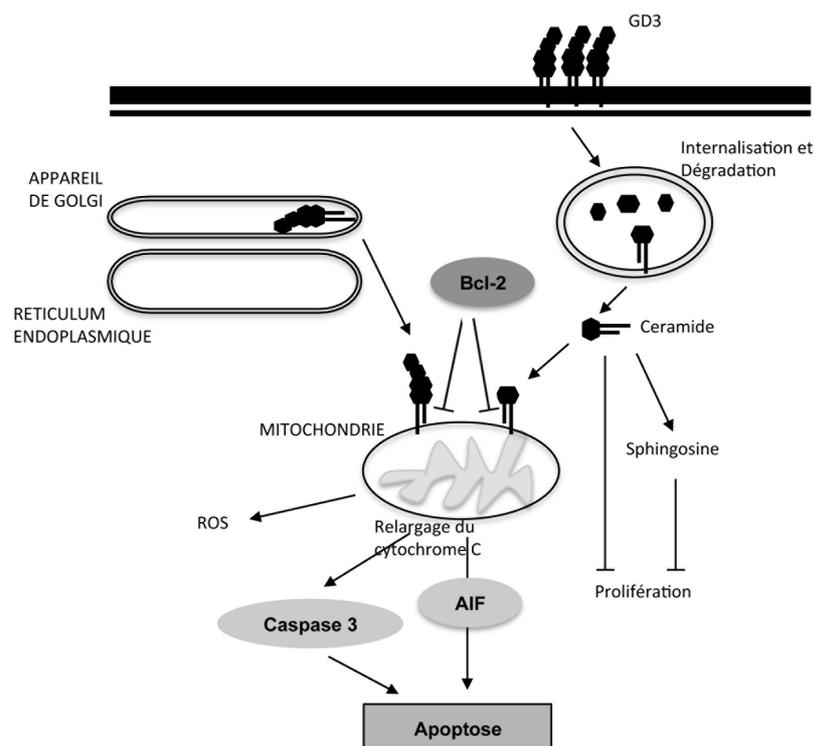


Figure 10 : Médiation de l'apoptose par le GD3 (adaptée de Malisan and Testi, 2002). Suite à son internalisation le GD3 et le céramide, obtenu après sa dégradation, peuvent s'intégrer au sein de la membrane de la mitochondrie entraînant sa déstabilisation et le relargage du cytochrome C déclenchant ainsi l'apoptose par l'intermédiaire des caspases ou d'une voie indépendante *via* la phosphorylation de la molécule AIF. Le céramide peut également bloquer la prolifération cellulaire suite à sa dégradation en sphingosine.

I.F.6. Propriétés biologiques des gangliosides exprimés par les cellules souches tumorales

Les travaux sur le cancer du sein, ont identifié une sous-population cellulaire souche avec un phénotype CD44^{high}/CD24^{low} (Al-Hajj and Clarke, 2004). Des études récentes ont montré, par spectrométrie de masse, des variations des profils gangliosidiques entre les populations de cellules souches tumorales et les non souches dans le cancer du sein (Liang et al., 2013). L'expression du GD3 et du GD2 a été corrélée au phénotype souche CD44^{high}/CD24^{low}. Le rôle de ces gangliosides a également été étudié par l'utilisation de l'ARN interférent ciblant la GD3 synthétase et la GD2 synthétase. Les auteurs montrent une diminution des propriétés fonctionnelles *in vitro* des cellules souches tumorales CD44^{high}/CD24^{low}, évaluées par la formation de mammosphères et la mobilité cellulaire suite à l'incorporation d'ARN interférent. Une seconde étude ciblant le GD2 rapporte des résultats similaires (Battula et al., 2012). Ces auteurs montrent qu'au sein de la population des cellules souches tumorales CD44^{high}/CD24^{low}, deux sous populations se distinguent par l'expression du GD2 révélée avec l'anticorps monoclonal 14G2a. Le tri des cellules exprimant le GD2, par cet anticorps, permet de démontrer que ces cellules possèdent les caractères fonctionnels de cellules souches tumorales par rapport à la sous-population GD2^{négative}. Ces caractères incluent la capacité à former des mammosphères, les capacités proliférative et invasive ainsi que la capacité à former des tumeurs *in vivo* en limite de dilution cellulaire. Ces observations suggèrent l'implication du ganglioside GD2 dans le phénotype souche de ces cellules tumorales ainsi que l'intérêt du ciblage thérapeutique de ce ganglioside.

I.F.7. Propriétés biologiques des gangliosides O-acétylés

Les propriétés biologiques des gangliosides O-acétylés ont été étudiées de façons indépendantes ou comparées à celles de leurs dérivés non O-acétylés. De nombreux travaux se concentrent sur le GD3-Oac. De manière générale, les gangliosides O-acétylés sont impliqués dans les mêmes phénomènes cellulaires décrits pour les gangliosides comme dans les interactions cellules-cellules, dans la régulation de la réponse immunitaire ou encore dans la promotion de la croissance tumorale (Schauer et al., 2001, 2011).

Des travaux menés sur des patients atteints de leucémie lymphoblastique aigüe ont mis en évidence que l'activité des SOAT et l'expression des acides sialiques O-acétylés sont corrélés avec le niveau de la résistance tumorale à la chimiothérapie et à l'agressivité du

cancer. Les tumeurs répondants aux traitements présentent une faible activité des SOAT (Mandal et al., 2009, 2012; Sinha et al., 1999). Ces observations sont corrélées avec une autre étude montrant une surexpression du GD3-Oac dans les cellules leucémiques résistantes à la chimiothérapie (Parameswaran et al., 2013). Ces auteurs suggèrent que le GD3 *O*-acétylé ne présente aucun rôle fonctionnel dans l'acquisition de la résistance tumorale, tout en corrélant son expression à l'existence d'un phénotype résistant. Ils relient l'augmentation d'expression du GD3-Oac à des modifications induites par la chimiothérapie affectant le catabolisme des gangliosides. A l'opposé, Malisan et al., suggèrent que le GD3-Oac protège la cellule de l'apoptose induite par le GD3 (Malisan et al., 2002). L'expression de l'hémagglutinine du *Myxovirus influenzae C*, capable d'*O*-acétyler les gangliosides sous le contrôle de promoteurs spécifiques, bloque le développement du zygote dès le stade de 2 cellules (Varki et al., 1991). Ces observations suggèrent que l'*O*-acétylation des acides sialiques est impliquée dans la segmentation de l'embryon. Par contre, l'expression tardive de cette enzyme dans certains organes crée des anomalies de développement. Ces observations illustrent le rôle critique des acides sialiques 9-*O*-acétylés dans des phénomènes de prolifération et de migration cellulaire. De même, une expression différentielle du GD3-9-Oac a été mise en évidence pendant la maturation et l'activation des lymphocytes T et B (Erdmann et al., 2006; Wipfler et al., 2011). Par conséquent, le GD3-Oac est considéré comme un marqueur de différenciation leucocytaire (Kniep et al., 1992).

II. Immunociblage thérapeutique du marqueur gangliosidique tumoral GD2

Les modifications des profils gangliosidiques retrouvées dans le cadre des tumeurs neuroectodermiques sont d'autant plus intéressantes quand celles-ci concernent un ganglioside très faiblement exprimé dans les tissus normaux comme le GD2. Ce dernier appartient à la série-b des gangliosides. Son oligosaccharide est composé d'un glucose, d'un galactose et d'une *N*-acétylgalactosimine. Sur le galactose sont greffés en série deux acides sialiques (Figure 3). Dans les tissus sains adultes, le GD2 est détecté à l'état de traces dans les neurones, les mélanocytes et les fibres sensibles des nerfs périphériques (Svennerholm, 1964; Yuki et al., 1997). Le GD2 est également décrit dans les cellules souches neurales et mésenchymateuses (Yanagisawa, 2011b). D'autre part, le GD2 est exprimé par différents cancers et notamment par les cancers d'origine neuroectodermique tels que le neuroblastome, le rétinoblastome, le mélanome ou le cancer du poumon à petites cellules (Cheresh et al., 1984a, 1986b). L'expression du GD2 est également décrite dans les cancers cérébraux comme le gliome, dans l'ostéosarcome et le sarcome d'Ewing (Longee et al., 1991; Shibuya et al., 2012). Plus récemment, le GD2 a été montré sur les cellules souches du cancer du sein (Battula et al., 2012; Liang et al., 2013).

L'utilisation d'anticorps monoclonaux (AcM) spécifiques du GD2 permet de développer des approches thérapeutiques innovantes contre ces cancers et notamment contre le neuroblastome de haut grade (Yu et al. 2010). Deux AcM de souris ciblant le GD2 ont fait l'objet d'un développement clinique, l'AcM 3F8 obtenu par le Dr. N.K. Cheung (Cheung et al., 1985) et de l'AcM 14.18 développé par le Dr. D.A.Cheresh (Schulz et al., 1984). Cet anticorps a été produit sous la forme d'un AcM chimérique dont la demande d'autorisation de mise sur le marché est actuellement en cours d'évaluation aux Etats-Unis et en Europe sous le nom de dinutuximab (Reichert, 2014b). Cependant l'utilisation de ces AcM se heurte à une toxicité aiguë lors de leur administration. Ces effets indésirables sont reliés à l'expression du GD2 sur les fibres sensibles des nerfs périphériques. En effet, la fixation de ces AcM sur les nerfs périphériques provoque des douleurs sévères chez le patient, douleurs qui ne peuvent pas être entièrement contrôlées par l'injection de drogues opiacées (Wallace et al., 1997). Ces douleurs sont imputées à l'activation du complément contre les fibres sensibles des nerfs périphériques (Yuki et al., 1997).

Dans ce chapitre, sont présentés les différents formats d'anticorps ciblant le marqueur tumoral GD2 développés jusqu'à ce jour, ainsi que les perspectives actuelles en immunothérapies ciblant le disialoganglioside GD2.

II.A. Indications des anticorps thérapeutiques anti-GD2

L'utilisation thérapeutique des AcM spécifiques du marqueur gangliosidique GD2 a été principalement évaluée dans l'indication neuroblastome. Le neuroblastome (ou sympathoblastome) est un cancer rare du jeune enfant. Ce cancer est une tumeur extracrânienne d'origine embryonnaire se développant au niveau de la crête neurale du système nerveux sympathique (Hoehner et al., 1996). La tumeur primitive apparaît le plus souvent au niveau des glandes surrénales. Des métastases, essentiellement hépatiques et osseuses sont détectées chez plus de 60% des enfants au moment du diagnostic. Cette tumeur se caractérise par sa grande hétérogénéité, allant de la tumeur bénigne régressant spontanément à des formes agressives mettant en jeu le pronostic vital du patient.

Ce cancer est une maladie rare 1500 nouveaux cas par an sont diagnostiqués en Europe, 600 aux Etats-Unis et 150 en France. Il représente 10% des cancers pédiatriques et est la première cause de mortalité par cancer chez les patients de moins de 15 ans (Matthay et al., 2012). Le neuroblastome est diagnostiqué dans 90% des cas avant l'âge de 5 ans, avec une médiane de diagnostic de 19 mois. Un tiers des cas est découvert avant l'âge de 1 an.

Plusieurs classifications sont employées pour décrire le plus spécifiquement possible le stade clinique du neuroblastome. La classification selon l'INSS (système international de classement du neuroblastome; *International Neuroblastoma Staging System*) classe le neuroblastome en quatre stades selon des critères exclusivement cliniques validés et réévalués en 1993 (Tableau 3) (Brodeur et al., 1988, 1993). Le COG (groupe d'oncologie pédiatrique, *the Children's Oncology Groups*) propose de classer le neuroblastome selon l'âge, le stade post-chirurgical, l'amplification du gène MYCN (amplifié dans 20% des neuroblastome), la ploïdie de la cellule tumorale et les facteurs histologiques définis par le modèle de Shimida (incluant le degré de différenciation des neuroblastes, l'indice mitose, et l'âge au moment du diagnostic) (Maris et al., 2007; Mueller and Matthay, 2009). Cette classification définit trois stades du neuroblastome bas grade, grade intermédiaire, haut grade (Tableau 4).

Ces classifications permettent de déterminer des stratégies de traitement à adopter pour chaque patient. Actuellement deux stratégies peuvent être décrites. La première qui tend vers un allègement de la thérapie accompagnant la chirurgie pour les tumeurs à bon pronostic et à risque intermédiaire. La seconde, pour les tumeurs agressives avec une amplification de la prise en charge des patients incluant chimiothérapie, radiothérapie et dans le cas les plus

grave greffe de cellules souches hématopoïétiques autologues. Malgré cette combinaison thérapeutique de nombreuses rechutes sont toujours observées. L'immunothérapie à base d'AcM anti-GD2 est préconisée pour les tumeurs à mauvais pronostic exprimant le GD2. Ces tumeurs représentent 40% des neuroblastomes de haut grade (Maris et al., 2007).

La chirurgie consiste en une exérèse partielle ou totale de la tumeur. Elle est accompagnée de chimiothérapie agressive et myéloablative dans 60% des cas. Cette dernière consiste en de forte dose de cisplatine et d'étoposide avec des cures de vincristine, de doxorubicine et de cyclophosphamide (Kushner et al., 2011a). L'utilisation de topotécan permet de prévenir les rechutes (Längler et al., 2002).

Dans le cas du neuroblastome de haut grade, la chimiothérapie est suivie d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques autologues. Elle a pour objectif de renouveler la moelle osseuse hématopoïétique lorsque celle-ci est infiltrée par la tumeur dans les cas les plus grave du cancer. Aux Etats-Unis, la greffe de cellules souches hématopoïétiques est ensuite suivie d'une chimiothérapie d'entretien à base d'acide rétinoïque. Cette chimiothérapie diminue significative le risque de rechutes (Matthay et al., 1999, 2009). La radiothérapie est généralement utilisée chez les patients avec une forme amplifiée du gène MYCN et de façon palliative lorsque des métastases osseuses sont diagnostiquées.

Les rechutes fréquentes chez ces patients peuvent être liées à la présence de cellules tumorales résiduelles après la chimiothérapie. Elles sont à l'origine du faible taux de survie à 5 ans, inférieur à 40% pour les patients atteints de neuroblastome de haut grade. L'élimination de ces cellules tumorales résiduelles est donc un enjeu majeur. Dans ce contexte, l'immunothérapie a pour objectif l'élimination des cellules tumorales résiduelles tout en évitant les phénomènes de toxicité rencontrés avec les autres méthodes de prise en charge existantes. Récemment, un essai clinique de phase III réalisé chez des patients atteints de neuroblastome de haut grade a montré que l'association de l'AcM ch14.18 anti-GD2, de l'IL-2 et du GM-CSF à l'acide rétinoïque, suite à une greffe de cellules souches hématopoïétiques, permet d'augmenter de façon significative la survie globale des patients et de prévenir les rechutes (Yu et al., 2010) (Tableau 7). Cette avancée est le résultat de 20 ans d'effort de recherche concernant le développement d'AcM thérapeutiques ciblant le GD2 qui seront détaillés dans les chapitres suivants. Elle permet à présent d'envisager de nouvelles perspectives pour améliorer la prise en charge de ces patients.

Tableau 3 : Classification du neuroblastome selon l'INSS (adapté de Maris et al., 2007).

| Stade | Caractéristiques anatomiques et histologiques |
|-------------|---|
| I | Tumeur limitée à son point d'origine. Ablation complète. Présence éventuelle de ganglions atteints inclus dans la tumeur. |
| II A | Tumeur limitée à son point d'origine. Ablation incomplète. |
| II B | Tumeur limitée à son point d'origine avec ablation complète ou incomplète. Les ganglions du côté atteint ne sont pas inclus dans la tumeur mais sont atteints à l'analyse histologique. |
| III | Tumeur localisée à un seul côté, non extirpable, traversant la ligne médiane [#] . Envahissement ou non des ganglions régionaux. où Tumeur localisée à un seul côté ou tumeur de la ligne médiane [#] avec envahissement des ganglions des deux côtés. ([#] le bord de la vertèbre, du côté opposé à celui de la tumeur). |
| IV | Tumeur, avec métastases (à l'exception des éléments du stade IV S). |
| IV S | Tumeur initiale limitée à son point d'origine, retirée totalement avec des métastases (le foie, la peau et/ou la moelle osseuse) sauf au niveau de l'os. |

Tableau 4 : Classification du neuroblastome selon le COG (adapté de Maris et al., 2007).

| Stade INSS | Age (jours) | Forme du gène MYCN | Ploïdie des cellules | Histologie | Grade |
|------------|-------------|--------------------|----------------------|---------------|---------------|
| I | - | - | - | - | Bas |
| IIA/B | - | Normal | - | - | Intermédiaire |
| | - | Amplifié | - | - | Haut |
| III | <547 | Normal | - | - | Intermédiaire |
| | >547 | Normal | - | Favorable | Intermédiaire |
| | - | Amplifié | - | - | Haut |
| | >547 | Normal | - | Non favorable | Haut |
| IV | <365 | Amplifié | - | - | Haut |
| | <365 | Normal | - | - | Intermédiaire |
| | 365-547 | Amplifié | - | - | Haut |
| | 365-547 | - | =1 | - | Haut |
| | 365-547 | - | - | - | Haut |
| | 365-547 | Normal | >1 | Favorable | Intermédiaire |
| | >547 | - | - | - | Haut |
| IV S | <365 | - | >1 | Favorable | Bas |
| | <365 | - | =1 | - | Intermédiaire |
| | <365 | - | - | Non favorable | Intermédiaire |

La ploïdie des cellules tumorales est présentée selon l'index d'ADN. Au niveau histologique les tumeurs sont classées comme favorables ou non favorables par le modèle de Shimida.

II.B. Propriétés des anticorps thérapeutiques

Dans la lutte anti-tumorale, différentes stratégies peuvent être adoptées. La chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie font partie des traitements standard actuellement utilisés en clinique. Cependant, ces thérapies ne sont pas entièrement efficaces en raison de mécanismes de résistance développés par les cellules tumorales qui sont à l'origine de rechute chez le patient. Dans ces conditions, plusieurs approches innovantes sont développées. C'est notamment le cas de l'immunothérapie qui prend une place de plus en plus importante. Cette thérapie qui se base sur l'utilisation sous toutes ses formes du système immunitaire se divise classiquement en deux grandes approches : l'immunothérapie passive et l'immunothérapie active. L'immunothérapie active consiste à utiliser directement le système immunitaire du patient par plusieurs approches alors que l'immunothérapie passive consiste à administrer aux patients des anticorps monoclonaux ciblant un antigène particulier. Dans l'immunociblage des cellules tumorales, l'antigène ciblé est préférentiellement un récepteur membranaire exprimé de façon spécifique par les cellules tumorales. Ce récepteur est, en général, impliqué dans des phénomènes de prolifération et d'adhésion cellulaire. Actuellement, plus de trente anticorps thérapeutiques commerciaux ont obtenu une autorisation de mise sur la marché et plus de trois cent sont en phase de développement clinique (Reichert, 2014a).

II.B.1. Mécanismes anti-tumoraux des anticorps thérapeutiques

Les anticorps sont des glycoprotéines appartenant à la super famille des immunoglobulines (Ig). D'un point de vue structural, ils sont formés par l'association de deux chaînes lourdes (H pour *Heavy*) et de deux chaînes légères (L pour *Light*) identiques entre elles, et reliées par des ponts disulfures au niveau de la région charnière (ou Hinge) (Figure 11). Chaque chaîne lourde comprend trois ou quatre domaines constant (CH1, CH2, CH3 et CH4) et un domaine variable (VH) pour une masse totale d'environ 50 kDa. Une chaîne légère comprend un domaine constant (CL) et un domaine variable (VL) aboutissant à une masse de 25 kDa. Ainsi, un anticorps monomérique, composé de ses quatre chaînes, présente une masse de 150 kDa. Il existe différentes classes d'anticorps chez l'homme (IgG, IgA, IgM, IgE et IgD) qui se différencie en terme de séquence, de structure et de fonction. L'immunothérapie anti-tumorale utilise principalement la classe IgG du fait ses propriétés cytotoxiques (Tableau 6). Les anticorps sont également caractérisés par une région constante

(domaines CL, CH1, CH2, CH3, CH4) et une région variable (domaines VL, VH). La région variable est composée des régions hypervariables ou CDR (*Complementary Determining Regions*) formant des boucles entre des régions charpentes ou FR (*Framework Region*). Les CDR sont propres à chaque anticorps et leurs séquences sont responsables de la spécificité d'un anticorps pour un épitope sur un antigène donné. La région constante n'est pas impliquée dans la spécificité antigénique mais assure les fonctions effectrices cytotoxiques des anticorps. Sa séquence protéique varie en fonction de l'espèce et de l'isotype ce qui influence de manière importante les fonctions effectrices.

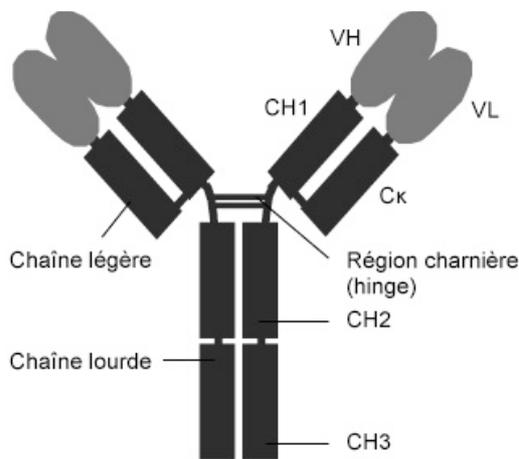


Figure 11: Structure schématique d'une immunoglobuline G.

L'action anti-tumorale des AcM fait intervenir un ensemble de mécanismes dépendant à la fois des caractéristiques de l'antigène ciblé, du type de cancer et de son stade de développement, ainsi que des propriétés intrinsèques de l'AcM. Ces mécanismes font intervenir ou non d'autres acteurs du système immunitaire.

II.B.1.a. Mécanismes anti-tumoraux indépendants du système immunitaire

- Anticorps neutralisant :

Les AcM thérapeutiques peuvent cibler des antigènes membranaires mais également des antigènes solubles. Dans ce dernier cas, on nomme ces AcM, AcM neutralisants. Ces derniers bloquent l'activité biologique de la cible et/ou son interaction avec ces différents partenaires. Par exemple, le bevacizumab (Avastin®) se lie spécifiquement au VEGF dans le milieu extracellulaire et bloque son interaction avec ses récepteurs VEGFR-1 et -2. Cet AcM permet

ainsi d'inhiber l'activité pro-angiogénique du VEGF dans différents cancers tels que les cancers colorectaux ou les cancers du sein métastatique (Ferrara et al., 2004).

- Anticorps à activité antagoniste :

Les AcM thérapeutiques ciblant des récepteurs membranaires peuvent déclencher une activité antagoniste de ces récepteurs. Cette propriété entraîne l'inhibition des voies de signalisation induites par ces récepteurs. Par exemple, le cetuximab (Erbix[®]) en se liant spécifiquement avec une haute affinité à l'EGFR, bloque ainsi la liaison de son ligand l'EGF à son récepteur. Cet AcM empêche également le processus de dimérisation de l'EGFR, processus indispensable à l'initiation de la transduction de signaux de survie. Cet AcM entraîne également l'internalisation du récepteur. Ce phénomène déclenche une régulation négative de son activité et entraîne par conséquent la mort cellulaire de la cellule tumorale cible. Le cetuximab est utilisé chez les patients atteints de cancer colorectaux métastatiques exprimant l'EGFR avec la forme non-mutée du gène K-ras (Baselga, 2001).

- Anticorps agoniste :

Certains AcM induisent leurs effets thérapeutiques grâce à une activité agoniste. Deux anticorps possèdent une action agoniste sur les récepteurs TRAIL-R1 et -R2. Ces récepteurs sont spécialisés dans l'induction de mort cellulaire. Ces AcM sont en phase de développement clinique et ont montré un intérêt dans le mésothéliome pleural malin (Belyanskaya et al., 2007).

II.B.1.b. Mécanismes anti-tumoraux dépendants du système immunitaire

Dès lors qu'un anticorps se lie à un antigène membranaire, il est capable de déclencher des effets cytotoxiques sur la cellule cible par l'intermédiaire d'effecteurs immunitaires soient cellulaires, comme les cellules NK, soient moléculaire par le système complément. Ces activités sont principalement décrites par deux mécanismes nommés ADCC (*Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*) et CDC (*Complement Dependent Cytotoxicity*). Elles sont régulées par le fragment Fc pour "Fragment cristallisable" correspondant aux domaines CH3 et CH2 et de la région charnière (hinge) des IgG (Figure 11) (Ward and Ghetie, 1995). Ces activités sont donc dépendantes de l'isotype de l'anticorps considéré.

- Activité CDC et CDCC

La CDC intervient lorsque le Fc, de l'immunoglobuline fixée à son antigène membranaire, se lie à la protéine C1q du complément. Cette liaison permet d'activer la cascade du complément qui aboutit à la formation du complexe d'attaque membranaire constitué des molécules du complément C5b, C6, C7, C8 et C9. La formation de ce complexe, perce la bicouche lipidique de la membrane plasmique et qui induit des échanges non contrôlés d'ions et de molécules d'eau à travers la membrane plasmique conduisant *in fine* à la lyse de la cellule cible (Gelderman et al., 2004). Le complément peut également permettre le recrutement de cellules effectrices par l'intermédiaire de la molécule iC3b. Cette molécule dérivée du C3b, molécule clé de la cascade du complément, s'ancre au niveau de la membrane plasmique et est reconnue par le récepteur CR3 (CD11b/CD18) exprimé par les cellules effectrices. Ce phénomène est appelé CDCC (*Complement Dependent Cell Cytotoxicity*) (Chan and Carter, 2010; Imai and Takaoka, 2006).

- Activité anti-tumorale induite par le recrutement des récepteurs aux Fc

L'ADCC fait intervenir les récepteurs du fragment Fc des immunoglobulines ou Fc γ R. Cette famille de récepteur compte six membres chez l'homme et quatre chez la souris. Ces récepteurs sont caractérisés par leurs affinités variables pour les différentes sous-classes d'IgG, par leurs expressions sur les cellules immunitaires et par leurs fonctions activatrices ou inhibitrices. Actuellement un seul récepteur inhibiteur a été identifié. Il s'agit du récepteur Fc γ RIIb qui présente une affinité faible pour les immunoglobulines. Le Fc γ RI est le seul récepteur de haute affinité. Les autres récepteurs Fc γ RIIa, Fc γ RIIb et Fc γ RIIIa possèdent des affinités plus faibles et requièrent la fixation d'un complexe immun pour être activés. Ce phénomène permet un contrôle de l'activation des cellules effectrices en limitant les réactions non spécifiques. L'ensemble de ces récepteurs est généralement co-exprimé par les cellules immunitaires. Cependant, il existe des exceptions comme les lymphocytes B qui expriment uniquement le Fc γ RIIb (CD32b) ou les cellules dites "naturelles tueuses" (*NK, Natural Killer*) qui expriment le Fc γ RIIIa (CD16) et le Fc γ RIIc (CD32) (Smith and Clatworthy, 2010). L'ADCC est principalement induite par les cellules NK par l'intermédiaire du récepteur Fc γ RIIIa. En effet, une fois activé, ce récepteur permet le relargage par les cellules de médiateurs cytotoxiques (granzymes, perforines, granulysines). L'action de ces médiateurs déclenche la mort cellulaire de la cible par apoptose. Les cellules tumorales reconnues par les AcM peuvent également être opsonisées puis phagocytées par différentes cellules

immunitaires notamment les macrophages. Ce phénomène nommé ADCP (*Antibody Dependent Cellular Phagocytosis*) est induit principalement par les récepteurs FcγRIIa et FcγRIIIa (Manches et al., 2003). D'autre part, les macrophages activés acquièrent des fonctions cytotoxiques contre les cellules tumorales et sécrètent des cytokines telles que le TNF-α ou l'IL-1, des protéases lysosomales et des métabolites de l'oxygène. L'ensemble de ces évènements entraîne la lyse des cellules tumorales. Ils peuvent également sécréter différentes cytokines qui induisent l'activation et la prolifération des cellules immunitaires telle que l'IL-12 ou l'INF-γ. De plus, des études récentes indiquent que la destruction des cellules tumorales par les AcM peut induire une immunité cellulaire dirigée contre les antigènes tumoraux. En effet, des débris cellulaires peuvent être phagocytés par les cellules dendritiques qui vont ensuite pouvoir présenter ces antigènes tumoraux aux lymphocytes T (Hoffmann et al., 2000). Ces évènements peuvent ainsi participer à l'efficacité anti-tumorale des anticorps thérapeutiques.

Tableau 5: Fonctions et expressions des récepteurs aux IgG humaines (adapté de Bruhns, 2012).

| | FcγRI | FcγRIIa | FcγRIIb | FcγRIIc | FcγRIIIa | FcγRIIIb | FcRn |
|--|------------------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|------------------|
| Fonction | Act | Act | Act | Act | Act | ? | Recyclage |
| Liaison des sous-classes d'IgG humaines | 1 - 3 4 | 1 2 3 4 | 1 (2) 3 4 | 1 (2) 3 4 | 1 (2) 3 4 | 1 - 3 4 | 1 2 3 4 |
| Cellules B | - | - | + | - | - | - | - |
| Cellules T | - | - | - | - | - | - | - |
| Cellules NK | - | - | - | + | + | - | - |
| Monocytes/ Macrophages | + | + | +/- | + | + | - | + |
| Neutrophiles | [+] | + | +/- | + | - | + | + |
| Cellules dendritiques | + | + | + | - | - | - | + |
| Basophiles | - | + | + | - | - | - | - |
| Eosinophiles | - | + | - | - | - | - | - |

Act: Activation ; Inh : Inhibition ; (2) les parenthèses indiquent une très faible affinité de l'IgG ; [+] expression inductible ; NA : non évalué.

- Amélioration des fonctions effectrices des AcM

Les fonctions effectrices des AcM peuvent être optimisées. Ainsi, l'utilisation de l'IL-2, du GM-CSF ou de l'IFN-α permet d'augmenter l'activité anti-tumorale ADCC et ADCP des AcM. Par exemple, l'IL-2 augmente l'ADCC en stimulant la croissance et l'activation cellules NK. Une corrélation entre le nombre de cellules NK et la réponse clinique a été trouvée dans un essai clinique combinant le rituximab et l'IL-2 chez les patients atteints de lymphome non

hodgkinien (LNH) (Gluck et al., 2004). Ces observations ont conduit à la création d'AcM ou de fragments d'AcM fusionnés directement à l'IL-2. Ces protéines de fusion sont appelées immunocytokines (ICK) comme l'ICK L19-IL-2 (anti-domaine EDb de la fibronectine), ou l'ICK hu14.18-IL2 (anti-GD2) (Govindan and Goldenberg, 2010). Ces ICK sont actuellement en cours d'évaluation dans des essais cliniques dans le mélanome et le LNH pour l'ICK L19-IL-2 et le neuroblastome pour l'ICK hu14.18-IL2. Enfin, le niveau de glycosylation du fragment Fc influence l'activité ADCC des anticorps. Les IgG présentent un site de *N*-glycosylation dans le domaine CH2 sur l'asparagine 297 (Asn297). Le motif oligosaccharidique de base comprend un heptamère bi-antennaire, composé de *N*-acétylglucosamine et de mannose. Ce motif peut être modifié par l'ajout d'un nombre variable de fucose, de galactose ou d'acides sialiques. La composition de cet oligosaccharide détermine l'affinité du fragment Fc aux récepteurs FcγR. Par exemple, les IgG hypofucosylées présentent une plus forte affinité pour le récepteur FcγRIIIa des lymphocytes NK. Cette propriété est associée à une activité ADCC supérieure et une réponse anti-tumorale plus forte (Shields et al., 2002; Umaña et al., 1999).

II.B.1.c. Les anticorps renforçant l'activité immunitaire anti-tumorale

Tous les AcM thérapeutiques ne développent pas une activité anti-tumorales par l'action du système immunitaire ou en inhibant des voies de signalisation impliquées dans la prolifération des cellules tumorales. Certains sont utilisés pour cibler des récepteurs régulant négativement l'activité immunitaire. Par exemple, l'ipilimumab (Yervoy®) dirigé contre la molécule de co-stimulation CTLA-4 est utilisé dans le traitement du mélanome métastatique (Grosso and Jure-Kunkel, 2013). La molécule CTLA-4 est exprimée à la surface des lymphocytes T CD4⁺ et transmet, suite à la liaison avec les protéines B7, un signal inhibiteur. L'ipilimumab, agit comme un AcM neutralisant et bloque l'interaction B7-CTLA-4 empêchant ainsi l'action régulatrice des protéines B7. L'utilisation de cet AcM permet d'augmenter significativement la survie des patients atteints de mélanome métastatique (Hodi et al., 2010). Le nivolumab et le lambrolizumab ciblent la protéine PD-1 exprimée à la surface des lymphocytes T et des macrophages activés. La liaison avec son ligand, PDL-1, exprimé par certaines cellules tumorales, bloque l'action anti-tumorale des cellules immunitaires. Ainsi ces AcM permettent de bloquer ces interactions et de réactiver le système immunitaire (Topalian et al., 2012). Ces AcM sont actuellement en cours d'évaluation cliniques dans différents cancers.

II.C. Anticorps monoclonaux de souris dirigés contre le GD2

II.C.1. Obtention d'anticorps ciblant les gangliosides

L'immunisation des souris permet d'obtenir un répertoire d'anticorps sécrétés par les plasmocytes. Depuis les travaux de Köhler et Milstein (Köhler and Milstein, 1975) des clones hybrides, appelés hybridomes, sont obtenus en fusionnant les plasmocytes à des cellules de myélome multiple murin. Ces cellules de myélome sont déficientes en une enzyme de la voie de synthèse des nucléotides par la voie de sauvetage, l'HGPRT (Hypoxanthine-Guanine PhosphoRibosyl Transférase). Cette particularité permet de sélectionner les hybridomes dans un milieu appelé HAT (Hypoxanthine Aminoptérine Thymidine). L'obtention de clones uniques sécrétant des anticorps monoclonaux spécifiques nécessite des étapes de dilutions limites pour atteindre un stade clonal et de criblage pour la spécificité de l'anticorps à sa cible. Ces hybridomes ainsi sélectionnés sont capables de se multiplier et de sécréter des anticorps indéfiniment (Köhler and Milstein, 1975).

L'obtention des AcM anti-gangliosides se heurte principalement au faible pouvoir immunogène de ces molécules. Toutefois, le pouvoir immunogène des gangliosides a été confirmé par la détection d'AcM ciblant certaines formes gangliosidiques chez des patients atteints de mélanome (Portoukalian et al., 1976). Des auto-anticorps ciblant des gangliosides ont également été détectés chez des patients atteints de neuropathies démyélinisantes chroniques pour lesquels il n'est pas rare de détecter des IgM dirigées contre le GM1a ou le GD1b (Willison and Yuki, 2002). Néanmoins, le pouvoir immunogène des gangliosides reste faible. En effet, l'injection répétée d'un ganglioside purifié seul chez la souris ne suffit pas à induire une réponse anticorps par l'animal. Le faible pouvoir immunogène des gangliosides a conduit plusieurs auteurs à utilisation des adjuvants dans leur protocole d'immunisation. Ainsi, l'utilisation de ganglioside purifié adsorbé sur la paroi bactérienne de *Salmonella minnesota R595*, permet d'obtenir une réponse dirigée contre ce ganglioside (Livingston et al., 1989a). Chez l'homme, l'utilisation du bacille de Camette et Guérin montre des résultats similaires (Livingston et al., 1989b). Néanmoins, les réponses observées présentent les caractéristiques d'une réponse humorale primaire : l'isotype majoritaire obtenu est de type d'IgM (et plus faiblement d'IgG3 chez la souris). De plus, les titres sériques AcM sont faibles et la persistance de ces AcM dans le sérum est de courte durée. Les injections de rappel ne permettant pas de réponse secondaire ce qui exclut la formation de lymphocytes T mémoires.

Par ailleurs, ces méthodes nécessitent l'utilisation de gangliosides purifiés en grande quantité ce qui n'est toujours possible.

D'autre part, le pouvoir immunogène d'un ganglioside dépend de l'expression de celui-ci au sein de l'espèce. Ainsi, un ganglioside est d'autant plus susceptible d'être immunogène qu'il est faiblement exprimé (Kawashima et al., 1992). Le pouvoir immunogène d'un ganglioside est également dépendant de son accessibilité et de sa densité à la surface des cellules. Par exemple le GM3, pourtant présent dans la plupart des tissus de différentes espèces, dont la souris, serait plus immunogène à la surface des cellules de mélanome murin B16 (Nores et al., 1987). En effet, en immunisant des souris C57BL/6 avec des cellules B16, ces auteurs ont obtenu une IgM ciblant le GM3. Selon les auteurs, la forte densité de GM3 à la surface de ces cellules serait reliée à une organisation particulière du gangliosides à la surface de ces cellules. Par ailleurs, il semblerait que les gangliosides constitués d'une chaîne oligosaccharide de trois oses soient plus immunogènes que ceux possédant une chaîne plus courtes (Portoukalian, 2000).

Afin, d'augmenter le pouvoir immunogène des gangliosides, différents protocoles d'immunisation ont été développés. Il est ainsi possible d'irradier les cellules afin de les injecter aux animaux ou de les cultiver préalablement en présence d'IFN- γ (Gross et al., 1989; Ravindranath et al., 1989). Il est également possible de stimuler la réaction anti-tumorale chez la souris par injection régulière de PBMC (Cheung et al., 1985). D'autre part, les propriétés moléculaires intrinsèques des gangliosides semblent jouer un rôle important puisque la modification de l'acide sialique par un ester *O*-acétylé pourrait renforcer l'immunogénicité des gangliosides. En effet, l'apparition d'anticorps anti-GD3 chez l'homme immunisé avec des cellules de mélanome serait dépendant de l'expression du GD3 *O*-acétylé sur la cellule tumorales (Ravindranath et al., 1989). Ainsi, le GD3 *O*-acétylé pourrait être à l'origine d'anticorps qui se fixeraient par réactivité croisée sur le GD3. Il n'est pas rare que les anticorps monoclonaux spécifiques d'un ganglioside reconnaissent encore mieux la forme *O*-acétylée (Manzi et al., 1990).

Le pouvoir immunogène des gangliosides dépend donc non seulement de leur structure et de leur mode de présentation mais aussi du répertoire immunologique de l'hôte immunisé. Malgré ces difficultés il est possible d'obtenir des AcM de souris spécifiques de différents gangliosides et notamment contre le marqueur tumoral GD2. Ainsi, au sein du laboratoire, différents AcM de souris ciblant le GD2 ont été obtenus, parmi lesquels les AcM 10B8 (IgG3, κ) et 60C3 (IgG3, κ) (Cerato et al., 1997). Un AcM ciblant la forme *O*-acétylé du GD2 a

également été obtenu, le 8B6 (IgG3, κ) (Cerato et al., 1997). Plusieurs AcM de souris ciblant le GD2 ont été développés en clinique chez l'homme contre le mélanome et le neuroblastome (Tableau 7), c'est le cas du 14G2a (IgG2a, κ) (Mujoo et al., 1989), ou du 3F8 (IgG3, κ) (Cheung et al., 1985). Un AcM anti-GD3 a également été utilisé chez l'homme dans le mélanome, le R24 (IgG3, κ) (Dippold et al., 1980). Un anticorps anti-GM3, le 14F7, est actuellement développé sous forme de vaccin dans le mélanome (Carr et al., 2000; Mazorra et al., 2009). Leur utilisation reste limitée du fait du risque immunologique qu'ils présentent. En effet, l'utilisation de ces anticorps déclenche une réponse immunitaire dirigée spécifiquement contre les AcM de souris, appelée réponse HAMA (*Human Anti-Mouse Antibodies*). De plus, cette réponse immunitaire induit une diminution de l'efficacité de ces AcM.

II.C.2. L'anticorps de souris 3F8

L'AcM de souris 3F8 (IgG3, κ) est le premier AcM anti-GD2 qui a été utilisé en clinique chez des patients atteints de neuroblastome (Cheung et al., 1987). Cet AcM a été obtenu par hyper-immunisation de souris BALB/C par des cellules de neuroblastome (Cheung et al., 1985). Cet AcM possède une affinité (K_d) de 5 nM pour le GD2 (Cheung et al., 2012a) et est décrit pour posséder une réactivité croisée avec le GD2-Oac. Différentes études *in vitro* montrent que cet AcM possède une activité anti-tumorale contre des cellules de neuroblastome et du mélanome. L'action de cet AcM repose sur l'activation du complément humain (Cheung et al., 1988) et des effecteurs cellulaires aussi bien des lymphocytes (Munn and Cheung, 1987), des monocytes (Munn and Cheung, 1989) et des polynucléaires (Hong et al., 2004). L'utilisation du GM-CSF permet d'augmenter l'efficacité anti-tumorale de cet AcM contre des cellules de neuroblastome (Kushner and Cheung, 1989). De plus, l'activité CDC de cet AcM conduit à recruter le iC3b et à induire une activité CDCC par les polynucléaires et les lymphocytes NK exprimant le récepteur CR3 (Hong et al., 2004). Cet AcM peut également déclencher un phénomène de mort cellulaire directe indépendamment du système immunitaire (Cheung et al., 1985).

Le premier essai clinique de phase I utilisant cet AcM montre une rémission complète pour 2 des 8 patients atteints de neuroblastome et une réponse partielle pour 2 des 9 patients atteints de mélanome (Cheung et al., 1987). Différents effets secondaires importants ont été observés notamment une douleur neuropathique sévère, des fièvres et le développement d'urticaire. La DMT est limitée à 50 mg/m²/dose cumulée (Tableau 7). Suite à ces résultats,

un essai clinique de phase II a été réalisé en incluant 16 patients atteints de neuroblastome. Lors de cette étude, l'AcM 3F8 a été administré à la dose de 10 mg/m²/injection (pendant 5 jours consécutifs) et seule une réponse complète a été observée (Cheung et al., 1998). Les effets secondaires observés incluent une douleur neuropathique sévère, des fièvres, de l'urticaire ainsi qu'une réaction anaphylactique liée à une réponse HAMA. Cette réponse HAMA est corrélée négativement avec le taux de survie des patients et donne une première indication de l'intérêt de la vaccination anti-idiotypique pour cibler le GD2 (Cheung et al., 1994a).

Afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique de l'AcM 3F8, un essai clinique de phase II a été mené en combinaison avec le GM-CSF, chez des patients atteints de neuroblastome. Une rémission complète a été observée chez 12 des 15 patients et 3 autres patients ont présenté une amélioration de la survie sans progression de la maladie (Kushner et al., 2001). Une autre étude clinique réalisée chez des patients atteints de neuroblastome a évalué l'efficacité thérapeutique de l'AcM 3F8 injecté seul ou en combinaison avec le GM-CSF et l'acide rétinoïque. Une augmentation de la survie à long terme a été observée chez les patients recevant les trois produits par rapport aux patients recevant l'AcM 3F8 seul (Cheung et al., 2012b). Enfin cette année, ce même groupe confirme l'efficacité de la combinaison 3F8/GM-CSF dans la lutte contre le neuroblastome (Cheung et al., 2014). Selon les auteurs, l'utilisation du GM-CSF induit l'activation des cellules effectrices et permet de renforcer l'activité ADCC de cet AcM. Cependant, il faut noter que le GM-CSF ne dispose pas d'AMM en Europe. D'autres molécules stimulant le système immunitaire, telles que l'IL-2 (Munn and Cheung, 1987) ou des dérivés du β -Glucane (Cheung and Modak, 2002), permettent d'augmenter les propriétés anti-tumorales de l'AcM 3F8 dans des modèles animaux. Un essai clinique de phase I a montré que la combinaison 3F8/ β -Glucane est bien tolérée par les patients et possède une bonne efficacité thérapeutique contre le neuroblastome (Modak et al., 2013). Dans cette étude 11 réponses partielles ont été observées parmi les 24 patients. Cette étude se poursuit par un essai clinique de phase II actuellement en cours aux États-Unis.

D'autre part, les douleurs neuropathiques sévères induites par l'AcM 3F8 observées chez les patients sont un facteur limitant à l'utilisation de l'immunothérapie anti-GD2. La DMT obtenue lors des différents essais cliniques réalisés avec cet AcM est de 100 mg/m²/dose cumulée (Tableau 7). Afin de diminuer le phénomène douloureux induit par le traitement avec le 3F8 et ainsi pouvoir augmenter la DMT un AcM "*heat modified* 3F8" a été développé. Cet AcM, obtenu à partir de l'AcM 3F8 par chauffage, a perdu les fonctions effectrices de l'AcM 3F8 (à l'origine des douleurs) mais conserve sa spécificité ce qui lui permet de se lier

sur les fibres nerveuses (Kushner et al., 2011b). Par conséquent, la pré-injection de ce format d'AcM permet de saturer le GD2 présent sur les fibres nerveuses et donc de diminuer les douleurs neuropathiques. Une DMT supérieure a été mesurée à 160 mg/m²/injection tout en diminuant les analgésiques (Kushner et al., 2011b).

Enfin, une étude récente sur des patients traités avec l'AcM 3F8, montre que la méditation mantra peut être une solution pour diminuer les douleurs (Ahmed et al., 2014).

II.C.3. Les anticorps monoclonaux de souris 14.18 et 14G2a

L'AcM 14.18 (IgG3, κ) a été obtenu par immunisation de souris BALB/C contre des cellules de neuroblastome (Schulz et al., 1984). A partir de l'hybridome 14.18, le variant isotypique 14G2a (IgG2a, κ) a été obtenu (Mujoo et al., 1987, 1989). Cet AcM possède un Kd de 77 nM pour le GD2 et est décrit pour posséder une réactivité croisée avec le GD2-Oac (Cheung et al., 2012a).

L'obtention du 14G2a avait pour objectifs d'augmenter les fonctions effectrices (ADCC, CDC) ainsi que la stabilité de l'AcM 14.18. En effet, la sous-classe IgG2a possède les meilleures fonctions effectrices. Les sous-classes IgG1 et IgG3 étant incapables de déclencher ces activités anti-tumorales immunitaires chez la souris (Bruhns, 2012). De plus, les IgG3 de souris posent des problèmes de stabilité en raison de leur capacité à s'auto-agréger à forte concentration. Ce phénomène peut, cependant, être limité, au laboratoire, par la dilution de l'AcM et l'addition de sel, par exemple, le chlorure de sodium (0,2 M) dans les tampons de purification et de conservation. Néanmoins, la différence d'activité anti-tumorale entre les AcM 14.18 et 14G2a en présence des effecteurs de souris n'est pas observée avec des effecteurs humains. En effet, aucune différence significative de leurs activités cytotoxiques respectives n'a été observée en présence d'effecteurs humains *in vitro* (Mujoo et al., 1989). De façon étonnante cette étude montre que ces AcM développe la même efficacité anti-tumorale, dans un modèle de xénotransfert de cellules de neuroblastome chez la souris NUDE. Cependant, aucune étude n'a permis de déterminer les mécanismes anti-tumoraux *in vivo* observés avec l'IgG3 14.18.

D'autre part, des travaux récents, ont montré que l'AcM 14G2a est capable *in vitro* de déclencher une mort cellulaire indépendamment des effecteurs immunitaires (Doronin et al., 2014; Horwacik et al., 2013; Kowalczyk et al., 2009). Ces études montrent que le traitement, de cellules de neuroblastome, par l'AcM 14G2a induit une mort cellulaire impliquant

l'activation de la caspase 3 et de la kinase aurora A. De plus, cette action cytotoxique de l'AcM 14G2a potentialise l'action cytotoxique de molécules de chimiothérapie comme le topotécan et la doxorubicine (Kowalczyk et al., 2009). Cependant, le mécanisme précis d'induction de la mort cellulaire induite par le traitement avec l'AcM 14G2a n'est pas entièrement décrit. Une étude récente tend à expliquer ce mécanisme *in vitro* (Doronin et al., 2014). En effet, les auteurs décrivent un mécanisme de mort cellulaire principalement par nécrose et plus faiblement par apoptose. Nos études (résultats non communiqués) ainsi que celles d'autre groupe (Cheung et al., 2012a) ont en revanche décrit que cette capacité reste très limitée sur le neuroblastome.

De nombreux essais cliniques de phase I ont été réalisés avec cet AcM chez des patients atteints de neuroblastome ou de mélanome (Tableau 7) (Handgretinger et al., 1992; Murray et al., 1994; Saleh et al., 1992; Uttenreuther-Fischer et al., 1995a). Lors de la première étude une rémission complète a été observé chez 2 des 6 patients évalués atteints de neuroblastome (Handgretinger et al., 1992). Une réponse HAMA a été mise en évidence chez l'ensemble de ces patients et est corrélée à une demi-vie sérique courte de l'AcM (inférieur à 48h) (Uttenreuther-Fischer et al., 1995a). Cette réponse HAMA est en partie, responsable de l'efficacité limitée du traitement. De plus, ces études montrent des effets secondaires importants et notamment l'apparition de douleurs neuropathiques sévères. Ainsi, la DMT de cet AcM est de 100 mg/m²/dose cumulée. Les résultats obtenus par les différentes études cliniques montrent donc une efficacité limitée de cet AcM.

L'AcM 14G2a a également été évalué en combinaison avec de l'IL-2 et/ou du GM-CSF (Frost et al., 1997; Hank et al., 1990, 1994). L'utilisation de l'IL-2 permet théoriquement d'augmenter l'activité ADCC anti-tumorale d'un AcM. Cependant, aucune amélioration significative n'est observée entre les groupes recevant ou non l'IL-2.

II.C.4. Autres anticorps monoclonaux de souris anti-GD2

Bien que les deux AcM décrits précédemment ont largement été utilisés en clinique, d'autres anticorps spécifique du GD2 qui n'ont pas été évalué.

Le plus ancien est une IgM nommée 126. Cet anticorps a été utilisé pour démontrer que le GD2 était impliqué dans les phénomènes d'adhésion à la fibronectine et pour détecter le GD2 dans le sérum de patients (Cheresh et al., 1984a, 1986a; Schulz et al., 1984).

Le ME36.1 (IgG3, κ) a été modifiée en IgG2a et IgG1 tout comme l'AcM 14.18 (Thurin et al., 1987). Cet AcM possède une réactivité croisée avec le GD3. Les études précliniques ont montré que la sous-classe IgG2a de cet AcM inhibe la croissance tumorale ainsi que le développement des métastases *in vitro* et *in vivo* (Iliopoulos et al., 1989). De plus, la cristallisation du fragment Fab de cet AcM a été déterminée. Cependant les travaux d'humanisation n'ont pas permis de développer un candidat anticorps intéressant (Pichla et al., 1997). Toutefois, cet AcM a été utilisé récemment pour obtenir un anticorps bispécifique trifonctionnel, le Triomab[®] Surek (Eissler et al., 2012; Ruf et al., 2012).

D'autre part, l'AcM 220-51 (IgG3, κ) possède une activité pro-apoptotique sur les cellules de cancer du poumon à petites cellules (Fukuda et al., 1998; Furukawa et al., 2006). Celle-ci semble être déclenchée par un changement de conformation des intégrines et la phosphorylation de p38 par l'intermédiaire des molécules FAK (Aixinjueluo et al., 2005). Ces phénomènes peuvent également déclencher l'activation de la cascade des MAPK ERK et JNK (Yoshida et al., 2002). Ces études concluent à un phénomène de mort cellulaire par anoïkis.

Deux autres AcM peuvent également être cités, l'AcM 10B8 (IgG3, κ) et l'AcM 60C3 (IgG3, κ) qui ont été développés par le laboratoire (Cerato et al., 1997). L'AcM 60C3 qui présente une réactivité croisée pour le GD2 *O*-acétylé est capable d'induire une mort cellulaire. Une grande partie de cet AcM (50 %) est rapidement internalisée (en moins de 30 min) après sa liaison au GD2 membranaire (Alvarez-Rueda et al., 2007). L'AcM 10B8, spécifique du GD2 (Kd = 120 nM), induit une mort cellulaire par apoptose ainsi qu'un arrêt de cycle *in vitro* (Cochonneau et al., 2013).

II.D. Anticorps anti-GD2 humanisés

Il existe deux formats d'anticorps humanisés : les anticorps chimériques et les anticorps humanisés proprement dit. La chimérisation a pour principe de substituer les régions constantes de l'AcM de souris par celles d'un AcM humain (Figure 12) (Boulianne et al., 1984; Morrison et al., 1984). Ce format d'AcM permet avant tout de limiter la réponse HAMA chez le patient. De plus, les régions constantes d'origine humaine interagissent mieux avec le composé C1q et les récepteurs Fc γ R, ce qui permet d'allonger la demi-vie sérique de ces AcM et d'augmenter leurs propriétés pharmacologiques par rapport au AcM de souris. Cependant, ces AcM conservent un pouvoir immunogène en raison de leurs régions variables de souris qui peuvent déclencher une réaction immunitaire de type HACA (*Human Anti-Chimeric Antibodies*) responsable de problèmes de tolérance chez l'homme (Hwang and Foote, 2005; Presta et al., 2002). Bien que ce type de réaction soit assez rare, des AcM dits humanisés ont également été développés. Ces AcM sont constitués uniquement des régions hypervariables de souris ou CDR de souris, soit 10% de l'AcM (Figure 12). L'humanisation des AcM est un processus plus complexe que la chimérisation dont la réussite n'est pas garantie. En effet, la simple substitution des CDR de souris, par ceux provenant d'un AcM humain, conduit souvent à des AcM avec une faible affinité pour sa cible voire une perte de spécificité. Par conséquent, des modifications supplémentaires sont souvent nécessaires : mutations ponctuelles dans les CDR, dans les régions charnières (ou FR), ou transfert d'une ou plusieurs FR de souris (Igawa et al., 2011; Wu et al., 1999). Une autre stratégie d'humanisation dite "*variable domain resurfacing*" consiste à produire tout d'abord un AcM chimérique puis à muter certains acides aminés dans les FR de souris pour augmenter le profil humain de cet anticorps (Roguska et al., 1994).

D'autre part, le choix de l'isotype utilisé pour générer ces AcM est très important. En effet, chez l'homme, il existe cinq isotypes et huit sous-classes. Chacun de ces isotypes possède des fonctions naturelles particulières et en conséquence des caractéristiques qui lui sont propres. La sous classe IgG1 est préférentiellement sélectionnée car elle présente une longue demi-vie (21 jours) et les meilleures activités CDC et ADCC (Tableau 6).

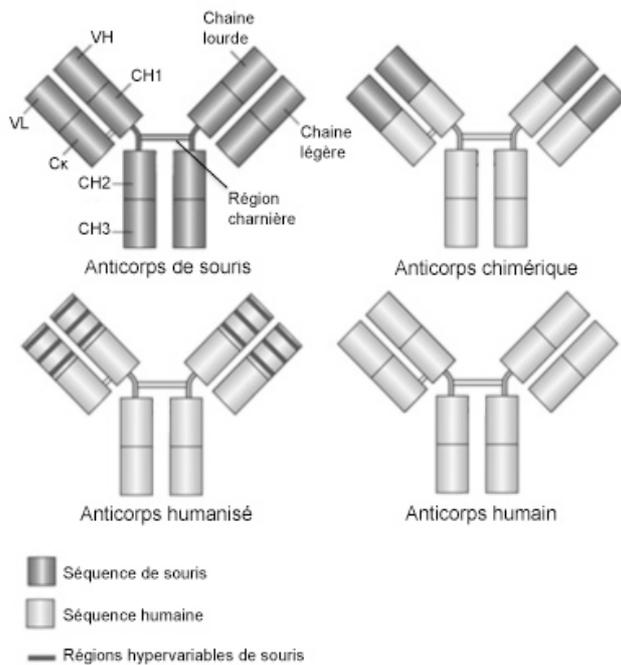


Figure 12 : Les anticorps de souris, chimérique, humanisé et humain (adapté de Carter et al., 2001).

Ainsi, l'humanisation des AcM thérapeutiques permet de diminuer le risque immunologique et d'augmenter les propriétés pharmacologiques par rapport aux AcM murins. Bien que cette étape de développement des AcM puisse devenir critique, elle est actuellement devenue indispensable avant une utilisation de ces AcM chez l'homme.

Tableau 6: Propriétés pharmacologiques des anticorps monoclonaux humains chez l'homme (adapté de Bruhns, 2012).

| | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 |
|-------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Poids moléculaire (kDa) | 146 | 146 | 165 | 146 |
| Demi-vie chez l'homme (jour) | 21 | 21 | 7 | 21 |
| Liaison à la protéine A | +++ | +++ | - | +++ |
| ADCC | +++ | - | ++ | - |
| Opsonisation | +++ | + | ++ | + |
| CDC | ++ | + | +++ | - |

II.D.1. L'anticorps humanisé 3F8

L'ensemble des résultats obtenus avec l'AcM de souris 3F8, a entraîné le développement de cet AcM sous le format chimérique et humanisé (Cheung et al., 2012a). Ces AcM ont été exprimés dans des cellules CHO. Ils ont été développés en utilisant les séquences de deux isotypes d'AcM humains : l'IgG1 et l'IgG4 tous deux associés à une chaîne légère de type kappa. Les quatre AcM obtenus : deux AcM chimériques ch3F8-IgG1 et ch3F8-IgG4 et deux AcM humanisés hu3F8-IgG1 et hu3F8-IgG4 possèdent une affinité similaire à celui de l'AcM de souris 3F8 (environ 10 nM) (Cheung et al., 2012a). En revanche, cette étude montre des différences de potentiel cytotoxique entre ces AcM. En effet, l'isotype IgG4, κ possède de très faible capacité ADCC et CDC et à l'inverse l'isotype IgG1, κ est décrit pour développer une forte réponse ADCC et CDC. Ainsi, les AcM ch3F8- et hu3F8-IgG1 ont une activité ADCC supérieure à celui de l'AcM de souris, environ 300 fois en présence de PBMC. Les AcM ch3F8- et hu3F8-IgG4 ne déclenchent pas de réponse ADCC ni CDC contre les cellules tumorales. Par ailleurs, les AcM ch3F8- et hu3F8-IgG1 déclenchent une activité CDC environ moitié moins efficace que celle de l'AcM des souris. Enfin, dans un modèle de neuroblastome chez la souris NUDE les auteurs montrent que l'AcM hu3F8-IgG1 induit un ralentissement de la croissance tumorale. Comme cité précédemment, dans l'immunothérapie anti-GD2, les douleurs neuropathiques sont imputées à l'activation du complément contre les fibres sensibles des nerfs périphériques (Yuki et al., 1997). Ainsi, l'AcM hu3F8-IgG1 a été retenu en raison de son activité CDC diminuée et de son fort potentiel ADCC pour entrer en phase de développement clinique.

Actuellement deux essais cliniques de phase I sont en cours aux Etats-Unis sponsorisés par le *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* (New York, NY, USA). L'AcM hu3F8 est injecté soit seul (étude # NCT01419834), soit en combinaison avec de l'IL-2 (étude # NCT01662804). Les résultats préliminaires confirment la faible immunogénicité de l'AcM hu3F8 ainsi que l'amélioration de son efficacité anti-tumorale (Cheung et al., 2012a).

II.D.2. L'anticorps chimérique ch14.18

L'AcM ch14.18 (IgG1, κ) fait actuellement l'objet d'une demande d'AMM en cours d'évaluation par la FDA (ch14.18/Sp2/0-1g14) et l'EMA (ch14.18/CHO) (Reichert, 2014b).

Cet AcM chimérique humain/souris a été initialement exprimé dans des cellules murines Sp2/0-Ag14 (Reichert, 2014a). Le développement préclinique et clinique de cet AcM a été réalisé en parallèle de celui de l'AcM de souris 14G2a. L'activité anti-tumorale de l'AcM ch14.18 a été évaluée dans des modèles de mélanome (Mueller et al., 1990) et de neuroblastome (Barker et al., 1991). Ces travaux montrent, dans un premier temps, que l'AcM ch14.18 possède le profil de liaison et les mêmes caractéristiques pharmacocinétiques que l'AcM 14G2a parental, avec néanmoins, une activité ADCC 100 fois plus importante. L'utilisation de l'IL-2 permet également d'augmenter l'activité anti-tumorale de cet AcM, dans un modèle de souris NOD/SCID injectées par des PBMC humaines (Kendra et al., 1999).

Plusieurs, études de phase I (Tableau 7) ont montré que l'AcM ch14.18 possède le même profil neurotoxique que l'AcM 14G2a avec notamment l'apparition de douleurs neuropathiques et de fortes fièvres (Handgretinger et al., 1995; Murray et al., 1996; Yu et al., 1998). De plus, l'apparition d'une cécité transitoire a été observée (Kremens et al., 2002). Uttenreuther-Fischer et al. ont mis en évidence une réponse HACA chez la moitié des patients de leur étude (n=10). Cette réponse diminue significativement la demi-vie de l'AcM de $72,9 \pm 19,8$ h à $31,7 \pm 18,4$ h ($p=0,015$) (Uttenreuther-Fischer et al., 1995b). Cette réponse HACA est depuis corrélée négativement avec le taux de rechute suite à l'immunothérapie (Uttenreuther-Fischer et al., 2006; Hank et al., 2009; Shusterman et al., 2010). Bien que le but de ces études ne soit pas d'évaluer l'efficacité thérapeutique de l'AcM ch14.18, des réponses cliniques partielles ou complètes ont pu être observées. Ces études montrent une DMT limitante de 50 mg/m²/injection (Handgretinger et al., 1995; Yu et al., 1998). Sur la base de ces résultats, un essai clinique de phase II incluant 334 patients atteints de neuroblastome de haut grade a été réalisé (Simon et al., 2004). Dans cet essai, 166 patients reçoivent l'AcM ch14.18. Ce dernier est injecté tous les deux mois pendant un an, avec des cycles de cinq jours à 20 mg/m²/jour. Les auteurs rapportent une augmentation non significative ($p=0,142$) de la survie globale à 5 ans ainsi qu'une diminution de la maladie résiduelle ($p=0,146$). Le suivi à long terme de ces patients montre que l'AcM ch14.18 peut permettre de prévenir les rechutes (Simon et al., 2011). En effet, à 9 ans les taux de survie sans évènement est de $41 \pm 4\%$ et de $32 \pm 6\%$ ($p=0,098$) respectivement pour le groupe ayant reçu le ch14.18 et le groupe sans traitement.

De plus, cette étude indique que le ch14.18 peut être toléré malgré de nombreux effets secondaires déjà observés lors des essais de phase I (Simon et al., 2004, 2005).

Les données précliniques montrent l'importance de l'ADCC dans l'activité anti-tumorales de l'AcM ch14.18. Ainsi, afin d'améliorer son activité anti-tumorale, cet AcM a été injecté chez le patient en combinaison avec du GM-CSF ou de l'IL-2. Une étude de phase I combinant le ch14.18 et le GM-CSF, incluant 19 patients atteints de neuroblastome de haut grade, a montré des résultats encourageants (Tableau 7) (Ozkaynak et al., 2000). En effet, la DMT a été calculée à 40 mg/m²/jour pendant quatre jours consécutifs, et 10 patients ont présenté une réponse clinique. Néanmoins, une réponse HACA a été observée chez tous les patients. Une seconde étude, utilisant l'AcM ch14.18 en combinaison avec le GM-CSF et l'IL-2, incluant 22 patients atteints de neuroblastome, a permis de calculer une DMT de 25 mg/m²/jour et l'absence de réponse HACA (Gilman et al., 2009). En parallèle, deux études de phase I ont été menées sur le mélanome, en combinaison avec de l'IL-2 (Albertini et al., 1997) et du GM-CSF (Murray et al., 1996). Cette dernière étude montre, en présence de GM-CSF, une DMT de l'AcM ch14.18 de 60 mg/m²/jour. Cette valeur est similaire à celle observée dans le neuroblastome. En revanche, l'injection de l'IL-2 diminue fortement la DMT (7,5 mg/m²/jour). Cependant, ce résultat ne semble pas affecter l'effet thérapeutique de cet AcM. Afin d'améliorer la réponse anti-tumorale de l'AcM ch14.18 une immunocytokine a été développée (Navid et al., 2010) (Cf II.E.3.).

Les résultats obtenus lors de ces essais cliniques ont conduit à la mise en place d'une étude de phase III sponsorisée par le COG aux Etats-Unis (Yu et al., 2010). Dans cette étude regroupant 226 patients atteints de neuroblastome de haut grade, l'AcM ch14.18 a été utilisé en combinaison avec de l'IL-2 et du GM-CSF. Tous les patients reçoivent 6 cycles d'acide rétinoïque après greffe de cellules souches hématopoïétiques. Cinq cycles de ch14.18 (25 mg/m²/jour pendant 4 jours consécutifs) sont réalisés en alternant le GM-CSF et l'IL-2. Le groupe de patients traités par l'AcM ch14.18 montre une amélioration significative de sa survie globale à 2 ans (86 ± 4%) par rapport au groupe recevant l'acide rétinoïque seul (75 ± 5%) (p=0,02). La survie sans évènement à 2 ans est également améliorée significativement, respectivement 66 ± 5% et 46 ± 5% (p=0,01). Une douleur neuropathique est une nouvelle fois observée pour 52% des patients. Les auteurs montrent dans cette étude l'intérêt

thérapeutique de l'immunothérapie anti-GD2 pour améliorer la survie des patients atteints de neuroblastome de haut grade (classification selon le COG).

D'autre part, afin de répondre aux recommandations de l'EMA, l'AcM ch14.18 a été produit dans des cellules CHO. En effet, les cellules murines Sp2/0-Ag14 pouvant être porteuses de rétrovirus xénotropes contrairement aux cellules CHO (Shepherd et al., 2003). Ainsi, l'efficacité anti-tumorale de l'AcM ch14.18/CHO a été évaluée dans une étude en comparaison directe avec l'AcM ch14.18/Sp2/0-Ag14 et également un AcM ch14.18 produit dans des cellules NS0 (Zeng et al., 2005). Les auteurs montrent une efficacité similaire, *in vitro* et *in vivo*, entre les trois productions d'AcM et soulignent une nouvelle fois l'importance de l'ADCC dans l'efficacité thérapeutique de cet AcM. Cet AcM ch14.18/CHO doit cependant être évalué en clinique comme une nouvelle molécule. Une étude de phase I a été mise en place en Europe sponsorisée par la SIOPEN (Société d'oncologie pédiatrique du réseau européen du neuroblastome; *Society of Paediatric Oncology European Neuroblastoma Network*). Lors de cette étude, incluant 16 patients atteints de neuroblastome de haut grade, la DMT a été déterminée à 100 mg/m²/dose cumulée (Ladenstein et al., 2013). Cette étude montre les mêmes effets indésirables que le ch14.18/Sp2/0-Ag14. Cet AcM est actuellement développé par la société Apeiron.

II.D.3. L'anticorps humanisé hu14.18K322A

Les résultats obtenus par Yu et al., montrent l'intérêt thérapeutique de l'immunothérapie avec l'AcM ch14.18 pour améliorer la survie des patients atteints de neuroblastome de haut grade (classification selon le COG). Cependant les effets secondaires observés sont un frein à l'utilisation clinique de cet AcM. Les douleurs neuropathiques induites par les AcM anti-GD2 sont expliquées par l'activation du complément suite à la fixation des AcM sur le GD2 exprimé par les fibres nerveuses des nerfs périphériques (Yuki et al., 1997). Un modèle développé chez le rat a permis d'évaluer ces effets (Sorkin et al., 2002). Dans ce modèle, les AcM anti-GD2 déclenchent un mécanisme douloureux appelé allodynie. L'allodynie est définie comme une douleur déclenchée par une simulation qui est normalement indolore. Par exemple de légères variations de température ou le simple geste d'effleurer doucement la peau peuvent alors être douloureux. A ce jour, aucun antalgique ne permet de lutter contre ce phénomène. Ainsi, afin de réduire ces effets douloureux, l'AcM hu14.18K322A (IgG1, κ) a été

développé. Cet AcM est exprimé dans des cellules de myélome de rat Y2B/0. Ces cellules, dérivées de l'hybridome de rat YB2/3HL, ont été sélectionnées pour leur capacité à sécréter des AcM hypofucosylés avec des capacités ADCC améliorées (Navid et al., 2010; Shields et al., 2002). La séquence de cet AcM possède une mutation ponctuelle à l'intérieur du domaine CH3, la lysine 322 est substituée par une alanine (K322A) (Sorkin et al., 2010). Cette mutation a permis de diminuer *in vitro* la capacité de recrutement du C1q sans altérer les capacités ADCC et d'affinité de cet AcM, par rapport à l'AcM ch14.18. De plus, cette étude montre la diminution de l'allodynie, mesurée chez le rat (Sorkin et al., 2010).

Basé sur ces résultats un essai clinique de phase I a été mise en place incluant 38 patients atteints de neuroblastome de haut grade (Navid et al., 2014). Les auteurs rapportent que la DMT de cet AcM est supérieure à celle obtenue avec les autres AcM anti-GD2 ; 60 mg/m²/jour soit 2,4 fois plus que l'AcM ch14.18 pour un cycle classique d'injection de 28 jours (Yu et al., 2010). Néanmoins, dans ces conditions, 25 patients déclenchent des réactions douloureuses importantes comme décrit précédemment. D'autre part, 2 réponses partielles et 4 réponses complètes ont été observées. Un second essai clinique de phase I est actuellement en cours aux Etats-Unis concernant différents cancers : le mélanome, l'ostéosarcome, le sarcome d'Ewing (étude # NCT00743496).

II.E. Les anticorps monoclonaux conjugués ciblant le GD2

Afin d'augmenter l'efficacité thérapeutiques des AcM il est possible de les conjuguer à différentes molécules permettant d'augmenter l'activité anti-tumorale. Ainsi, des AcM ont pu être conjugués avec des cytokines, des radioéléments, des agents toxiques tels que les drogues de chimiothérapies ou encore des liposomes et des nanoparticules (Govindan and Goldenberg, 2010).

Historiquement, la radio-immunothérapie (RIT) a montré son efficacité dans le traitement des LNH en utilisant l'Iode 131 ou l'Yttrium 90 (émetteurs de particules β) (Buchegger et al., 2008; Cheson and Leonard, 2008). Cependant, les autres cancers s'avèrent difficile à traiter que ce soit sur des tumeurs solides très souvent radorésistantes ou sur des cellules trop dispersées pour un traitement avec des émetteurs de particules β . Ainsi de nouveaux radioéléments (Astate 211, Bismuth 213, Luthétium 177) sont développés et semblent capables d'apporter une activité efficace à l'anticorps tout en limitant les effets secondaires (Barbet et al., 2009). Atlab Pharma développe un AcM couplé au ^{177}Lu , ciblant le PSMA dans le cancer de la prostate. La phase II a montré une bonne réponse clinique a de tout les patients (n=47) avec une ciblage de 93,6% des sites métastatiques (Tagawa et al., 2013). Une autre approche de RIT a été développée appelée préciblage. Cette approches utilise un premier AcM non radiomarké, spécifique de l'antigène cible, couplé avec de l'avidine ou avec un AcM anti-haptène. Après lavage de l'anticorps en excès, une seconde molécule avec une haute affinité pour l'avidine ou un haptène est injectée chargée avec l'élément radioactif. Ces techniques augmentent sensiblement l'efficacité de ciblage et ont été appliquées avec un certain succès (Goldenberg et al., 2006).

Les AcM couplés à des drogues (ADC) peuvent être classés en deux grandes catégories d'ADC : les immunotoxines et les immunocytokines (ICK) (Govindan and Goldenberg, 2012). Les premières sont couplées avec une drogue ou une toxine qui possède une activité cytotoxique sur la cellule cible, c'est le cas de l'Adcetris® et du Kadcyla® qui sont respectivement couplés avec la monométhylauristatine E (MMAE) et l'emtasine (T-DM1). Ces AcM se lient spécifiquement au CD30 et au récepteur HER2 exprimé à la surface des cellules tumorales. Après internalisation la drogue est délivrée au sein même de la cellule. Ces ADC permettent donc de limiter les effets cytotoxiques des drogues sur le tissu sain par ciblage des cellules tumorales mais aussi d'injecter une plus grande quantité de ces drogues. Les ICK sont des AcM couplées à une cytokine qui est capable de stimulée le système

immunitaire afin d'augmenter les capacités effectrices des AcM, telle que l'IL-2. Actuellement de nombreuses ICK soit en phase d'essais cliniques et montre une bonne tolérance accompagnée d'une efficacité thérapeutique, notamment dans le cadre du mélanome et du neuroblastome (Beck and Reichert, 2014; Govindan and Goldenberg, 2012).

II.E.1. Les anticorps monoclonaux anti-GD2 radioconjugués

Le neuroblastome est une tumeur radio-sensible. Ainsi, l'AcM murin 3F8 a été radio-marqué avec du ^{131}I (Cheung et al., 1986). Les auteurs ont démontré, dans un modèle animal, une régression tumorale supérieure avec l'AcM ^{131}I -3F8 par rapport à celle de l'AcM 3F8 nu. Des réponses cliniques ont été également observées lors d'une étude de phase I/II chez des patients atteints de neuroblastome (Cheung et al., 1994b). Cette approche semble également prometteuse pour traiter les formes métastatiques cérébrales (Kramer et al., 2010). Cependant, la demi-vie longue des AcM peut être une limite à l'utilisation de la RIT. Pour répondre à cette limite, le scFv 5F11, obtenu à partir d'une IgM ciblant le GD2, a été utilisé dans une approche de pré-ciblage (Cheung et al., 2004). L'utilisation du scFv 5F11 permet la pénétration spécifique et rapide d'un élément radioactif couplé à la biotine, le ^{111}In -DOTA (Cheung et al., 2004). La demi-vie de cette molécule est d'environ 10h. Cependant le caractère immunogène de la streptavidine est un facteur limitant dans ces études. L'utilisation du ^{111}In -DOTA et de l'AcM hu3F8 couplé à un scFv anti-DOTA est actuellement développé comme alternative à la streptavidine (Ahmed and Cheung, 2014).

D'autre part plusieurs AcM ciblant le GD2 sont utilisés à des fins diagnostics, tels que le ^{131}I -3F8, le ^{131}I -14G2a ou encore le ^{99}Tc -ch14.18 (Navid et al., 2010).

II.E.2. L'anticorps de souris 14G2a immunoconjugué

L'AcM 14G2a a été couplé par des liaisons covalentes à différentes drogues pour former des immunotoxines. Ainsi, dans une première étude, le 14G2a a été couplé à la chaîne A de la ricine (Wargalla and Reisfeld, 1989). Cette dernière est connue pour être cytotoxique, en bloquant la synthèse des protéines par inhibition de l'action des ribosomes. Une augmentation spécifique de l'effet cytotoxique de la ricine sur les cellules de mélanome exprimant le GD2 a ainsi été observée. De plus, il est proposé que l'internalisation de l'immunotoxine contourne la voie lysosomale et que son clivage n'entraîne ni la dégradation du 14G2a ni celle de la ricine.

De plus, l'AcM 14G2a a également été couplé avec de la gelonine (Mujoo et al., 1991). L'action de cette dernière est similaire à celle de la ricine. Cette étude montre une augmentation de plus de 1000 fois de l'activité cytotoxique de l'immunotoxine par rapport à la gelonine seule. Enfin, une immunotoxine 14G2a-calichéamycine a été évaluée dans un modèle syngénique de métastase hépatique de neuroblastome (Lode et al., 1998). La calichéamycine possède une action similaire à celle des anthracyclines et agit comme intercalant à l'ADN. Les auteurs montrent une augmentation significative ($p < 0,01$) de l'efficacité anti-tumorale de cet ADC par rapport au 14G2a seul, ou à la combinaison 14G2a/calichéamycine. A ce jour, le mécanisme d'internalisation de ces immunotoxines demeure encore incompris.

II.E.3. Immunocytokine ch14.18-IL2

Les données précédentes montrent l'importance de l'ADCC dans l'activité anti-tumorale de l'AcM ch14.18 ainsi que le rôle de l'IL-2. Dans ces conditions une ICK formée par la liaison de l'IL-2 sur l'acide carboxylique terminal de la région constante du ch14.18 a été développée (Gillies et al., 1992). Les données précliniques montrent que l'ICK ch14.18-IL-2 possède les mêmes propriétés de liaison au GD2 que l'AcM ch14.18 et développe une meilleure activité anti-tumorale que la combinaison ch14.18/IL-2 dans des modèles de mélanome et de neuroblastome (Becker et al., 1996a, 1996b; Gillies et al., 1993; Hank et al., 1996; Lode et al., 1997). Les cellules NK peuvent être activées à la fois par les FcRs et par leur récepteur à l'IL-2. De façon très intéressante, il a été montré que l'activation des lymphocytes T par l'ICK pouvait être indépendante du CMH et sous le contrôle direct du récepteur à l'IL-2 (Gillies et al., 1993; Hank et al., 1996; Weil-Hillman et al., 1989). Ces données suggèrent que l'utilisation d'une ICK dans l'immunothérapie anti-GD2 est un traitement efficace qui doit encore être développé.

II.E.4. Immunocytokine hu14.18-IL2

Différentes études ont montré qu'une réponse HACA est induite contre l'AcM ch14.18. Afin de réduire le potentiel immunogène de l'ICK ch14.18, une ICK a été obtenue avec l'AcM humanisé (Neal et al., 2004). L'ICK hu14.18-IL-2 possèdent les mêmes caractéristiques anti-tumorales que l'ICK ch14.18-IL2 *in vitro* et *in vivo*. Des études cliniques de phase I ont été réalisées chez des patients atteints de mélanome et le neuroblastome aux Etats-Unis (King et

al., 2004; Osenga et al., 2006; Ribas et al., 2009). Les résultats montrent des DMT pour le neuroblastome de 12 mg/m²/jour et pour le mélanome de 7,5 mg/m²/jour (Tableau 7). Bien qu'aucune réponse clinique n'ait été observée, les données obtenues par l'immuno-monitoring des patients suggèrent une réponse anti-tumorale. A la suite de cette étude, un essai clinique de phase II a été mis en place (Shusterman et al., 2010). Cette étude a été réalisée sur 37 patients pédiatriques atteints de neuroblastome et 16 patients adultes atteints de mélanome. Dans le groupe atteint de mélanome, une réponse partielle est mesurée et quatre patients ont vu la stabilisation du cancer. Deux méthodes de mesure ont été utilisées pour mesurer de la réponse contre le neuroblastome. La première, sur des critères classique de radiologie ne montre aucune réponse. La seconde, montre cinq réponses complètes (n = 23), par MIBG scan (*meta-iodo benzylguanine scanning*) et par observation histologique de la moelle osseuse. Ces observations suggèrent que cette thérapie permet de limiter la maladie résiduelle (Navid et al., 2010). D'autre part, des études précliniques récentes montrent une meilleure efficacité de l'injection en intra-tumorale, par rapport à l'injection intraveineuse, de l'hu14.18-IL2 sur des modèles murins de neuroblastome et de mélanome (Johnson et al., 2008). Cependant, il n'est pas certain que cette modalité d'injection permette de réduire la maladie résiduelle retrouvée au niveau de la moelle osseuse.

Les effets secondaires observés lors de ces essais cliniques sont les mêmes que ceux observés avec les AcM anti-GD2 et suite à l'injection d'IL-2. Ainsi, les patients présentent un phénomène douloureux, des fonctions hépatiques anormales et un syndrome de fuite capillaire systémique. Afin de limiter ses effets secondaires l'IL-2 peut être remplacée par l'IL-15 qui possède une activité similaire sans effets secondaires. De plus, l'activité de l'IL-15 semble prolongée dans le temps par rapport à celle de l'IL-2 (Berger et al., 2009; Steel et al., 2012). Ainsi, l'IL-15 a été étudiée pour une application en immunothérapie. Il a été montré que le complexe composé de IL-15 et de la chaîne α de son récepteur (IL-15R α) possède une meilleure activité anti-tumorale que l'IL-15 seule (Epardaud et al., 2008; Stoklasek et al., 2006). De façon plus précise la protéine de fusion composée de l'IL-15 et de la sous-unité sushi de l'IL-15R α , nommé RLI, montre une meilleure activité fonctionnelle que l'IL15 seule ou que la combinaison avec l'IL-15R α (Mortier et al., 2006). Plus récemment, l'utilisation de l'AcM chimérique c.60C3 couplé au RLI montre une meilleure activité anti-tumorale que le c.60C3 seul dans un modèle murin (Vincent et al., 2013).

II.F. Autres stratégies d'immunothérapie ciblant le GD2

II.F.1. Les anticorps bispécifiques

Comme leur nom l'indique, les anticorps bispécifiques possèdent deux spécificités antigéniques différentes sur la même molécule. Divers formats d'anticorps bispécifiques existent et peuvent être utilisés en fonction de l'objectif recherché. Ces anticorps peuvent reconnaître deux épitopes différents sur le même antigène ou deux antigènes tumoraux différents sur la même cellule tumorale (Chames and Baty, 2009; Choi et al., 2011). Ces anticorps permettent d'augmenter la spécificité et l'efficacité anti-tumorale. Ainsi, un anticorps ciblant à la fois Erb2 et le CEA a montré un meilleur ciblage que l'utilisation combiné des deux F(ab')₂ des AcM parentaux (Dorvillius et al., 2002). Cependant, la meilleure utilisation de la double spécificité est une reconnaissance d'un antigène tumoral et du CD3. Le choix du CD3 permet de recruter et d'activer les lymphocytes T indépendamment des autres signaux d'activation et notamment du CMH. De ce fait ces anticorps sont nommés BiTE (*Bispecific T-cell Engaging*) et sont développés par la société Amgen (Baeuerle and Reinhardt, 2009). Différents BiTE ont été développés dans ce but et montre une meilleure efficacité anti-tumorale que l'AcM parental seul. L'étude la plus remarquable a été menée sur des patients atteints de LNH avec un BiTE ciblant le CD19 et le CD3 montrant une régression tumorale à faible dose, inférieure à 0,6 mg/m²/jour (Bargou et al., 2008).

Dans le cadre du ciblage du GD2, un anticorps bispécifique 3F8 et okt3 (anti-CD3) a été développé (Yankelevich et al., 2012). Cette étude montre une augmentation significative et spécifique de l'activité anti-tumorale, *in vitro*, de cet anticorps par rapport à l'AcM 3F8 seul. Il a également été mesuré une augmentation significative de la sécrétion de chemokines et de cytokines pro-inflammatoires par des PBMC. Dans ce modèle, les PBMC sont dans un premier temps, mis en contact avec l'anticorps bispécifique avant le traitement des cellules tumorales.

Un BiTE constitué par le scFv du 5F11, obtenu à partir d'une IgM ciblant le GD2, a récemment été développé. Ce BiTE montre une efficacité anti-tumorale, *in vivo*, dans des modèles de neuroblastome et de mélanome (Cheng et al., 2014).

II.F.2. La Technologie Triomab®

Un autre format d'anticorps est apporté par les anticorps bispécifiques tri-fonctionnels selon la technologie Triomab® développée par la société Trion Pharma. Ces anticorps associent deux fragments d'AcM monovalent. Le premier une IgG2b de rat dirigée contre le CD3 et le second une IgG2a murine ciblant un antigène tumoral (Figure 13). Il a été montré que cette structure chimérique possède une faible affinité pour le récepteur inhibiteur FcR γ RIIb tout en conservant une forte affinité pour les récepteurs activateurs FcR γ RI, FcR γ IIa et FcR γ III exprimé sur les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques ou les cellules NK (Shields et al., 2001; Zeidler et al., 2000). Ces caractéristiques ont permis dans plusieurs études d'améliorer la réponse anti-tumorale en levant l'inhibition induite par le FcR γ RIIb. De plus, le ciblage du CD3 entraîne l'auto-activation des lymphocytes T. Ces lymphocytes T entraînent également l'activation des autres cellules du système immunitaire. L'ensemble de ces caractéristiques déclenche donc une réponse anti-tumorale faisant intervenir de multiples effecteurs du système immunitaire.

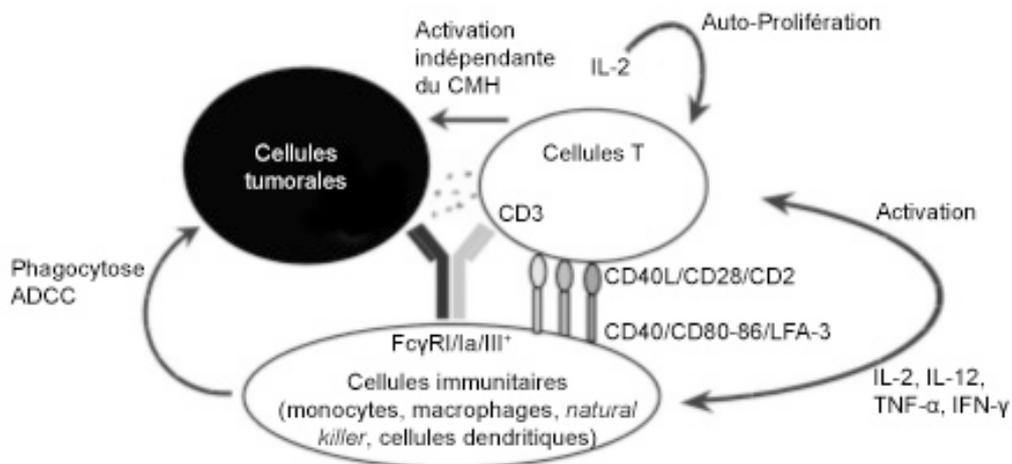


Figure 13 : Mécanisme d'action proposé pour les Triomab (adaptée de Chelius et al., 2010).

Plusieurs Triomab® ont été développés dont un est actuellement sur le marché, le catumaxomab/removab. Ce dernier cible la molécule EpCam et est utilisé pour le traitement d'ascite maline au niveau du péritoine (Chelius et al., 2010). Des Triomab® ciblant le CD20 (FBT05) et le récepteur HER2 (ertumaxomab) sont également en cours d'évaluation préclinique (Boehrer et al., 2011; Diermeier-Daucher et al., 2012). Cette approche a été développée avec un AcM anti-GD2, le ME36.1. Le Triomab® Surex (Entomba pour sa version ciblant le CD3 humain) a montré son efficacité sur dans un modèle murin de

mélanome (Eissler et al., 2012; Ruf et al., 2012). Cependant, la faible affinité pour le GD2 du à la monovalence de ce Triomab[®] limite son utilisation en thérapie.

II.F.3. Chimeric Antigen Receptor anti-GD2

Les récepteurs chimériques CAR (*Chimeric Antigen Receptors*) sont des récepteurs recombinants qui possèdent à la fois les fonctions de reconnaissance et de spécificité antigénique des anticorps et la fonction d'activation de la réponse anti-tumorale des lymphocytes T. Ces récepteurs sont constitués d'un scFv directement greffé sur un récepteur dont la signalisation active la réponse immunitaire naturellement (Figure 14). Les lymphocytes exprimant les CARs sont obtenus, *ex vivo*, par transfection stable suivie d'une phase de culture permettant la transduction puis une étape d'expansion clonale. Le principe est de générer plus rapidement et plus efficacement une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique sans recrutement des cellules immunitaire de l'organisme. En effet, dès que le scFv se lie à sa cible, la signalisation du récepteur sur lequel il est greffé est activé, déclenchant ainsi une réponse immunitaire sans les étapes de reconnaissance HLA et les signaux de co-stimulation. De plus, ces cellules CARs peuvent exercer une action anti-tumorale sur le long terme (Sadelain et al., 2013).

Il existe trois générations de CAR (Figure 14). Dans la première génération, les CAR sont constitués des domaines d'activation du CD3- ζ ou du FcR γ , et du domaine transmembranaire du CD8, CD4, CD25 ou CD16. Bien que l'activation du CD3- ζ soit suffisante pour déclencher l'activité lytique des lymphocytes T cytotoxique, l'intensité du signal est très faible et ne permet pas de déclencher les autres fonctions des lymphocytes, notamment la sécrétion des cytokines activatrices comme l'IL-2 (Brocker and Karjalainen, 1995). C'est probablement ce qui explique les réponses thérapeutiques limitées lors des premiers essais chez l'animal. En effet, l'activité anti-tumorale de ces CAR était limitée dans le temps ou à une modalité d'administration au niveau du site tumoral (Cooper et al., 2003; Hwu et al., 1995). Ces résultats ont entraîné le développement de la seconde génération de CAR. Celle-ci est constituée à la fois des signaux d'activation et de co-stimulation. Parmi les molécules de co-stimulation utilisées, on retrouve le CD28, ICOS, 4-1BB (CD137) ou encore OX40. Cette génération de CAR est capable d'induire la sécrétion d'IL-2, de déclencher une prolifération clonale et montre une réponse anti-tumorale efficace sur le long terme dans des modèles animaux et chez l'homme (Finney et al., 1998; Maher et al., 2002; Milone et al.,

2009; Savoldo et al., 2011). Cependant, différentes études montrent que ces observations ne peuvent pas être généralisées puisque l'antigène ciblé ainsi que sa densité cellulaire, l'affinité du CAR ou encore la structure même du CAR influencent très fortement leur efficacité (Sadelain et al., 2013). Enfin, une troisième génération possédant au moins deux domaines de co-stimulation et un domaine d'activation a été décrite. Cette génération montre une meilleure réponse anti-tumorale que la génération précédente (Carpenito et al., 2009; Pulè et al., 2005; Wang et al., 2007). De surcroît, les effets secondaires observés avec cette stratégie thérapeutique semble être faible (Dotti et al., 2009; Sadelain et al., 2013). Actuellement, les essais cliniques sont réalisés avec des CAR.CD19 pour traiter la leucémie aigüe lymphoïde pré-B.

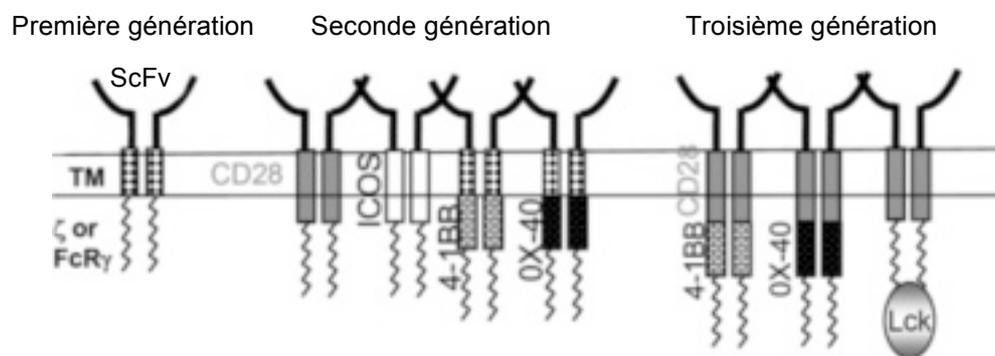


Figure 14 : Représentation schématique des trois générations de CAR (adaptée de Sadelain et al., 2013). A gauche : la première génération de CAR, couplée uniquement aux récepteurs activateurs CD8 ou CD3 sur des cellules T; Au milieu : la seconde génération de CAR avec une double signalisation pour déclencher des signaux d'activation et de co-stimulation tels que le CD28, ICOS, 4-1BB, OX-40; A droite : la troisième génération comprenant les signaux d'activation couplés à plusieurs signaux de co-stimulation sur des cellules T ou NK.

Plusieurs études ont montré l'intérêt thérapeutique de CAR ciblant le GD2 (CAR.GD2) (Esser et al., 2012; Heczey and Louis, 2013, 2013; Kailayangiri et al., 2012; Liebsch et al., 2013; Liu et al., 2013; Louis et al., 2011; Yvon et al., 2009). Une meilleure réponse anti-tumorale CAR.GD2 par rapport à l'AcM parental seul a été mise en évidence chez l'animal dans différents cancers : le neuroblastome, le mélanome ou le sarcome d'Ewing. Une étude menée sur 19 patients atteints de neuroblastome de haut grade a été menée en utilisant deux types de CAR.GD2 de troisième génération, couplés au scFv 14G2a, des CAR-CTL préparés à partir de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques du virus Epstein-Barr, et des CAR-ATC, préparés à partir de cellules T activées. Trois des 11 patients présentant une maladie active ont obtenu une rémission complète. La persistance des deux types de CAR au delà de 6 semaines chez les patients est associée au meilleur résultat clinique. Par ailleurs, la durée de la

persistance de ces CAR est corrélée avec le pourcentage de cellules mémoires (CD45RO⁺CD62L⁺) (Louis et al., 2011). Les auteurs soulignent la capacité de ces CAR à éradiquer complètement le neuroblastome et à augmenter la survie à long terme ainsi que leurs intérêts pour le ciblage efficace de la maladie résiduelle. Une étude plus récente montre les améliorations thérapeutiques apportées par les CAR.NKT anti-GD2 par rapport au CAR.T dans un modèle murin de neuroblastome (Heczey et al., 2014). Les CAR.NKT.GD2 présentent une meilleure activité anti-tumorale que les CAR.T et une diffusion restreinte au site tumoral sans infiltration du foie ou des poumons.

II.F.4. Vaccination anti-idiotype

La vaccination anti-idiotype a pour objectif de faire produire naturellement au système immunitaire des anticorps ciblant un antigène particulier sélectionné. Cette approche est une des approches immunologiques prometteuses dans la lutte contre le cancer. Plusieurs études ont montré l'efficacité des vaccins anti-idiotype dans des modèles animaux (Bhattacharya-Chatterjee et al., 2002). Quelques AcM anti-idiotypes ont été testés lors d'essais cliniques et ont démontré des résultats encourageants, notamment le racotumomab dans le mélanome et le cancer du poumon (Gómez and Ardigo, 2012; Ladjemi, 2012).

Ainsi, la vaccination anti-idiotype a été développée pour lutter contre les cancers exprimant le GD2. L'anticorps anti-idiotype 1A7 (IgG1, κ) dirigé contre l'AcM 14G2a, imite un épitope glucidique du GD2 (Sen et al., 1998). Plus récemment, un second AcM anti-idiotype, le ganglidiomab, a été obtenu par immunisation de souris BALB/C par l'AcM 14G2a (Lode et al., 2013). Cet AcM possède une affinité (K_d) de 10 nM pour les AcM ch14.18 et hu14.18 et 50 nM pour l'AcM 14G2a. L'injection chez la souris de ces AcM entraîne la sécrétion d'AcM ciblant le GD2 qui déclenchent une réponse anti-tumorale spécifique contre des cellules de mélanome et de neuroblastome. Le ganglidiomab a également permis de démontrer l'existence d'une réponse HACA chez les patients traités par l'AcM ch14.18/CHO (Siebert et al., 2013, 2014).

Tableau 7 : Principaux essais cliniques réalisés avec les anticorps monoclonaux ciblant le GD2.

| Anticorps | Type d'essai | Cancer (nombre de patients) | Schéma thérapeutique | MTD (mg/m ² /dose cumulée) | Réponses observées | Références |
|----------------------|--------------|-----------------------------|--|---------------------------------------|---|----------------------|
| 3F8 | Phase I | NB (8), Me (9) | 5-100 mg/m ² - 2 à 4 jours consécutifs | 50 | 2 CR NB, 2PR Me | Cheung et al., 1987 |
| 3F8 | Phase II | NB (16) | 10 mg/m ² /dose totale- 5 jours consécutifs | - | 1 CR NB | Cheung et al., 1998 |
| 3F8+ GM-CSF | Phase II | NB (19) | cycle de 17 jours : 3F8 (iv) 100 mg/m ² /cycle jours 6 à 10 et jours 13 à 17 GM-CSF jours 1 à 5, 11 et 12. | 100 | 15 CR | Kushner et al., 2001 |
| 3F8 + GM-CSF + AR | Phase II | NB (169) | 3 groupes A(43) reçoit 3F8 seul; B(41) reçoit 3F8, GM-CSF (iv), AR après greffe de cellules souches; C(85) reçoit 3F8, GM-CSF (sc), AR dont 46 après greffe de cellules souches. 4 cycles de 17 jours toutes les 2 à 4 semaines puis toutes les 6 à 8 semaines sur 24 mois 3F8: 100mg/m ² /cycle. | 100 | A 5 ans, la survie globale est améliorée pour chaque groupe A=49%, B=61%, C=81%. | Cheung et al., 2012 |
| 3F8 + beta-glucan | Phase I | NB (24) | 10 mg/m ² /jours - 10jours consécutifs | - | 11 PR | Modak et al., 2013 |
| 3F8 + HM3F8 + GM-CSF | Phase I | NB (30) | cycle de 17 jours (Kushner et al. 2001) 3F8 après pré-injection de HM3F8 | 160 mg/m ² /jour | 2 CR, 7 PR | Kushner et al., 2011 |
| | | | | | | |
| hu3F8 | Phase I | en cours | - | - | - | NCT01419834 |
| hu3F8 + IL2 | Phase I | en cours | - | - | - | NCT01662804 |

| Anticorps | Type d'essai | Cancer | Schéma thérapeutique | MTD (mg/m ² /dose cumulée) | Réponses observées | Références |
|-----------------------------|--------------|------------------------|--|---------------------------------------|---|-----------------------------------|
| 14G2a | Phase I | NB (9) | 100-400 mg/m ² dose totale - 5 à 10 jours consécutifs | 100 | 2 CR, 2 PR | Handgretinger et al., 1992 |
| 14G2a | Phase I | Me (12) | 10-120 mg/m ² /dose totale - 8 jours consécutifs | 80 | 1 PR | Saleh et al., 1992 |
| 14G2a | Phase I | NB (5), Me (11), OS(2) | 50, 100, et 200 mg/m ² /dose totale - 5 jours consécutifs | 100 | 6 PR NB (2), Me (3), OS (1) | Murray et al., 1994 |
| 14G2a | Phase I | NB (14), OS (1) | 100 à 250 mg/m ² /dose totale - 5 jours consécutifs | - | - | Uttenreuther-Fischer et al., 1995 |
| 14G2a + IL2 + GM-CSF | Phase I/IB | NB (33) | 10 à 300 mg/m ² /dose totale - 5 jours consécutifs | 100 | 1 CR, 8 PR | Frost et al., 1997 |
| | | | | | | |
| ch14.18 | Phase I | Me (13) | 5-100 mg/m ² /dose totale -2 jours consécutifs | 100 | NR | Saleh et al., 1992 |
| ch14.18 | Phase I | NB (9) | 20-50 mg/m ² /jours - 5 jours consécutifs | 250 | 2CR, 2PR | Handgretinger et al., 1995 |
| ch14.18 | Phase I | NB (10), OS (1) | 10-200 mg/m ² /dose totale - 1 à 4 jours consécutifs tout les 2 à 3 semaines | - | 5 PR NB | Yu et al., 1998 |
| ch14.18 | Phase II | NB (334) | 100 mg/m ² /dose totale - 5 jours consécutifs tous les 2 mois (6 cycles) | - | A 5 ans, la survie globale est améliorée de 46,8% à 69,5% | Simon et al., 2004 |
| ch14.18 (CHO) | Phase I | NB (16) | 50-150 mg/m ² /dose totale - 5 jours consécutifs | 100 | 2 PR | Landestein et al., 2013 |
| ch14.18 + GM-CSF | Phase IA/IB | Me (16) | 15-60 mg/m ² /dose totale (1 jour) | 60 | NR | Murray et al., 1996 |
| ch14.18 + GM-CSF | Phase I | NB (19) | 40-200 mg/m ² /dose totale - 4 jours consécutifs | 160 | 5 CR, 5 PR | Ozkaynak et al., 2000 |
| ch14.18 + GM-CSF + IL2 | Phase I | NB (25) | 80-160 mg/m ² /dose totale - 4 jours consécutifs | 100 | Non évalué | Gilman et al., 2002 |
| ch14.18 + GM-CSF + IL2 + AR | Phase III | NB (226) | 2 groupes A(137) traité par le ch14.18, B(108) non traité par le ch14.18 5 cycles de 4 jours toutes 4 semaines ch14.18: 100mg/m ² /cycle. | 100 | A 2 ans la survie globale est améliorée de 75% à 86% | Yu et al., 2010 |

| Anticorps | Type d'essai | Cancer | Schéma thérapeutique | MTD (mg/m ² /dose cumulée) | Réponses observées | Références |
|----------------------|--------------|----------|--|---------------------------------------|--------------------|-------------------------|
| hu14.18-IL2 | Phase I | Me (33) | cycle de 28 jours 0,8-7,5 mg/m ² /jour. 3 jours consécutifs | 7,5 mg/m ² /jour | NR | King et al., 2004 |
| hu14.18-IL2 | Phase I | NB (27) | cycle de 28 jours 2-14,4 mg/m ² /jour. 3 jours consécutifs | 12 mg/m ² /jour | NR | Osenga et al., 2006 |
| hu14.18-IL2 | Phase II | NB (37) | cycle de 28 jours 12 mg/m ² /jour. 3 jours consécutifs | - | 5CR | Shusterman et al., 2010 |
| hu14.18-IL2 | Phase II | Me (14) | cycle de 28 jours 6 mg/m ² /jour. 3 jours consécutifs | - | 1PR | Shusterman et al., 2010 |
| | | | | | | |
| hu14.18K322A | Phase I | NB (38) | 1 cycle 2-70 mg/m ² /jour - 4 jours consécutifs | 240 | 4CR, 2PR | Navid et al., 2014 |
| hu14.18K322A | Phase I | en cours | - | - | - | NCT00743496 |
| | | | | | | |
| CAR anti-GD2 (14G2a) | Phase I | NB (19) | 3 groupes A(10) reçoit 1,2.10 ⁷ cellules/m ² , B(6), 5.10 ⁷ cellules/m ² , C(3), 3,1.10 ⁷ cellules/m ² . | Évaluée mais non identifiée | 3CR, 3PR | Louis et al., 2011 |

NB: neuroblastome; Me: mélanome; OS: ostéosarcome; AR: acide rétinoïque
CR: rémission complète; PR: rémission partielle, NR: pas de réponse

Partie II

Travaux expérimentaux

Introduction

L'efficacité de l'immunothérapie anti-GD2 dans le neuroblastome n'est plus à démontrer (Yu et al., 2010). Cependant, la réactivité croisée des AcM ciblant le GD2 exprimé par les fibres sensibles de nerfs périphériques reste un réel frein à leur utilisation clinique. Les travaux réalisés avec l'AcM murin 8B6, ciblant spécifiquement le GD2-Oac, ont montré une distribution similaire du GD2 et du GD2-Oac sur les cellules tumorales sans réactivité croisée sur les fibres nerveuses. Par ailleurs, cette étude a montré que cet AcM induit une augmentation de la survie dans un modèle syngénique de lymphome chez la souris C57BL/6 de façon comparable à l'AcM 14G2a anti-GD2 (Alvarez-Rueda et al., 2011). Ces résultats ont conduit le laboratoire à souhaiter caractériser les propriétés pro-apoptotiques de l'AcM 8B6 et déterminer l'implication de l'apoptose induite par cet AcM dans son efficacité anti-tumorale *in vivo*. Nous montrons que l'IgG3 8B6 induit l'apoptose des cellules tumorales et bloque la croissance tumorale dans un modèle de xélogreffe de cellules de neuroblastome chez la souris NOD-SCID.

Dans le cadre du développement clinique de cet AcM, nous avons produit un AcM chimérique IgG1 humain/souris, nommé c.8B6. Nous avons évalué l'efficacité anti-tumorale de cet AcM en le comparant à l'AcM ch14.18 dans des modèles de neuroblastome. Nous montrons ainsi que l'AcM c.8B6 présente une efficacité anti-tumorale *in vivo* comparable à celle de l'AcM ch14.18 et démontrons que cet AcM, contrairement à l'AcM ch14.18, n'induit pas d'allodynie dans un modèle de rat.

D'autre part, un résultat inattendu montre l'absence de propriété apoptotique de l'AcM chimérique. Afin d'optimiser les propriétés anti-tumorales de cet AcM, nous avons souhaité identifier le ou les domaines de l'IgG3 de souris 8B6 impliqués dans ses propriétés apoptotiques. Notre démarche nous a permis de produire différents d'AcM chimériques ciblant le GD2-Oac et ayant une activité pro-apoptotique.

Enfin, nous avons cherché à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour l'immunothérapie anti-GD2-Oac. Plusieurs études immunohistochimiques ont ainsi été réalisées.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont permis la publication de deux articles scientifiques, présentés dans les chapitres I et II, et le dépôt de deux brevets entre Atlab Pharma et l'université de Nantes, présentés dans les chapitres III et IV.

Chapitre I

Propriétés apoptotiques des anticorps monoclonaux ciblant le marqueur gangliosidique tumoral GD2 *O*-acétylé

Article 1 : Cell cycle arrest and apoptosis induced by O-acetyl-GD2-specific monoclonal antibody 8B6 inhibits tumor growth *in vitro* and *in vivo*.

Les travaux concernant les deux AcM anti-GD2 développés aux Etats-Unis suggèrent un rôle déterminant de l'activité ADCC dans leurs propriétés anti-tumorales. Néanmoins, des travaux récents suggèrent que ces AcM peuvent également induire l'apoptose des cellules tumorales. Avant mon arrivée, les activités ADCC et CDC de l'AcM 8B6 ont été caractérisées *in vitro* sur différentes lignées tumorales exprimant le GD2-Oac (Alvarez-Rueda et al., 2011). Une inhibition de la viabilité des cellules tumorales en l'absence des effecteurs immunitaires a également été mise en évidence suggérant une activité pro-apoptotique de l'AcM 8B6. Les propriétés anti-tumorales de cet AcM ont été démontrées dans un modèle syngénique de lymphome chez la souris C57BL/6 (Alvarez-Rueda et al., 2011). L'absence de récepteur Fc γ capable de lier les IgG3 chez la souris a conduit le laboratoire à caractériser les propriétés pro-apoptotiques de l'AcM 8B6 et déterminer l'implication de l'apoptose induite par cet AcM dans son efficacité anti-tumorale *in vivo*.

Nous nous sommes ainsi intéressés à des aspects plus fondamentaux concernant les propriétés pro-apoptotiques des AcM anti-GD2-Oac que nous mettons en évidence ici. Nous montrons que l'IgG3 8B6 induit l'apoptose des cellules tumorales par la voie endogène de la mitochondrie dépendante des caspases. De plus, l'IgG3 8B6 bloque la croissance tumorale *in vivo* dans un modèle de xénogreffe de cellules de neuroblastome chez la souris NOD-SCID. Cette souche de souris est caractérisée par une déficience complète des lymphocytes NK, un dysfonctionnement des macrophages et une absence de complément circulant. Nos résultats semblent démontrer que les propriétés pro-apoptotiques de l'AcM 8B6 sont suffisantes pour expliquer son efficacité thérapeutique *in vivo*.



ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Cancer Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/canlet

Cell cycle arrest and apoptosis induced by *O*-acetyl-GD2-specific monoclonal antibody 8B6 inhibits tumor growth *in vitro* and *in vivo*



Denis Cochonneau^{a,d}, Mickaël Terme^b, Alexis Michaud^a, Mylène Dorvillius^b, Nicolas Gautier^a, Jihane Frikeche^{a,c,d}, Nidia Alvarez-Rueda^a, Gwenola Bougras^a, Jacques Aubry^{a,c}, François Paris^{a,d}, Stéphane Birklé^{a,c,d,*}

^a Inserm U. 892, Centre de Recherche en Cancérologie de Nantes-Angers, Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes, 8 quai Moncoussu, F-44007 Nantes cedex 1, France

^b ATLAB Pharma, Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes, 8 quai Moncoussu, F-44000 Nantes, France

^c Université de Nantes, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 9 rue Bias, F-44035 Nantes cedex, France

^d CNRS 6299, Centre de Recherche en Cancérologie de Nantes-Angers, Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes, 8 quai Moncoussu, F-44007 Nantes cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 August 2012

Received in revised form 19 December 2012

Accepted 17 January 2013

Keywords:

Ganglioside

O-Acetyl-GD2

Cell cycle arrest

Apoptosis

Therapeutic antibody

Immunotherapy

ABSTRACT

O-Acetyl-GD2 ganglioside is suitable antigen for tumor immunotherapy with specific therapeutic antibody. Here, we investigate the anti-tumor activity of *O*-acetyl-GD2-specific monoclonal antibody 8B6 on *O*-acetyl-GD2-positive tumor cells. The results indicated that mAb 8B6 induced growth inhibition of *O*-acetyl-GD2-expressing tumor cell lines *in vitro* with features of cell cycle arrest and apoptosis. Monoclonal antibody 8B6 treatment was also very effective in suppression of tumor growth in mice by reducing the proliferation index and increasing the apoptotic index. Such a study represents a useful framework to optimize immunotherapy with *O*-acetyl-GD2-specific antibody in combination with chemotherapeutic agents.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The disialoganglioside GD2 has been used as a target for antibody-based immunotherapy because of its high level of expression on neuroectoderm-derived human cancers, such as neuroblastoma [1], melanoma [2], and small cell lung carcinoma (SCLC) [3]. A recent phase III clinical trial has shown that a combination of anti-GD2 ch 14.18 antibody and cytokines significantly improved outcome in patients with neuroblastoma [4]. Although these results are very encouraging, one of the major drawbacks of anti-GD2 mAbs is their toxicity. The infusion is frequently associated with important neurotoxic effects in patients [5,6]. Furthermore subsequent to treatment with anti-GD2 monoclonal antibody some patients have developed sensorimotor polyneuropathy [7]. The proposed cause of this dose-limiting toxicity is the binding of anti-GD2 mAbs to GD2 expressed on normal nerve cells followed by complement activation [8]. Hence, they limit the dose of anti-GD2 mAbs that can be given and therefore its clinical efficacy.

* Corresponding author at: Centre de Recherche en Cancérologie de Nantes-Angers, Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes, UMR Inserm U. 892 - CNRS 6299, 8 quai Moncoussu, BP 7021, 44007 Nantes Cedex 1. Tel.: +33 (0) 228 08 03 00; fax: +33 (0) 228 08 02 04.

E-mail address: Stephane.Birkle@univ-nantes.fr (S. Birklé).

We have previously reported that *O*-acetylated GD2 ganglioside (*O*AcGD2) is not expressed by peripheral nerve fiber and that mAbs against *O*AcGD2 as effective as anti-GD2 mAbs in the suppression of the growth of tumor cells [9]. Our data suggest that mAbs against the *O*-acetyl derivative of GD2 ganglioside may offer treatment options with reduced adverse side effects, thereby allowing dose escalation of antibodies. These encouraging results have further stimulated our interest in defining the mechanisms underlying the anti-tumor effects of *O*AcGD2-specific mAb. In case of mAbs specific for GD2 ganglioside *in vitro* and *in vivo* studies have convincingly shown that GD2-specific mAb can mediate cell (ADCC)- and complement (CDC)-dependent cytotoxicity of cultured human melanoma cells [10–13]. Most recently, however, GD2-specific mAbs have also been shown to have a direct inhibitory effect on the growth of GD2-expressing tumor cells [14–17]. Additionally, the GD2-expressing tumor cells' sensitivity to chemotherapeutic drugs was markedly enhanced by GD2-specific antibody [17,18].

Tumors that express GD2 concomitantly express its *O*-acetyl derivative *O*AcGD2 [9,19]. On the other hand, previous works reported that *O*-acetylation of tumor-associated ganglioside, such as GD3, sustains survival of proliferating tumor cells [20] and reduces their sensitivity to pro-apoptotic agents [21,22]. Thus far

no evidence suggests a role for OAcGD2 in tumor cells. Hence, we investigate the functions of OAcGD2 and compare them with the known biological properties in tumor cells that express these two gangliosides. For this purpose we used mAb 8B6, which recognizes OAcGD2 ganglioside only, and mAb 10B8, which is specific for GD2 and does not bind to OAcGD2 ganglioside [23]. We demonstrate here that binding of mAb 8B6 directly inhibits the proliferation of OAcGD2 positive tumor cells in culture *via* cell cycle arrest and apoptosis *in vitro*. Furthermore, studies using the syngeneic OAcGD2 positive EL4 C57BL/6 mouse tumor model showed that 8B6-induced tumor growth inhibition was accompanied by a marked increase of the tumor apoptotic index as well as a significant decrease of the tumor proliferative index. We also observed anti-tumor responses in tumor-bearing NOD/SCID mice, which largely lack functional NK cells and circulating complement. These results further demonstrate that anti-OAcGD2 mAb 8B6 may function independently from complement dependant cytotoxicity- and NK cell dependant cytotoxicity- mediated activities. Such studies might help to optimize immunotherapy with OAcGD2-specific antibodies alone or in combination with chemotherapeutical approaches.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

The human neuroblastoma IMR5 cell line was generously provided by Dr. Santos Susin (Inserm U. 872, Paris, France). Other cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). The mouse lymphoma cell line EL4 was grown at 37 °C in 5% CO₂ in DMEM with 10% heat-inactivated FCS, 100 units/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. The human neuroblastoma IMR32, human neuroblastoma IMR5, human glioma U87MG, human small cell lung cancer H82 and human ovarian adenocarcinoma OVCAR-3 cell lines were grown at 37 °C in 5% CO₂ in RPMI 1640 with 10% heat-inactivated FCS, 100 units/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. A mouse neuroblastoma Neuro 2a, used as a negative control cell line was cultured as described above.

2.2. Antibodies and serum

Anti-OAcGD2 mAb 8B6 (mouse IgG3, kappa) and anti-GD2 mAb 10B8 (mouse IgG3, kappa) were obtained previously in our laboratory [23]. An IgG3 control antibody specific to GD3 ganglioside (clone 4F6) was used as a negative control (generously provided by Dr. Jacques Portoukalian, Department of Dermatology, Edouard Herriot Hospital, University of Lyon, Lyon, France) [23]. Monoclonal antibodies 8B6, 10B8, and 4F6, were purified from hybridoma supernatants using Protein A affinity column chromatography. The purity of mAb preparations was verified by SDS-PAGE analysis. Anti-Ki-67 (clone TEC-3) and anti-rat polyclonal antibody were purchased from DakoCytomation (Glostrup, Denmark). Antibody to active caspase-3 (clone L-18) was purchased from Santa cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA, USA) and anti-beta-actin antibody (clone C4) was obtained from Millipore (Billerica, MA, USA).

2.3. Flow-cytometric analysis

Analysis of cell surface OAcGD2- and GD2-expression on tumor cell lines was done by indirect immunofluorescence, respectively. Tumor cells (5×10^5 cells) were incubated with either mAb 8B6, mAb 10B8 or mAb 4F6 (control antibody), at 10 µg/mL for 30 min at 4 °C in 0.1% BSA-PBS. After reaction with the fluorescein-isothiocyanate-conjugated F(ab')₂ fragment of goat anti-mouse IgG (H + L) as a second antibody (Jackson, Immunoresearch, Soham, UK) for 30 min at 4 °C, cell fluorescence was analyzed using a FACScan flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and the CellQuest software (BD Biosciences).

2.4. Scatchard analysis

Monoclonal antibodies were labeled with I-125 (Perkin Elmer, Billerica, MA) using the iodogen method, and were purified on a Sephadex PD10 column (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). The binding assays for Scatchard analysis were performed as previously described [24]. Briefly, serial dilutions of labeled antibody were incubated for 1 h at 4 °C with 10^6 cells. Cell-bound radioactivity was separated from free antibody by centrifugation through a dibutyl phthalate oil cushion in microfuge tubes. Pellet cells and supernatant activity were then separately measured using a gamma counter (Wallac, Finland). Non-specific binding, defined as the bound ¹²⁵I-labeled antibody in the presence of a 100-fold excess of unlabeled

antibody, was subtracted at each concentration of labeled antibody. The binding data were analyzed on Prism software (GraphPad Prism Software, La Jolla, CA, USA) according to a one-site equilibrium binding equation.

2.5. Cell growth inhibition

Cell viability was measured using the MTT assay [25]. Briefly, 1×10^5 cells suspended in 200 µL were incubated for 24 h at 37 °C, 5% CO₂. Monoclonal antibodies were diluted in 100 µL of specific medium and added to each well of 96-well microplates to give the final concentrations of 40, 20, 10, 5, 2.5, and 1.25 µg/mL. After incubation for 24 h at 37 °C, 5% CO₂, 10 µL of methylthiazole tetrazolium salt stock solution (5 mg/mL, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) were added to each well and the plates incubated at 37 °C for 4 h. Then, 100 µL of 10% Triton X-100 were added and the plates incubated for 10 min at 37 °C for color development. Optical density was recorded at 570 nm on a Multiskan reader (Thermo Electron, Waltham, MA, USA).

2.6. Determination of cell morphology

Tumor cells (5×10^5 cells) were seeded in flat bottom 12-well plates, and incubated with either mAb 8B6, 10B8 or control 4F6 antibody for 72 h at 37 °C, 5% CO₂. Cell cultures were imaged with a LEICA DFC295 digital camera coupled to a Leica microscope (DM IRB). Images were stored as TIFF files with Adobe Photoshop.

2.7. Cell cycle analysis

Cells (1×10^5 cells) were plated in 96-well microplates in specific medium for 24 h at 37 °C 5% CO₂ and then treated for 24 h at 37 °C with 40 µg/mL of 8B6 and controls mAbs, respectively. After reaction, cells were incubated with fluorescein-isothiocyanate-conjugated F(ab')₂ fragments of goat anti-mouse IgG (Jackson) as described above. They were then permeabilized with 100 µg/mL digitonin and stained in the dark for 30 min with 10 µg/mL 7-AAD staining solution and then analyzed by flow cytometry using a FACScan flow cytometer and Flowjo6 software (BD Biosciences). Cell cycle was analyzed on 7-AAD histograms (FL3) and compared OAcGD2 positive and negative cell populations determined by FITC staining (FL1).

2.8. Western blotting

For antibody treatments, EL4 cells (1×10^5 cells) were dispensed in 96-well culture plates in serum containing medium and then treated with 50 µg/mL mAb 8B6 and control IgG3 for 24 h. After treatment, cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline, and solubilized in a lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% Nonidet P-40, 10% glycerol, 50 mM NaF and protease inhibitors). Soluble proteins (50 µg/lane) were separated on SDS-polyacrylamide gel, electrotransferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF, Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were incubated with 5% milk-phosphate-buffered saline for 2 h, washed with phosphate-buffered saline containing 0.05% Tween 20, and the incubated with antibodies reactive with p21 (clone SX118, BD Biosciences), with phosphorylated-p38 (clone D3F9, Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA), with p38 (p38MAPK polyclonal antibody, Cell Signaling), with BAX (clone N-20, Santa Cruz Biotechnology, Inc), and beta-actin (Sigma Aldrich). Secondary horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse monoclonal antibody and goat anti rabbit (Jackson) were used for detection of bound primary antibody and bands were visualized by enhanced chemiluminescence (Pierce, Rockford, IL, USA).

2.9. Apoptosis induction by mAb 8B6

Cells (1×10^5 cells) were plated in 96-well microplates in specific medium during 24 h at 37 °C 5% CO₂ and then treated for 24 h at 37 °C with 40 µg/mL of 8B6 and control mAbs, respectively. After reaction, cells were incubated with fluorescein-isothiocyanate-conjugated F(ab')₂ fragments of goat anti-mouse IgG (Jackson) as described above. They were then permeabilized with 100 µg/mL digitonin and stained for 30 min with Apo2.7-PE conjugated antibody and analyzed by flow cytometry using a FACScan flow cytometer and Flowjo6 software (BD Biosciences). Apoptotic cells were analyzed on Apo2.7 (FL2) histograms and compared to OAcGD2 positive and negative cell populations determined by FITC staining (FL1). In some experiments EL4 cells were exposed to antibodies during 24 h in the presence or absence of 3 µmol/L z-VAD-fmk caspase inhibitor before staining with Apo2.7-PE conjugated antibody.

To determine whether death induced in EL4 cells line by mAb 8B6 was caspase-dependent, cells were incubated with the OAc GD2-specific Ab (40 µg/mL) in the absence or presence of z-VAD-fmk caspase inhibitor (R&D systems) (40 µM). To ensure the inhibitory effect, before the addition of mAb 8B6, cells were pre-incubated with the inhibitor for 60 min. After 1 h incubation, cells (1×10^4 /well) were seeded in 96-well plates and the number of viable cells was analyzed 24 h in MTT assay.

2.10. Cytochrome C release assay

Cells were harvested and fractionated by the ApoAlert Cell Fraction kit (Clontech Laboratoires, Palo Alto, CA). Lysates from cytosolic and mitochondria fractions (20 µg protein per lane) were separated by 15% SDS-PAGE and then transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF, Millipore, Billerica, MA, USA). The membrane was analyzed by Western blot analysis with cytochrome C- and COX 4-specific antibodies.

2.11. Murine tumor model

C57BL/6 or NOD/SCID mice, aged between 8 and 12 weeks, were purchased from Charles River (L'Arbresle, France). Mice were housed at the animal facility of Inserm U892 (Nantes, France). This facility is approved by the French Association for Accreditation of Animal Care Laboratories and is maintained in accordance with the regulations and standards of the Inserm Institute and the French Department of Agriculture. The EL4 cell line is a syngeneic murine lymphoma in C57BL/6 mice that was previously used by Zhang et al. as a target for anti-GD2 antibodies [26]. The human neuroblastoma IMR5 tumors were grown in NOD-SCID mice. Mice were injected subcutaneously with tumor cells (1×10^4 EL-4 cells or 1×10^6 IMR5 cells) on the right flank. Subcutaneous tumor growth was measured at indicated days after tumor implantation using the formula [Volume mm³ = (length) × (width²) × 0.5]. In the IMR5 human neuroblastoma-bearing NOD/SCID mice, antibody (500 µg/mouse) was given i.v. when the tumor volume was ~0.1 cm³. In the EL-4 T-lymphoma-bearing C57BL/6 mice two study approaches were used: (a) 24 h after tumor inoculation, groups of six mice received i.v. 70 µg per dose of 8B6 mAb, control IgG3 mAb, or PBS twice a week for 3 weeks and (b) the antibody (500 µg/mouse/i.v.) treatment was started after subcutaneous tumor was palpable at ~0.1 cm³.

2.12. Ki-67 immunostaining

Immunohistology studies were performed on mAb 8B6- and 10B8-treated tumor nodules. Control IgG3- and PBS-treated tumors were used as controls. Tumor samples were removed and fixed in 10% buffered formalin. Sections of 5-µm thickness were cut, mounted onto Superfrost Plus slides (Microm International, Walldorf, Germany), and deparaffinized in a 60 °C oven for 30 min followed by 2 × 5 min xylene rinses and 2 × 100% ethanol rinses. Sections were then rehydrated in distilled water and microwaved for 10 min in preheated pH 9.0 citrate buffer, followed by another incubation for a further 20 min at room temperature. Endogenous peroxidase was quenched before saturating with H₂O₂ blocking solution (Dako). Sections were stained with rat anti-mouse Ki-67 mAb (clone TEC-3, Dako). Bound antibody was detected by stepwise incubation with biotinylated polyclonal rabbit anti-rat antibody (Dako), followed by streptavidin-horseradish peroxidase complex (Immunotech, Marseille, France). Slides were then developed with diaminobenzidine, counterstained with hematoxylin. Positive and negative stained cells were counted on a minimum of 10 randomly selected 800 µm² fields at 100× magnifications for each tumor (n = 6) per treatment group. Data were expressed as proliferation index (PI) using the formula: (cells positive for Ki-67 staining/total cells) × 100.

2.13. TUNEL immunostaining

Similarly, the extent of apoptosis in the tumors was measured by TUNEL using the TUNEL enzyme detection kit (Roche, Basel, Switzerland) following the manufacturer's protocol. The slides were counterstained with hematoxylin.

2.14. Anti-ganglioside mAbs immunostaining

Cellular reactivities with anti-OAcGD2 8B6 and anti-GD2 10B8 mAbs were studied in a direct immunoperoxidase technique using biotinylated mAb 8B6 and biotinylated mAb 10B8 on snap-frozen tumor sections. Ten micrometer-sections were cut, fixed in acetone, and stained with specific biotinylated antibody for 1 h. After rinsing, the APAAP complex (Dako) was applied. Then, the bound mAbs were detected with ImmPACT DAB chromogen substrate solution (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Biotinylated mAb 4F6 was used as a negative control. Slides were counter-stained with hematoxylin before immunocytological evaluation. Staining was graded as positive or negative according to the presence or absence of immunoreactivity, respectively.

2.15. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism software (GraphPad Prism Software). Data are shown as mean ± standard error. Differences between untreated and treated groups in the *in vitro* experiences were analyzed by Student's *t* test. A value *p* < 0.05 was considered to be significant. The comparison of the doubling time between the different groups was performed by the non-parametric Wilcoxon signed-rank test. Differences were considered statistically significant when *p* < 0.05.

3. Results

3.1. Binding of mAbs 8B6 and 10B8 to cell lines

We previously reported the *K_D* value of mAb 8B6 (32 nM) and the amount of OAcGD2 molecules present at the cell surface of IMR32, H82, OVCAR-3, U87MG, EL4, and Neuro 2A cell lines used in this study (Table 1)[9]. We further calculated here by Scatchard analysis the amount of OAcGD2 molecules expressed by IMR5 cells to be 5.5×10^6 sites. We next calculated mAb 10B8's *K_D* value for GD2 to be 120 nM, using ¹²⁵I-labeled mAb 10B8 (data not shown). The six studied cell lines revealed different levels in the number of 10B8 binding sites, ranging from 0.02×10^6 to 7.9×10^6 (Table 1). The amount of GD2 molecules was found to be comparable to that of mAb 8B6 binding sites, with 7.9×10^6 sites/IMR32 cells, 4.1×10^6 sites/IMR5 cells, and 0.61×10^6 sites/EL-4 cell. The H82 cell line showed an intermediary binding site number of about 0.14×10^6 . The OVCAR-3 and U87MG cells showed less than 0.05×10^6 sites/cell, whereas Neuro2a cells express neither OAcGD2 nor GD2 ganglioside.

3.2. Reduction of tumor cell viability *in vitro*

The lack of ADCC and CDC activities of mAb 8B6 against OAcGD2-expressing EL4 cells with mouse effectors was reported earlier [9]. Unsurprisingly, the mouse IgG3 mAb 10B8 did not show any ADCC and CDC activities with mouse effectors cells or complement as well (data not shown). Our previous *in vitro* cell culture experiments revealed, however, that mAb 8B6 specific for OAcGD2 may inhibit EL-4 tumor cells viability *in vitro* [9]. Here, we compare mAb 8B6's cell viability inhibition properties to that of mAb 10B8 specific for GD2 in other OAcGD2/GD2-expressing cell lines (Fig. 1B). To this end, we incubated tumor cells with either mAb 8B6 or mAb 10B8 over a period of 72 h, and determined cell viability using an MTT assay. The control 4F6 antibody and the Neuro 2a cell line were included to ensure that the observed result was antigen-specific. The inhibitory effect on IMR5 cell viability of both mAbs 8B6 and 10B8 was dose- and time-dependant (data not shown) and became statistically significant at 24 h post treatment at 10 µg/mL (*p* < 0.001) when compared to mAb 4F6-treated cells (Fig. 1A). In agreement with the microscopic data (Fig. 1C), the highest inhibitory effect was exerted by the antibody concentration of 40 µg/mL. This treatment resulted in an ~40% decrease in the number of viable IMR5 cells, as determined by MTT assay, comparing to the number of cells growing in the culture medium (Fig. 1A). Consequently, this concentration of mAb was selected for further experiments. Viability of IMR32 cells was also significantly reduced by either mAb 8B6 or mAb 10B8 compared to control IgG3 (*p* < 0.0001 for mAb 8B6 at 40 µg/mL, *p* < 0.05 for mAb 10B8 at 40 µg/mL) (Fig. 1B). Similar to the effect of mAb 8B6 on EL4 cells, H82 cells were significantly sensitive to mAb 8B6 treatment (*p* < 0.05 for mAb 8B6 compared to control) (Fig. 1B). On the other hand, mAb 10B8 did not induce a significant viability reduction (Fig. 1B). As expected, the OVCAR-3 and U87MG cell lines that expressed low levels of OAcGD2 failed to show a significant viability reduction (Fig. 1B), even when treated with 100 µg/mL antibody (data not shown). As expected, neither mAb 8B6 nor mAb 10B8 suppressed the growth of the non-expressing Neuro2-a cell line (Fig. 1B).

Interestingly, treatment with mAb 8B6 or with mAb 10B8 also induced change in IMR5 morphology. Cells incubated with either mAb 8B6 or mAb 10B8 adopted a spherical shape and formed conglomerates, which were either loosely attached to the bottom of the wells or floated in the medium (Fig. 1C). The morphological changes became obvious 18 h after post-antibody addition and

Table 1
Binding properties of mAb 8B6 and 10B8 on tumor cell lines.

| Cell lines | | OAcGD2 expression (10 ⁵ /cell) ^{a,b} | GD2 expression (10 ⁵ /cell) ^{a,c} |
|---------------------------|---------|--|---|
| Origin | Name | | |
| <i>Human</i> | | | |
| Neuroblastoma | IMR32 | 55 ± 8 | 79 ± 9 |
| | IMR5 | 46 ± 6 | 41 ± 6 |
| Small cell lung carcinoma | H82 | 16 ± 0.1 | 14 ± 3 |
| | OVCAR-3 | 2 ± 0.2 | 3 ± 0.1 |
| Glioma | U87MG | 2 ± 0.1 | 2 ± 0.1 |
| <i>Mouse</i> | | | |
| Lymphoma | EL4 | 5.3 ± 0.4 | 6.4 ± 3 |
| Neuroblastoma | Neuro2a | 0 | 0 |

^a Determined by Scatchard analyses using.^b ¹²⁵I-labeled mAb 8B6.^c ¹²⁵I-labeled mAb 10B8.

continued for the next 3 days (data not shown). Similar change in the morphology of the adherent OAcGD2/GD2-expressing tumor IMR32 and H82 cells lines was also observed (data not shown). In EL-4 cells, treatment with either mAb 8B6 or mAb 10B8 induced cell aggregation (data not shown). The process was dose-dependent and noticeable at the concentration of 20 µg/mL. In agreement with the viability data, the biggest difference in morphology of cells incubated with mAb 8B6 was observed at the 40 µg/mL concentration (data not shown). Morphological

changes in the low OAcGD2/GD2-expressing OVCAR 3 and U87MG were only seen at the highest mAb 8B6 concentration of 100 µg/mL (data not shown). Overall, these results show the ability of mAb 8B6 and mAb 10B8 to inhibit tumor cell viability, independently of immunological mechanisms such as CDC and ADCC.

3.3. Antibody induced cell cycle arrest *in vitro*

To investigate the mechanism of both antibodies' growth-inhibitory effect on OAcGD2/GD2-positive tumor cells, we undertook experiments to study cell cycle distribution in tumor cells incubated with either mAb 8B6 or mAb 10B8. Data were compared to control 4F6 antibody-treated cells. To this end, cells were seeded in 96-well microtiter plates 1 day before either 8B6 or 10B8 antibody application and incubated for 24 h. The cells were then stained with a FITC-conjugated goat anti-mouse IgG F(ab')₂ fragment goat anti-mouse IgG to detect antigen-positive cells. The cell cycle distribution was analyzed for each gated population after 7-AAD staining. Fig. 2A shows the EL4 cells distribution in the different phases of cell cycle when treated with control 4F6 mAb, with mAb 8B6 or with mAb 10B8 as indicated. After 24 h, control 4F6 antibody-treated cells showed a pattern of DNA distribution similar to the untreated controls (G1 = 40.9%, S = 30.4, G2/M = 26.2) (Fig. 2C). The population of OAcGD2-positive cells treated with mAb 8B6 was mainly in G1-phase (44.1%) and G2/M-phase (55%) leading to a virtual lack of S-phase (1.1%)

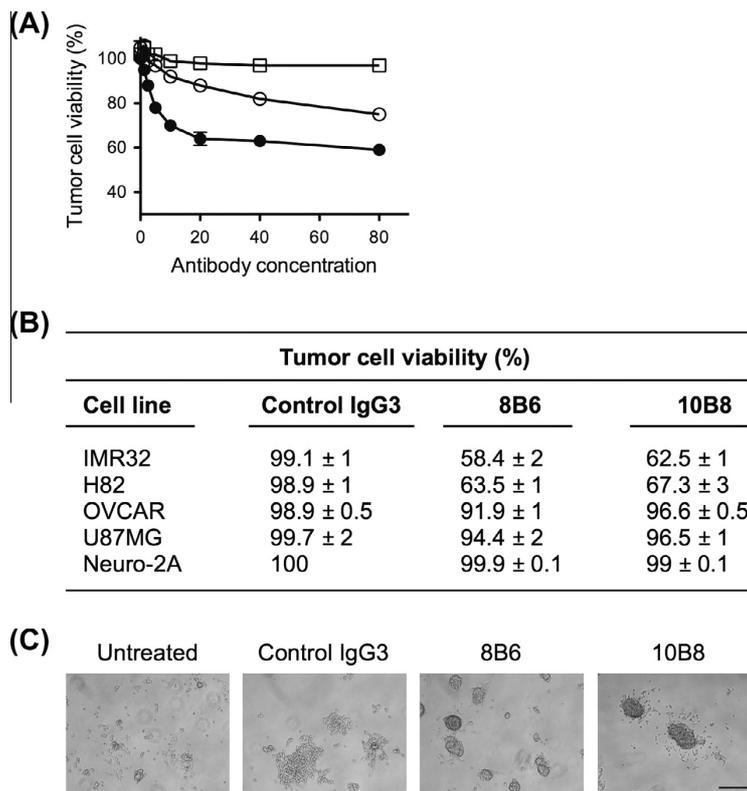


Fig. 1. Monoclonal antibody 8B6 and mAb 10B8 each decrease cell viability and morphological change of OAcGD2/GD2-expressing tumor cells. (A) IMR5 cell line was treated for 24 h with various concentrations of mAb 8B6 (●), mAb 10B8 (○) and a control 4F6 antibody (□). Viability was assessed as described in Section 2 by adding the methylthiazole tetrazolium salt during 4 h (MTT assay). Optical density was recorded at 570 nm. (B) Other tumor cell lines were also tested in the same conditions described above by adding mAb 8B6, mAb 10B8 and control 4F6 antibody in the culture medium during 24 h. Results represent the percentage of viable cells at 40 µg/mL of mAbs. Untreated cells incubated in culture medium served at 100%. The GD2-negative Neuro2a cell line was used as a negative control. The data are presented as the mean ± SD for three independent experiments, each in triplicate. (C) Phase-contrast microscopic examination of IMR5 tumor cells exposed to 40 µg/mL of either control 4F6 antibody, mAb 8B6, or mAb 10B8. After 24 h incubation period morphological changes of cells were observed under a phase-contrast microscope with the same magnification 10×.

(Fig. 2C). A similar result was obtained when mAb 10B8 was used (Fig. 2C). To further confirm the cell cycle arrest in the mAb-treated EL4 cells, the levels of p21 expression were analyzed from cell lysates by Western blotting. As shown in Fig. 2B, binding of either mAb 8B6 or mAb 10B8 onto EL4 cells resulted in the expression of p21, which is characteristic of cell cycle arrest. This effect was specific since p21 was not detectable in the non-treated cells and the control 4F6 antibody-treated EL4 cells (Fig. 2B).

We then analyzed antibody-specific cell cycle arrest in other tumor cell lines after treatment with both mAbs. Consistent with cell viability inhibition, mAb 8B6 treatment induced a significant G1-phase and G2/M-phase arrest on high-expressing IMR32 and IMR5 cells compared to control 4F6 antibody ($p < 0.05$; Fig. 2C). The same effect was obtained when mAb 10B8 was used ($p < 0.05$ to control 4F6 antibody; Fig. 2C). Interestingly, the intermediary antigen-expressing H82 cells also showed significant increase in the number of G1-phase and G2/M-phase in either mAb 8B6- or mAb 10B8-treated cells (Fig. 2C). A less significant effect was also observed in the low OAcGD2-expressing OVCAR-3 and U87MG cell lines (Fig. 2C). No effect was observed on the cell cycle distribution in the non-expressing Neuro 2a cells (data not shown). All data together show the ability of either mAb 8B6 or mAb 10B8 to induce growth cell cycle arrest in various OAcGD2/GD2-expressing tumor cell types.

3.4. Antibody induced tumor cells apoptosis

To test whether the viability suppression induced by both mAbs was also due to the induction of programmed cell death, we stained antigen-expressing tumor cells with Apo2.7 antibody, followed by flow cytometry analyses, and compared results to control 4F6 antibody-treated cells. Apoptotic cells were detected by flow cytometric analysis after staining bound mAbs to either GD2 or OAcGD2 with a FITC-conjugated goat anti-mouse IgG F(ab')₂ fragment goat anti-mouse IgG as previously reported [9]. This analysis discriminates the antigen expressing cells from the apoptotic one. We showed earlier that mAb 8B6-incubation resulted in 29% of double-positive EL-4 cells undergoing apoptosis [9]. Here we found that the percentage of mAb 10B8-treated EL4 cells undergoing apoptosis to be 21% (data not shown). Table 2 shows the percentage of double-positive cells in the other cell lines incubated either with mAb 8B6 or mAb 10B8. The induction of programmed cell death was observed with either mAb 8B6 or mAb 10B8 in IMR32 cells, IMR5 cells and H82 cells where the amount of double-positive cells was significantly increased after mAb incubations. In agreement with the cell cycle distribution analyses, no significant increase of the double-positive cell percentage was observed either in OVCAR 3 or U87MG cell lines. These results show the ability of

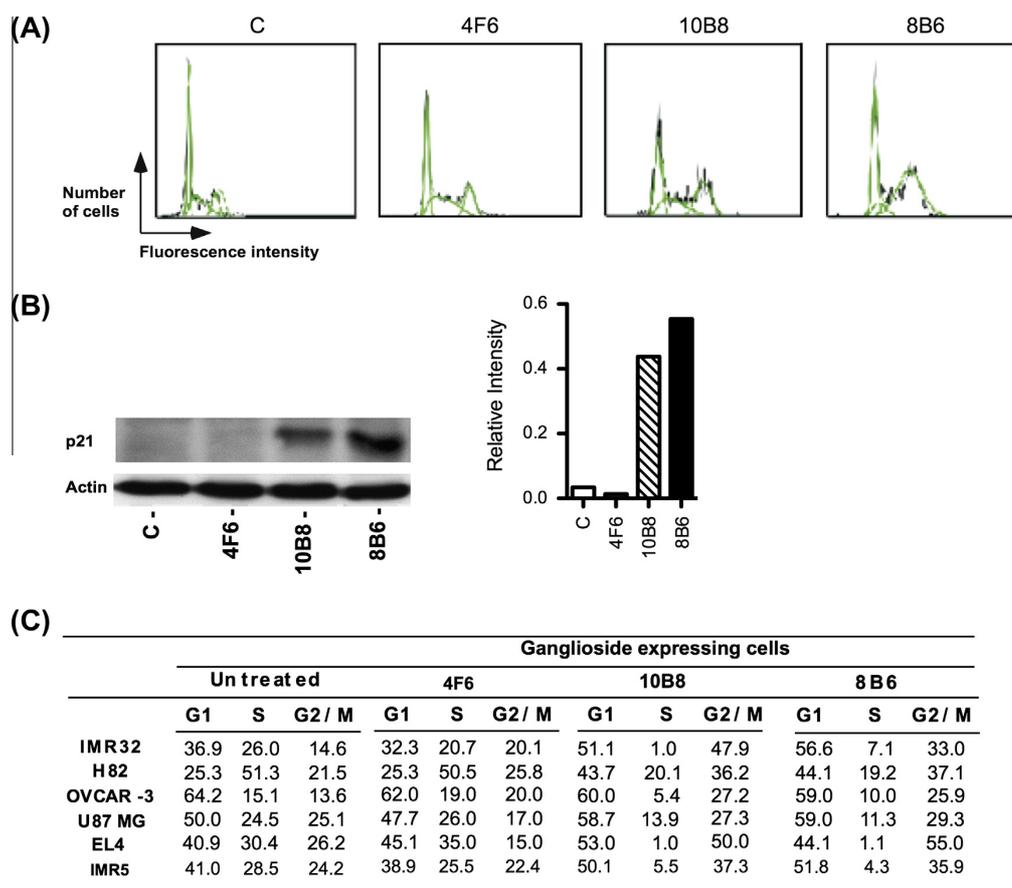


Fig. 2. Growth cell cycle arrest in OAcGD2/GD2-expressing tumor cells treated by either mAb 8B6 or mAb 10B8. Proliferating cells were treated with mAbs at 40 μ g/mL for 24 h. (A) EL4 tumor cells were untreated (C) or treated with control 4F6, mAb 8B6 or mAb 10B8 as indicated. Cell cycle distribution of OAcGD2- and GD2-positive cells was analyzed by flow cytometry after double staining with fluorescein-isothiocyanate-conjugated F(ab')₂ fragments of goat anti-mouse IgG and 7-AAD. (B) The cells treated with mAbs as in A were used for immunoblotting with an anti-p21 antibody and a β -actin antibody (left); band intensities from were plotted after correction with those of β -actin (left). Similar results were obtained at least in three experiments. (C) Cell cycle analysis of antigen-expressing tumor cell lines after treatment with either control 4F6 antibody or mAb 8B6, or mAb 10B8. Data represent the mean of 3 assays.

mAb 8B6 to induce apoptosis in OAcGD2-expressing cell lines similarly to mAb 10B8 specific for GD2.

Aixinjuelo et al. reported earlier the involvement of p38 activation in apoptosis mediated by anti-GD2 mAb in SCLC cells [15]. Thus, we sought to determine whether mAb 8B6 binding to OAcGD2-expressing EL-4 cells induced p38 phosphorylation using Western blot analysis. We found that phosphorylation of p38 was induced in EL4 cells after either mAb 8B6 or mAb 10B8 incubation in contrast to control-IgG3 treated- and untreated-cells (Fig. 3).

Accumulating evidence indicates that p38 signaling pathways participates in mitochondrial-mediated apoptotic pathway. We next determined the induction of the mitochondrial-mediated apoptotic pathway in EL-4 cells treated with either mAb 8B6 or mAb 10B8. As shown in the Western blots presented in Fig. 4, mAb 8B6 induced increased level of BAX into the mitochondria (Fig. 4A) concomitantly to increased level of cytochrome C in the cytosol (Fig. 4B) and the activation of caspase 3 (Fig. 4C) in comparison to control-IgG3 treated- and untreated-cells (Fig. 4). We also found that mAb 10B8 induced similar effects to that of mAb 8B6 (Fig. 4). Taken together, our data indicate that mAb 8B6 and mAb 10B8 may induce mitochondrial-mediated apoptosis in EL-4 cells.

Having found that mAb 8B6 and mAb 10B8 are both capable of inducing programmed cell death through caspase 3 activation, we next further investigate whether the apoptotic process evidence here is exclusively caspase dependant. We pre-treated EL4 cells for 4 h with 50 μ M zVAD-fmk prior to treatment with mAbs. As shown in Fig. 5, the zVAD-fmk treatment partially blocked the cell death induced by mAb 8B6 suggesting that the observed cell death was mediated via the caspase-3-dependent pathway and some independent pathways.

3.5. Analysis of *in vivo* antibody anti-tumor activity

We previously reported that mAb 8B6 treatment prevented the EL4 lymphoma tumor formation in syngenic C57BL/6 mice [9]. In the present report, we compared the mAb 8B6 *in vivo* anti-tumor activity to that of mAb 10B8. Thus, we injected the EL4 syngeneic T-lymphoma to C57BL/6 mice. Twenty-four hours after tumor inoculation, mice received 70 μ g per dose of mAb 8B6, mAb 10B8, control IgG3 antibody, or PBS twice a week for 3 weeks. After tumor cell injection, we monitored the tumor volume and the health of the mice. We measured the tumor volumes biweekly and euthanized the mice when their tumor size exceeded 2000 mm³. The survival curves were plotted according to the Kaplan–Meier method and compared using log-rank test. The results are summarized in Fig. 6. The Kaplan–Meier survival plot clearly reveals a survival advantage in the mAb 8B6-treated and the mAb 10B8-treated groups compared with the PBS- and the control 4F6 antibody-treated groups ($p < 0.01$ for all groups). While the mice in the control groups had be euthanized by day 42, 60% of the mice in the mAb 8B6-treated group and 50% of the mice that

Table 2
Monoclonal antibody 8B6 and 10B8 induces apoptosis in OAcGD2/GD2-expressing tumor cell lines.

| Cell lines | Number of apoptotic cells (%) ^a | | |
|------------|--|--------------|--------------|
| | Control | 8B6 | 10B8 |
| IMR32 | 12.3 \pm 4 | 34.3 \pm 2 | 29.4 \pm 1 |
| IMR5 | 16.4 \pm 1 | 53.4 \pm 5 | 34. \pm 1 |
| H82 | 1.5 \pm 3 | 38.5 \pm 3 | 36.8 \pm 4 |
| OVCAR-3 | 1.5 \pm 4 | 1.5 \pm 1 | 1.5 \pm 3 |
| U87MG | 2.0 \pm 1 | 3.5 \pm 1 | 4.0 \pm 2 |

^a Determined by Apo2.7 staining after exposition to either 40 μ g/mL of mAb 8B6 or mAb 10B8 for 24 h. Values represent the apoptosis percentages of OAcGD2- and GD2-expressing cells with SD ($n = 3$).

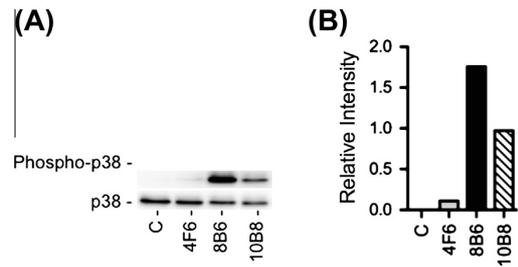


Fig. 3. Monoclonal antibody 8B6 and mAb 10B8 each induce p38 phosphorylation of OAcGD2/GD2-expressing tumor. EL-4 cells treated with anti-OAcGD2 mAb in Fig. 3 were used for immunoblotting with an anti-p38 antibody. (A) A typical western blot of p38 and phosphorylated-p38 in EL-4 cells treated with either mAb 8B6 or mAb 10B8 and (B) The band intensities were plotted after correction with those of total p38. Similar results were obtained at least in three experiments.

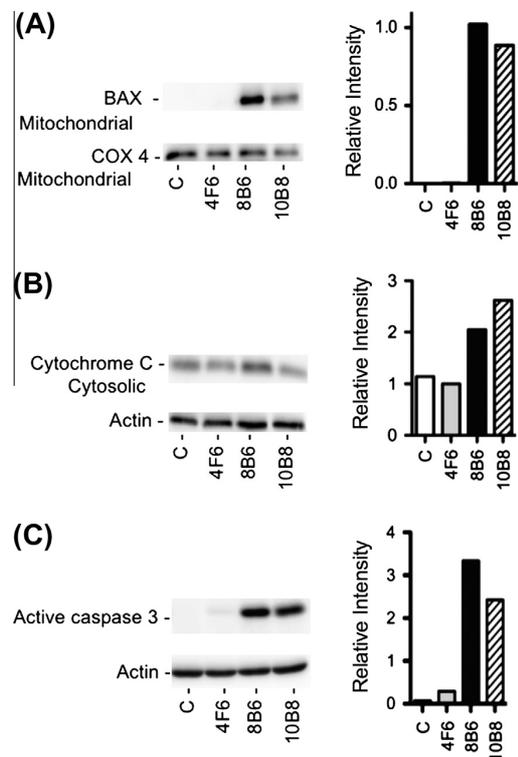


Fig. 4. Monoclonal antibody 8B6 and mAb 10B8 each induces the mitochondrial-mediated apoptotic pathway in EL-4 cells. The expression of BAX (in the mitochondria), Cytochrome C (in the cytosol) and active caspase 3 in either mAb 8B6- or mAb 10B8-treated cells were assessed by Western blot analysis. *Left panels*; representative images of immunoblots of BAX (in the mitochondria) (A) cytochrome C (in the cytosol) (B) and active caspase 3 (C); *right panels*; quantifications of Western blot analysis showing the BAX band intensity values expressed as fold of COX-4 (A); the cytochrome C cytosolic fraction (B), and the active caspase 3 (C) band intensity values expressed as fold of β -actin. Similar results were obtained at least in three experiments.

had received mAb 10B8 were still tumor free after 90 days and were considered cured. The effect of mAb 8B6 treatment was not statically different from that obtained upon treatment with mAb 10B8 ($p < 0.05$). The specificity of mAb 8B6 and mAb 10B8 therapy was demonstrated since treatment with an equivalent amount of non-specific IgG3 antibody was completely ineffective. The experimental results depicted in Fig. 6 were reproduced in three separate experiments.

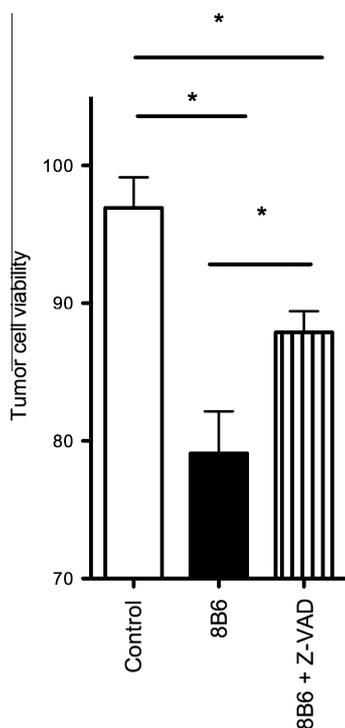


Fig. 5. Apoptosis induced by either mAb 8B6 or mAb 10B8 is partially caspase-dependant. EL4 cells were incubated with mAb 8B6 (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) with the presence or absence of Z-VAD-fmk caspase inhibitor (40 μM). After 48 h incubation, cell viability was determined by MTT assay. Data presented as mean of triplicate samples in a representative experiment. Similar results were obtained in three independent experiments.

We next assessed the anti-tumor efficacy of mAb 8B6 in C57BL/6 mice with subcutaneous established EL4 tumors. We induced established tumors by observing tumor growth in all animals after EL-4 cell challenge. When the tumor reached a volume of $\sim 100 \text{ mm}^3$, the mice were treated with one i.v. injection of either 500 μg of mAb 8B6 or mAb 10B8. After injection we measured the tumor volume. Due to ethical consideration the mice had to be euthanized once the tumor volume reached 1800 mm^3 . In the vehicle-treated group, tumors grew extremely rapidly to reach a tumor volume of $1825 \pm 355 \text{ mm}^3$ 7 days after treatment (data not shown) similarly to that of we observed in the control-IgG3-treated arm (mean tumor volume = $1896 \pm 343 \text{ mm}^3$; Fig. 6B). In contrast, antibody 8B6 treatment significantly delayed the development of the fast growing EL-4 tumors (mean tumor volume = $904 \pm 431 \text{ mm}^3$) as compared to control IgG3-treated tumors ($p < 0.01$, Fig. 6B). Surprisingly, mAb 10B8 did not significantly suppress established EL4 tumor growth in this model (mean tumor volume = $1272 \pm 393 \text{ mm}^3$) as compared to control IgG3-treated group ($p > 0.05$, Fig. 6B). Again, the specificity of mAb 8B6 therapy was demonstrated since treatment with an equivalent amount of non-specific IgG3 antibody was completely ineffective. Taken together, these data show the potential therapeutic efficacy of mAb 8B6 for treatment of OAcGD2-expressing tumors.

3.6. Immunohistological analysis

To understand the mechanism for mAb 8B6 and mAb 10B8 anti-tumor activity *in vivo*, we examined whether the antibody treatment down-regulated the expression of, respectively, OAcGD2

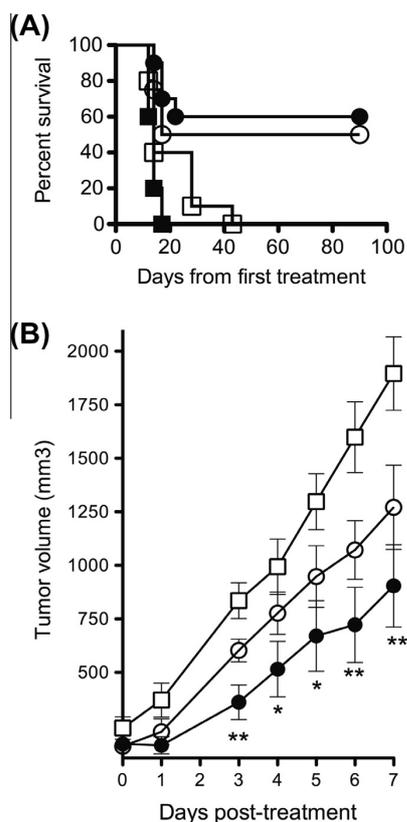


Fig. 6. Anti-tumor activities of either mAb 8B6 or mAb 10B8 after EL4 lymphoma cell inoculation. (A) Survival of C57BL/6 mice inoculated with EL4 cells treated with either 8B6 or 10B8 mAb. Mice were inoculated with 10^4 EL4 cells subcutaneously and then treated with either PBS or 70 μg of each antibody, twice weekly for 3 weeks. Antibody 10B8-treated group, $n = 6$; other groups, $n = 10$. Due to ethical considerations, mice had to be euthanized once tumor volume had reached 2000 mm^3 , which was therefore considered the end point for each individual mouse. (B) Growth inhibition of EL4 tumor in C57BL/6 mice. Mice ($n = 6$) were inoculated with 10^4 EL4 cells subcutaneously and then treated with either PBS or 500 μg of each antibody once the tumor volume reached 100 mm^3 . PBS (□), mAb 8B6 (●), mAb 10B8 (○), control 4F6 antibody (■); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

and GD2 ganglioside. After each euthanasia, tumor samples were removed and processed for H&E-, mAb 8B6-, Ki-67-, and TUNEL-staining, respectively. As shown in Fig. 7A, histological analysis of treated animals and controls demonstrated features of lymphoma tumors with areas of solid growth and lymphoid morphology (left panels). Tumor cells in samples from all groups were strongly stained for OAcGD2 (mAb 8B6) and GD2 (mAb 10B8). OAcGD2 was mainly expressed at the cell surface membrane and often also into the cytoplasm (Fig. 7A, second left panels). A similar pattern was obtained with mAb 10B8 specific for GD2 (Fig. 7A, middle panels). In general, although immunohistochemistry was not quantitative, tumor cells on frozen tissue sections demonstrated homogeneous OAcGD2- and GD2-expression in all groups. Therefore, mAb 8B6- and mAb 10B8-administration did not induce down-regulation of OAcGD2 and GD2, respectively.

To determine whether the cytostatic properties of mAb 8B6 observed *in vitro* are mimicked *in vivo*, we next analyzed the percentage of Ki-67-positive cells from treated mice (Fig. 7A, second right panels). These experiments were done in responsive tumors as described in Section 2. As shown in Fig. 7B, panel a, treatment with control IgG3 (PI = $79\% \pm 5$) or vehicle (PI = $80\% \pm 9$) had no effect on the proliferation of EL4 tumors. On the other hand,

the PI of EL4 tumors treated with mAb 8B6 was $40\% \pm 3$, which was significantly lower than the vehicle and control IgG3 treatment ($p < 0.001$ for all groups). The PI was also significantly decreased in the mAb 10B8-treated EL4 tumor ($50\% \pm 5$, $p < 0.009$ for control groups).

We analyzed the extent of apoptosis through TUNEL-staining in the EL4 tumors treated with mAb 8B6. The data in Fig. 7A, right panels, clearly show the occurrence of typical apoptotic nuclear changes, including chromatin condensation and DNA fragmentation after TUNEL staining in the EL4 tumors treated with mAb 8B6 or with mAb 10B8. Analysis of the apoptotic index showed an extremely low level of apoptosis in the vehicle-treated and the control IgG3-treated EL4 tumors (Fig. 7B, panel b). Interestingly, the percentage of apoptotic neoplastic cells was significantly higher in the EL4 tumors treated with mAb 8B6 ($19\% \pm 7$; $p < 0.05$ for control groups). Similarly, the percentage of apoptotic tumor cells was $11\% \pm 2$ in the EL4 tumors treated with mAb 10B8 ($p < 0.05$ for control groups). These findings show that both mAb 8B6 or mAb 10B8 in vivo anti-tumor activity is a result of a reduction in tumor cell proliferation and of an increase in tumor apoptosis.

3.7. Antibody 8B6 treatment remains effective in the absence of ADCC and CDC

To verify whether NK-cell-mediated ADCC and complement-dependent cytotoxicity are needed for mAb 8B6 immunotherapeutic effect, we treated IMR5-bearing NOD-SCID mice. These mice are deficient in T and B cells. They further characterized by a functional deficit in NK cells and by the absence of circulating complement. We implanted subcutaneously NOD/SCID mice with 10^6 IMR5 cells. When the IMR5 tumors reached 100 mm^3 , we injected the mice with $500 \mu\text{g}$ of either mAb 8B6 or mAb 10B8 and followed the tumor growth. As shown in Fig. 8, mAb 8B6 significantly inhibited IMR5 tumor growth compared to the vehicle- and the control IgG3-treated mice. Forty-eight days after antibody injection, tumor volumes averaged $473 \pm 167 \text{ mm}^3$ and $443 \pm 141 \text{ mm}^3$ in the vehicle- and the control IgG3-treated groups, respectively. In contrast, mAb 8B6 treatment completely inhibited IMR5 tumor growth with an average tumor volume at day 48 of $164 \pm 21 \text{ mm}^3$ ($p < 0.05$ compared to vehicle- and the control IgG3-treated groups). Antibody 10B8 showed a similar but weaker therapeutic effect with an average tumor volume at day 48 of $216 \pm 10 \text{ mm}^3$. The specificity

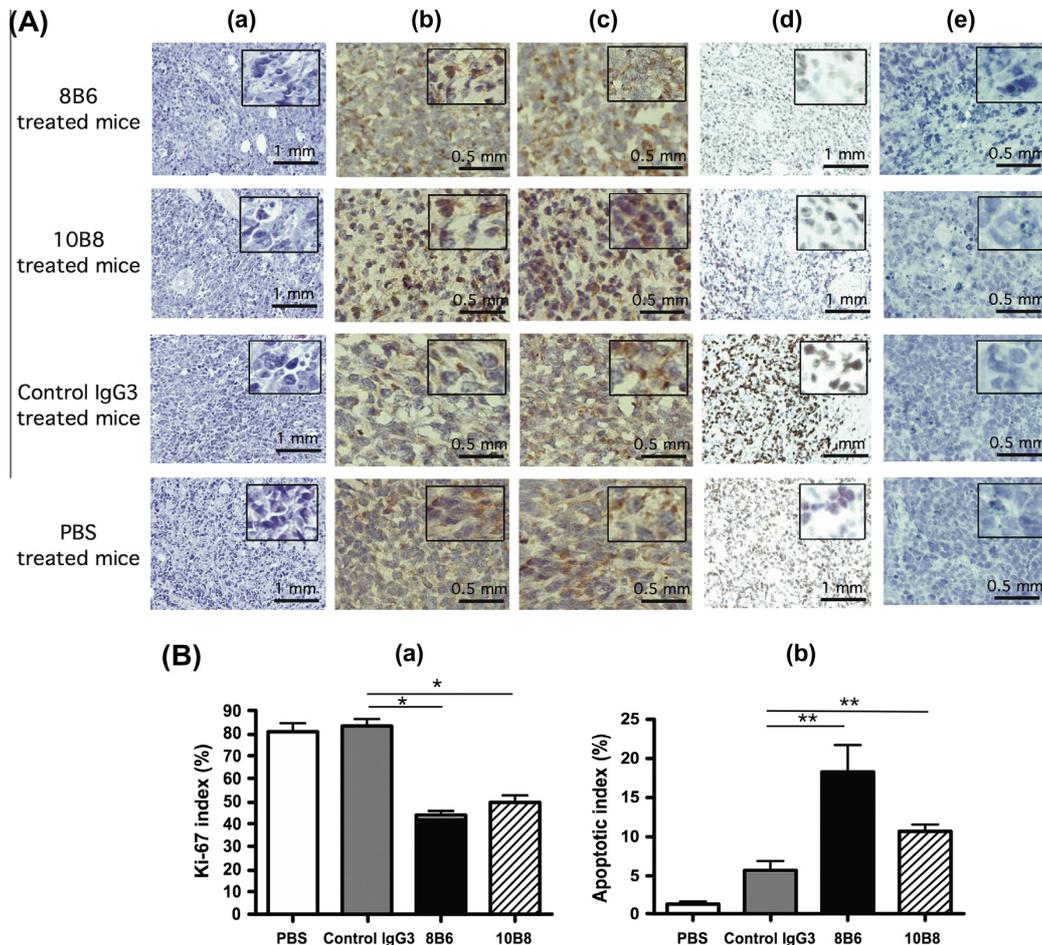


Fig. 7. (A) Histological examination of EL4 tumor grafts. Mice were treated as in Fig. 6A and tumors were resected on day 21. Frozen sections of individual tumor from each treatment group were stained with H&E (a) or with either mAb 8B6 (b) or mAb 10B8 (c) for OAcGD2 and GD2 detection, respectively. (d), tumors were formalin-fixed. Paraffin-embedded tumor sections were stained with Ki-67 detection (e) and detection of DNA fragmentation using terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) for the incorporation of fluorescein-12-dUTP at free 38-OH DNA ends (TUNEL assay) (e). Images are representative from each treatment group. (B) Ki-67 proliferation index (a) and apoptosis index (b) were calculated as described in Section 2. The data presented are mean positive cell count \pm SD. * $p < 0.001$, ** $p < 0.05$.

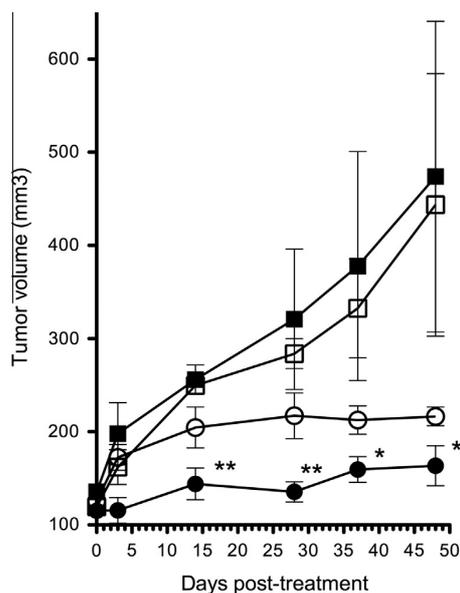


Fig. 8. Antibody 8B6 treatment remains effective in the absence of ADCC and CDC. NOD/SCID mice ($n = 8$) lacking T cells, B cells, circulating complement and NK cell-cytotoxic activities were implanted with 10^6 IMR5 cells subcutaneously, and treated once with either PBS or 500 μg of each antibody once the tumor volume reached 100 mm^3 . Tumor growth was monitored and mice were euthanized for ethical consideration once the tumor volume exceeded 500 mm^3 , which was therefore considered the end point for each individual mouse. PBS (□), mAb 8B6 (●), mAb 10B8 (○), control 4F6 antibody (■). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

of mAb 8B6 therapy was demonstrated since treatment with an equivalent amount of non-specific IgG3 antibody was completely ineffective. These data indicates that mAb 8B6 treatment remains effective in the absence of NK-mediated cell cytotoxicity and complement dependant cytotoxicity.

4. Discussion

Previous studies indicated that GD2 expressing tumor cells of different tumor types and of different species are sensitive to growth inhibition mediated by distinct GD2-specific mAbs [14–17]. Tumors cells that express GD2 concomitantly express OAcGD2 although the biological importance of GD2 O-acetylation remains unclear to date. On this point, we were interested in the role of OAcGD2 on tumor cell growth inhibition using specific mAbs. It is noteworthy that the two mAbs against GD2 used in clinical trials cross-react with OAcGD2 [27,28]. The biological effects of GD2 and OAcGD2 could not, however, be discriminated with these antibodies recognizing both antigens. This has been made possible by using the mAb 8B6 specific for OAcGD2 and comparing its effect with that of anti-GD2 mAb 10B8 [23]. We found that both antibodies induced tumor cell growth inhibition in OAcGD2/GD2 positive tumor cells by inducing both cell cycle arrest and apoptosis *in vitro*. In addition, we considered a model system using transplants of GD2/OAcGD-expressing EL4 mouse T lymphoma cells in syngeneic C57Bl/6 mice that had already been used in the pre-clinical setting of GD2-specific therapeutic antibodies [26,29]. In this model, both antibodies induced tumor regression by down-regulation of the Ki67-associated proliferation antigen and by apoptosis.

Since both induction of apoptosis and cell cycle arrest can lead to inhibition of cell growth, we demonstrated here that both mechanisms contribute to the observed tumor cell growth inhibition in a panel of six different cell lines in a dose- and time-dependant

fashion. To our knowledge, no studies have been performed on the induction of tumor cell cycle arrest using anti-GD2 mAbs, as other work focused on anti-GD2 pro-apoptotic activity [15,17,18]. Interestingly, this property is not cell type specific but there is a clear correlation between the viability inhibitory effects and the number of antibody molecules bound to the cell surface. The panel of five cell lines—IMR32, H82, OVCAR-3, U87MG, and EL4—showed striking variation of anti-GD2 and anti-OAcGD2 binding, with low antigen-expression lines having an average of less than 50,000 sites/cell and high antigen-expression lines having an average of greater than 1×10^6 sites/cell. A significant inhibitory effect was observed in all cell lines binding at least 150,000 8B6 molecules per cell. These data clearly show a relationship between antigen expression level and antibody efficiency but do not define a threshold. A weak and less significant effect is observed in the studied cell lines that bind less than 0.15×10^6 mAb 8B6 molecules per cell. These effects were specific since no cell cycle arrest/apoptosis was observed on OAcGD2-non-expressing Neuro 2a cells or with the control isotype mAb, respectively.

Our present study also confirms, and extends, previous work demonstrating that GD2 ganglioside is involved in apoptosis in SCLC cells and neuroblastoma cells *in vitro* [14,15,17]. We further showed that OAcGD2-specific antibodies share the same pro-apoptotic activity than anti-GD2 antibodies and that the apoptosis activity, measured by Apo 2.7 detection in flow cytometry experiments, is correlated to the level of OAcGD2-expression on tumor cells. In accordance with Aixinjuelo et al. [15], we also found activation of p38 in EL-4 cells incubated with mAb 8B6. Moreover, we evidence that the mitochondrial apoptotic pathway may play a major role for apoptosis of EL-4 cells induced by anti-OAcGD2 mAbs supported by cytochrome C release from the mitochondria. We also demonstrate that caspase 3 activation occurred in the mAb 8B6 treated cells that express OAcGD2 evidenced by Western blot analysis. Thus, anti-OAcGD2 mAb 8B6 induces cell death by a “classic” apoptotic pathway similarly to that of anti-GD2 mAb 10B8.

In addition, we show that the induction of apoptosis by mAb 8B6 involves the triggering of both caspase-dependant and caspase-independent pathways in EL4 cells because we only observed an incomplete inhibition of mAb 8B6 cell death in our experiments using the z-FMK-vad caspase inhibitor. These data are consistent with the results obtained by Kowalczyk et al. with mAb 14G2a in neuroblastoma cells [17] and suggest that mAb 8B6 may trigger multiple mechanisms during the induction of OAcGD2-expressing tumor cell apoptosis. While these data provide novel information about the biological function of OAcGD2, they contrast, however, with previous work on OAcGD3 functions that suggested that O-acetylation of GD3 has an anti-apoptotic role and helps tumor progression in lymphoid cells [20,21]. In agreement with these previous studies, Erdman et al. and Fox et al. also demonstrated that binding of OAcGD3-specific mAbs to OAcGD3-expressing activated lymphocytes provided co-stimulatory signals that lead to enhanced lymphocyte proliferation [30,31]. In contrast, the results presented here clearly indicate that OAcGD2, unlike OAcGD3, is a pro-apoptotic component activated on binding with hostile antibodies and behaves very similarly to GD2 in mediating apoptosis in the GD2/OAcGD2-expressing tumor cells of various origins.

While OAcGD2 can transmit signal resulting in inhibiting cell proliferation and apoptosis, the precise mechanisms induced by the binding of OAcGD2 antibody upon OAcGD2-expressing tumor cells leading to cell cycle arrest/apoptosis requires further investigation. In the case of GD2, initial indications suggest that anti-GD2 mAbs induce apoptosis of SCLC cells by interfering with the association of GD2 ganglioside to $\beta 1$ -integrin and focal adhesion kinase dephosphorylation [15]. Some data indicate that EL4 cells express $\beta 1$ integrins [32], thus this protein might be involved in the

apoptotic process induced by GD2-specific mAb 10B8. Indeed, the OAcGD2-triggered apoptosis may follow the same pathway as the binding site recognizing the structure of GD2 might exclude the outer sialic acid that becomes O-acetylated in OAcGD2. However, since the addition of an O-acetyl ester to sialic acid changes its structural properties and affects its binding specificity, the association between OAcGD2 and integrin remains open. Different mechanisms can be hypothesized. One mechanism is based on the assumption that binding of anti-ganglioside mAbs to their target antigens may cause a qualitative defect in the function of the lipid bilayer as well as its associated cytoskeletal system. This mechanism does not always fulfill, however, the operational criteria defining apoptosis and may lead, on the contrary, to an oncosis-like death, as reported by Roque-Navaro et al., with mAb specific for de-N-acetylated-GD3 [33]. In addition, our previous finding evidenced that anti-GD2 mAbs are rapidly internalized [16]. In case of OAcGD2-specific mAbs, a rapid internalization of OAcGD2-antibody complexes might induce an increase in endosome of ceramide, a major OAcGD2 component that has been shown to trigger sub-cellular events through different mechanisms [34]. This question is currently under investigation in our laboratory.

Noteworthy, the *in vitro* growth of the five OAcGD2-expressing cell lines we studied was inhibited by antibody concentrations that are in the range of GD2-specific therapeutic antibody serum concentrations observed in patients following administration of anti-GD2 mAb [5,35]. Viability inhibition of EL4 cells was maximal at mAb 8B6 concentration of 20 µg/mL and the peak serum concentration of anti-GD2 therapeutic antibodies was in the range of 1.1–22.4 µg/mL in patients following mAb infusion (5–100 mg/m²/day) [5,36]. Therefore, our results suggest a new potential anti-tumor mechanism that may be involved in the beneficial clinical effects reported in patients treated with GD2-specific mAb-based immunotherapy. The involvement of this anti-tumor mechanism is further supported here in our *in vivo* experiments using transplants of OAcGD2-expressing EL4 mouse T lymphoma cells in syngeneic C57Bl/6 mice. We have reported previously that passive immunotherapy with mAb 8B6 to OAcGD2 is effective in suppressing the growth of OAcGD2-expressing EL4 T lymphoma cells in C57Bl/6 mice [9]. We used mAb 8B6 that is mouse IgG3s. This isotype is well known for its inability to promote ADCC with mouse effector cells both *in vitro* and *in vivo*, as it barely binds to mouse FcγRs [37,38]. Therefore, the *in vivo* mechanisms involved here might not involve ADCC at all. Indeed, IgG3 can operate by complement-dependant mechanisms to generate complement-dependant cell toxicity, with the deposition of C3 activation fragments on the tumor cell surface. The EL4 cells used in our experiments, however, were resistant to complement because they express the rodent inhibitor of complement activation [9]. The mechanism whereby mAb 8B6 mediates *in vivo* suppression of tumor growth in this model is most likely to involve its apoptotic- and cytostatic-properties. The down-regulation of the ki67 cell proliferation antigen and the increased TUNEL staining observed in the tumors of the treated mice compared to the control groups provide initial evidence in support of 8B6's apoptotic/cytostatic properties in our *in vivo* experiments. We further investigate the potential role of complement and NK cells *in vivo* in human neuroblastoma IMR5 tumor-bearing NOD-SCID mice, which lack NK cell-cytotoxic activity and circulating complement [39]. Our data presented here demonstrate that lytic function of NK cells and complement are not a requirement for the *in vivo* activity of mAb 8B6. Again, mAb 8B6 specific for OAcGD2 behaved similarly to GD2-specific mAb 10B8. The 10B8 regression was, however, slightly less potent for apoptosis induction, a difference that may account for its lower affinity. From a clinical standpoint, these cytostatic/cytotoxic properties without immune effector mechanisms may be very important in the treatment of tumors that have

evolved complex mechanisms to protect themselves from ADCC and CDC. In addition, our data suggest that the administration of higher doses of anti-GD2 therapeutic antibody than those currently used may improve their clinical efficacy, since growth inhibition of IMR5 cells was maximal at the antibody concentration of 20 µg/mL. The GD2-specific therapeutic antibody have, however, dose limiting adverse-side effects due to the binding to peripheral nerves [8]. We have found that the OAcGD2 expression is restricted to a greater extent than GD2 [9]. Thus, mAbs to OAcGD2 would represent an effective therapeutic option thereby allowing escalation dose of antibodies and in controlling the side effects of mAbs to GD2.

In conclusion, we have shown that mAb 8B6 induces cell cycle arrest and triggers apoptosis that lead to a significant inhibition of tumor growth *in vitro* and *in vivo*. Therefore, our results provided new biological function of OAcGD2 in tumor cell biology, but also may be helpful in optimizing immunotherapy with anti-GD2 mAbs for neuroblastoma treatment.

Acknowledgements

Grant support: Agence Nationale pour la Recherche, la Ligue Nationale Contre le Cancer, Institut National du Cancer and Cancéropôle Grand Ouest (MAB IMPACT, IMPROVING ACTIVATION of FcγRIIIa-expressing effector cells, pharmacogenetic-based optimization of monoclonal antibody therapy for cancer, federative project), Fondation des Projets de l'Université de Nantes and AAIR LICHEMS, the Fondation de la Recherche Médicale, the Société Française de lutte contre les Cancers et les leucémies l'Enfant et de l'adolescent, l'Etoile de Martin, and les Bagouz' à Manon. NAR and DC was supported by Agence Nationale pour la Recherche and GC by MAB IMPACT. We thank Marie Hélène Gaugler, Stéphanie Bonnaud and Véronique Sébille for valuable technical suggestions; and Anne Riet, Sylvia Lambot, Thomas David, Nicolas Grinand and Jeff Abrahamson for technical assistance, and CYTOCELL for their help with flow cytometry experiments.

Appendix A. Abbreviations

SCLCC, small cell lung cancer cell; FAK, focal adhesion kinase; FCS, fetal calf serum, CDC, complement dependent cytotoxicity; mAb, monoclonal antibody; ADCC, antibody dependent cell-mediated cytotoxicity; LACK, lymphokine-activated killer cells; OAcGD3, O-acetylated-GD3; OAcGD2, O-acetylated-GD2; DT, doubling time; PI, proliferation index; H&E, hematoxylin/eosin; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick-end labeling. The ganglioside designation used is in accordance with the nomenclature proposed by Svennerholm (1963).

References

- [1] L.D. Cahan, R.F. Irie, R. Singh, A. Cassidenti, J.C. Paulson, Identification of a human neuroectodermal tumor antigen (OFA-I-2) as ganglioside GD2, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 7629–7633.
- [2] T. Watanabe, C.S. Pukel, H. Takeyama, K.O. Lloyd, H. Shiku, L.T. Li, L.R. Travassos, H.F. Oettgen, L.J. Old, Human melanoma antigen AH is an autoantigenic ganglioside related to GD2, J. Exp. Med. 156 (1982) 1884–1889.
- [3] D.A. Cheresh, J. Rosenberg, K. Mujoo, L. Hirschowitz, R.A. Reisfeld, Biosynthesis and expression of the disialoganglioside GD2, a relevant target antigen on small cell lung carcinoma for monoclonal antibody-mediated cytotoxicity, Cancer Res. 46 (1986) 5112–5118.
- [4] A.L. Yu, A.L. Gilman, M.F. Ozkaynak, W.B. London, S.G. Kreissman, H.X. Chen, M. Smith, B. Anderson, J.G. Villablanca, K.K. Matthey, H. Shimada, S.A. Grupp, R. Seeger, C.P. Reynolds, A. Buxton, R.A. Reisfeld, S.D. Gillies, S.L. Cohn, J.M. Maris, P.M. Sondel, Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma, N. Engl. J. Med. 363 (2010) 1324–1334.
- [5] N.K. Cheung, H. Lazarus, F.D. Miraldi, C.R. Abramowsky, S. Kallick, U.M. Saarinen, T. Spitzer, S.E. Strandjord, P.F. Coccia, N.A. Berger, Ganglioside GD2 specific monoclonal antibody 3F8: a phase I study in patients with neuroblastoma and malignant melanoma, J. Clin. Oncol. 5 (1987) 1430–1440.

- [6] R. Handgretinger, P. Baader, R. Dopfer, T. Klingebiel, P. Reuland, J. Treuner, R.A. Reisfeld, D. Niethammer, A phase I study of neuroblastoma with the anti-ganglioside GD2 antibody 14G2a, *Cancer Immunol. Immunother.* 35 (1992) 199–204.
- [7] M.N. Saleh, M.B. Khazaeli, R.H. Wheeler, E. Dropcho, T. Liu, M. Urist, D.M. Miller, S. Lawson, P. Dixon, C.H. Russell, et al., Phase I trial of the murine monoclonal anti-GD2 antibody 14G2a in metastatic melanoma, *Cancer Res.* 52 (1992) 4342–4347.
- [8] N. Yuki, M. Yamada, Y. Tagawa, H. Takahashi, S. Handa, Pathogenesis of the neurotoxicity caused by anti-GD2 antibody therapy, *J. Neurol. Sci.* 149 (1997) 127–130.
- [9] N. Alvarez-Rueda, A. Desselle, D. Cochonneau, T. Chaumette, B. Clemenceau, S. Leprieur, G. Bougras, S. Supiot, J.M. Mussini, J. Barbet, J. Saba, F. Paris, J. Aubry, S. Birkle, A monoclonal antibody to O-acetyl-GD2 ganglioside and not to GD2 shows potent anti-tumor activity without peripheral nervous system cross-reactivity, *PLoS ONE* 6 (2011) e25220.
- [10] D.H. Munn, N.K. Cheung, Interleukin-2 enhancement of monoclonal antibody-mediated cellular cytotoxicity against human melanoma, *Cancer Res.* 47 (1987) 6600–6605.
- [11] N.K. Cheung, E.I. Walter, W.H. Smith-Mensah, W.D. Ratnoff, M.L. Tykocinski, M.E. Medof, Decay-accelerating factor protects human tumor cells from complement-mediated cytotoxicity *in vitro*, *J. Clin. Invest.* 81 (1988) 1122–1128.
- [12] B.H. Kushner, N.K. Cheung, GM-CSF enhances 3F8 monoclonal antibody-dependent cellular cytotoxicity against human melanoma and neuroblastoma, *Blood* 73 (1989) 1936–1941.
- [13] Y. Zeng, S. Fest, R. Kunert, H. Katinger, V. Pistoia, J. Michon, G. Lewis, R. Ladenstein, H.N. Lode, Anti-neuroblastoma effect of ch14.18 antibody produced in CHO cells is mediated by NK-cells in mice, *Mol. Immunol.* 42 (2005) 1311–1319.
- [14] S. Yoshida, S. Fukumoto, H. Kawaguchi, S. Sato, R. Ueda, K. Furukawa, Ganglioside G(D2) in small cell lung cancer cell lines: enhancement of cell proliferation and mediation of apoptosis, *Cancer Res.* 61 (2001) 4244–4252.
- [15] W. Aixinjueluo, K. Furukawa, Q. Zhang, K. Hamamura, N. Tokuda, S. Yoshida, R. Ueda, Mechanisms for the apoptosis of small cell lung cancer cells induced by anti-GD2 monoclonal antibodies: roles of anoikis, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 29828–29836.
- [16] N. Alvarez-Rueda, S. Leprieur, B. Clemenceau, S. Supiot, V. Sebillé-Rivain, A. Faivre-Chauvet, F. Davodeau, F. Paris, J. Barbet, J. Aubry, S. Birkle, Binding activities and antitumor properties of a new mouse/human chimeric antibody specific for GD2 ganglioside antigen, *Clin. Cancer Res.* 13 (2007) 5613s–5620s.
- [17] A. Kowalczyk, M. Gil, I. Horwacik, Z. Odrowaz, D. Kozbor, H. Rokita, The GD2-specific 14G2a monoclonal antibody induces apoptosis and enhances cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in IMR-32 human neuroblastoma cells, *Cancer Lett.* 281 (2009) 171–182.
- [18] S. Yoshida, H. Kawaguchi, S. Sato, R. Ueda, K. Furukawa, An anti-GD2 monoclonal antibody enhances apoptotic effects of anti-cancer drugs against small cell lung cancer cells via JNK (c-Jun terminal kinase) activation, *Jpn. J. Cancer Res.* 93 (2002) 816–824.
- [19] E.R. Sjoberg, A.E. Manzi, K.H. Khoo, A. Dell, A. Varki, Structural and immunological characterization of O-acetylated GD2. Evidence that GD2 is an acceptor for ganglioside O-acetyltransferase in human melanoma cells, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 16200–16211.
- [20] K. Mukherjee, A.K. Chava, C. Mandal, S.N. Dey, B. Kniep, S. Chandra, O-acetylation of GD3 prevents its apoptotic effect and promotes survival of lymphoblasts in childhood acute lymphoblastic leukaemia, *J. Cell Biochem.* 105 (2008) 724–734.
- [21] B. Kniep, E. Kniep, N. Ozkucur, S. Barz, M. Bachmann, F. Malisan, R. Testi, E.P. Rieber, 9-O-acetyl GD3 protects tumor cells from apoptosis, *Int. J. Cancer* 119 (2006) 67–73.
- [22] F. Malisan, L. Franchi, B. Tomassini, N. Ventura, I. Condo, M.R. Rippon, A. Rufini, L. Liberati, C. Nachtigall, B. Kniep, R. Testi, Acetylation suppresses the proapoptotic activity of GD3 ganglioside, *J. Exp. Med.* 196 (2002) 1535–1541.
- [23] E. Cerato, S. Birkle, J. Portoukalian, A. Mezazigh, J.F. Chatal, J. Aubry, Variable region gene segments of nine monoclonal antibodies specific to disialogangliosides (GD2, GD3) and their O-acetylated derivatives, *Hybridoma* 16 (1997) 307–316.
- [24] G. Scatchard, Equilibrium in non-electrolyte mixtures, *Chem. Rev.* 44 (1949) 7–35.
- [25] F. Denizot, R. Lang, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *J. Immunol. Methods* 89 (1986) 271–277.
- [26] H. Zhang, S. Zhang, N.K. Cheung, G. Ragupathi, P.O. Livingston, Antibodies against GD2 ganglioside can eradicate syngeneic cancer micrometastases, *Cancer Res.* 58 (1998) 2844–2849.
- [27] J.N. Ye, N.K. Cheung, A novel O-acetylated ganglioside detected by anti-GD2 monoclonal antibodies, *Int. J. Cancer* 50 (1992) 197–201.
- [28] M.H. Ravindranath, S. Muthugounder, N. Presser, S.R. Selvan, A.D. Santin, S. Bellone, T.S. Saravanan, D.L. Morton, Immunogenic gangliosides in human ovarian carcinoma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353 (2007) 251–258.
- [29] M. Imai, C. Landen, R. Ohta, N.K. Cheung, S. Tomlinson, Complement-mediated mechanisms in anti-GD2 monoclonal antibody therapy of murine metastatic cancer, *Cancer Res.* 65 (2005) 10562–10568.
- [30] M. Erdmann, D. Wipfler, A. Merling, Y. Cao, C. Claus, B. Kniep, H. Sadick, W. Bergler, R. Vlasak, R. Schwartz-Albiez, Differential surface expression and possible function of 9-O- and 7-O-acetylated GD3 (CD60 b and c) during activation and apoptosis of human tonsillar B and T lymphocytes, *Glycoconj. J.* 23 (2006) 627–638.
- [31] D.A. Fox, J.A. Millard, L. Kan, W.S. Zeldes, W. Davis, J. Higgs, F. Emmrich, R.W. Kinne, Activation pathways of synovial T lymphocytes. Expression and function of the UM4D4/CDw60 antigen, *J. Clin. Invest.* 86 (1990) 1124–1136.
- [32] G. Wiedle, C. Johnson-Leger, B.A. Imhof, A chimeric cell adhesion molecule mediates homing of lymphocytes to vascularized tumors, *Cancer Res.* 59 (1999) 5255–5263.
- [33] L. Roque-Navarro, K. Chakrabandhu, J. de Leon, S. Rodriguez, C. Toledo, A. Carr, C.M. de Acosta, A.O. Hueber, R. Perez, Anti-ganglioside antibody-induced tumor cell death by loss of membrane integrity, *Mol. Cancer Ther.* 7 (2008) 2033–2041.
- [34] K. Iwabuchi, S. Yamamura, A. Prinetti, K. Handa, S. Hakomori, GM3-enriched microdomain involved in cell adhesion and signal transduction through carbohydrate-carbohydrate interaction in mouse melanoma B16 cells, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 9130–9138.
- [35] N.K. Cheung, B.H. Kushner, I.Y. Cheung, K. Kramer, A. Canete, W. Gerald, M.A. Bonilla, R. Finn, S.J. Yeh, S.M. Larson, Anti-G(D2) antibody treatment of minimal residual stage 4 neuroblastoma diagnosed at more than 1 year of age, *J. Clin. Oncol.* 16 (1998) 3053–3060.
- [36] M.M. Uttenreuther-Fischer, C.S. Huang, R.A. Reisfeld, A.L. Yu, Pharmacokinetics of anti-ganglioside GD2 mAb 14G2a in a phase I trial in pediatric cancer patients, *Cancer Immunol. Immunother.* 41 (1995) 29–36.
- [37] L. Fossati-Jimack, A. Ioan-Facsinay, L. Reininger, Y. Chicheportiche, N. Watanabe, T. Saito, F.M. Hofhuis, J.E. Gessner, C. Schiller, R.E. Schmidt, T. Honjo, J.S. Verbeek, S. Izui, Markedly different pathogenicity of four immunoglobulin G isotype-switch variants of an antierythrocyte autoantibody is based on their capacity to interact *in vivo* with the low-affinity Fcγ receptor III, *J. Exp. Med.* 191 (2000) 1293–1302.
- [38] S. Azeredo da Silveira, S. Kikuchi, L. Fossati-Jimack, T. Moll, T. Saito, J.S. Verbeek, M. Botto, M.J. Walport, M. Carroll, S. Izui, Complement activation selectively potentiates the pathogenicity of the IgG2b and IgG3 isotypes of a high affinity anti-erythrocyte autoantibody, *J. Exp. Med.* 195 (2002) 665–672.
- [39] L.D. Shultz, P.A. Schweitzer, S.W. Christianson, B. Gott, I.B. Schweitzer, B. Tennent, S. McKenna, L. Mobraaten, T.V. Rajan, D.L. Greiner, et al., Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice, *J. Immunol.* 154 (1995) 180–191.

Chapitre II

**Caractérisation des propriétés anti-tumorales de l'anticorps
chimérique homme-souris c.8B6 spécifique du marqueur
gangliosidique tumorale GD2 *O*-acétylé**

Article 2 : Chimeric antibody c.8B6 to O-Acetyl-GD2 mediates the same efficient anti-neuroblastoma effects as therapeutic ch14.18 antibody to GD2 without antibody induced allodynia.

En vue de son utilisation en clinique, nous avons entrepris la chimérisation de l'AcM 8B6. La chimérisation des AcM a pour objectif de substituer les régions constantes d'un AcM murin par celle d'une IgG humaine. Cette technique permet notamment de diminuer l'immunogénicité de l'AcM chez l'homme, en limitant les réactions HAMA qui conduisent à une diminution de l'efficacité de ces AcM et à des effets secondaires importants. Par ailleurs, les propriétés effectrices CDC et ADCC des AcM murins ne sont pas optimales chez l'homme. En effet, les fragments Fc des anticorps murins sont très peu affins pour les récepteurs FcR γ des cellules effectrices humaines (cellules NK, macrophages...) ou pour le C1q (molécule du système du complément). Dans ce contexte, il nous a semblé intéressant de produire un AcM chimérique nommé c.8B6. Celui-ci est constitué des régions variables de l'IgG3 murine 8B6 et des régions constantes d'une IgG1 humaine. Ce choix semble le plus judicieux car cette sous-classe d'AcM possède la meilleure capacité de liaison au C1q et aux FcR γ . A l'inverse, les IgG2 et IgG4 humaines ne possèdent pas ou très peu d'activité cytolytique. De plus, les IgG1 humaines possèdent une demi-vie longue de 21 jours contre seulement 7 jours pour les IgG3 humaines. Cette sous-classe d'AcM est également celle utilisée lors de la chimérisation de l'AcM de référence anti-GD2, le ch14.18.

Nous avons évalué l'efficacité anti-tumorale de l'AcM chimérique c.8B6 en le comparant à l'AcM ch14.18. Nous avons étudié dans un premier temps les capacités cytolytiques, *in vitro*, ADCC et CDC, de l'AcM chimérique c.8B6 sur deux lignées de neuroblastomes NXS2 (neuroblastome murin) et IMR5 (neuroblastome humain). Nous démontrons que cet AcM est capable d'induire l'activation du complément et de déclencher une lyse spécifique par l'intermédiaire de cellules NK humaines. L'efficacité anti-tumorale de l'AcM chimérique c.8B6 a également été montrée *in vivo*. Le modèle mis en place est le modèle syngénique de métastases hépatiques utilisé lors des études précliniques démontrant les propriétés anti-tumorales de l'AcM ch14.18. Nous montrons ainsi que l'AcM c.8B6 présente une efficacité anti-tumorale *in vivo* comparable à celle de l'AcM ch14.18 aux doses injectées de 1 à 0,125 mg (dose totale/souris). De plus, en collaboration avec les Dr. A.L. Yu et L.S. Sorkin (University of California, San Diego), nous montrons que l'AcM c.8B6 contrairement au ch14.18 n'induit pas d'allodynie dans un modèle chez le rat. Enfin et de manière inattendue, les travaux montrent l'absence de propriété apoptotique de l'AcM chimérique.

Chimeric Antibody c.8B6 to O-Acetyl-GD2 Mediates the Same Efficient Anti-Neuroblastoma Effects as Therapeutic ch14.18 Antibody to GD2 without Antibody Induced Allodynia

Mickaël Terme^{1,2,3,9}, Mylène Dorvillius^{1,9}, Denis Cochonneau^{2,3}, Tanguy Chaumette^{2,3,8}, Wenhua Xiao⁴, Mitchell B. Diccianni⁵, Jacques Barbet^{2,3}, Alice L. Yu^{5,6}, François Paris^{2,3}, Linda S. Sorkin⁷, Stéphane Birklé^{2,3,8*}

1 ATLAB Pharma, Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes, Nantes, France, **2** INSERM U.892, Centre de Recherche en Cancérologie de Nantes-Angers, Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes, Nantes, France, **3** CNRS 6299, Centre de Recherche en Cancérologie de Nantes-Angers, Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes, Nantes, France, **4** Department of Anesthesia, McGill University, Montreal, Quebec, Canada, **5** Department of Pediatrics, University of California San Diego, La Jolla, California, United States of America, **6** Center of Stem Cell and Translational Cancer Research, Chang Gung Memorial Hospital and Chang Gung University, Taoyuan, Taiwan, **7** Department of Anesthesiology, University of California San Diego School of Medicine, La Jolla, California, United States of America, **8** Université de Nantes, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Nantes, France

Abstract

Background: Anti-GD2 antibody is a proven therapy for GD2-positive neuroblastoma. Monoclonal antibodies against GD2, such as chimeric mAb ch14.18, have become benchmarks for neuroblastoma therapies. Pain, however, can limit immunotherapy with anti-GD2 therapeutic antibodies like ch14.18. This adverse effect is attributed to acute inflammation via complement activation on GD2-expressing nerves. Thus, new strategies are needed for the development of treatment intensification strategies to improve the outcome of these patients.

Methodology/Principal Findings: We established the mouse-human chimeric antibody c.8B6 specific to OAcGD2 in order to reduce potential immunogenicity in patients and to fill the need for a selective agent that can kill neuroblastoma cells without inducing adverse neurological side effects caused by anti-GD2 antibody immunotherapy. We further analyzed some of its functional properties compared with anti-GD2 ch14.18 therapeutic antibody. With the exception of allodynic activity, we found that antibody c.8B6 shares the same anti-neuroblastoma attributes as therapeutic ch14.18 anti-GD2 mAb when tested in cell-based assay and *in vivo* in an animal model.

Conclusion/Significance: The absence of OAcGD2 expression on nerve fibers and the lack of allodynic properties of c.8B6—which are believed to play a major role in mediating anti-GD2 mAb dose-limiting side effects—provide an important rationale for the clinical application of c.8B6 in patients with high-risk neuroblastoma.

Citation: Terme M, Dorvillius M, Cochonneau D, Chaumette T, Xiao W, et al. (2014) Chimeric Antibody c.8B6 to O-Acetyl-GD2 Mediates the Same Efficient Anti-Neuroblastoma Effects as Therapeutic ch14.18 Antibody to GD2 without Antibody Induced Allodynia. PLoS ONE 9(2): e87210. doi:10.1371/journal.pone.0087210

Editor: David R. Borchelt, University of Florida, United States of America

Received: November 1, 2013; **Accepted:** December 19, 2013; **Published:** February 10, 2014

Copyright: © 2014 Terme et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Agence Nationale pour la Recherche Grant ANR 13 RPIB 0001 02 - GANGSTEMAB, Fondation de Projet de l'Université de Nantes, AAIR LICHENS, Nantes Métropole, the Fondation de la Recherche Médicale, the Société Française de lutte contre les Cancers et les leucémies de l'Enfant et de l'adolescent, l'Etoile de Martin, les Bagouz à Manon, la Ligue contre le Cancer (comité 44 et comité 56) to SB and National Institutes of Health (NIH) Grant CA164132 to AL. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have read the journal's policy and have the following conflicts: At present, JB and SB are shareholders of ATLAB Pharma SAS and are inventors of a pending patent application regarding the use of anti-O-acetyl-GD2 monoclonal antibodies for cancer treatment. All other authors declare no conflict of interest. This does not alter the authors' adherence to all PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: Stephane.Birkle@univ-nantes.fr

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Neuroblastoma, a cancer derived from precursor cells of the sympathetic nervous system, is the most challenging malignancy of childhood, associated with the highest mortality rate in pediatric oncology; this underlies the need for novel therapeutic approaches [1,2]. Despite multimodal treatment, the overall survival and event-free survival rates in high-risk patients remain suboptimal. More than half of children diagnosed with high-risk neuroblastoma

either do not respond to conventional therapies or relapse after treatment. A major advance in the treatment of these patients was immunotherapy with a chimeric anti-GD2 therapeutic antibody combined with IL-2 and GM-CSF which significantly improved event-free survival and overall survival in a phase III randomized clinical trial in children with high-risk neuroblastoma [3].

Ganglioside GD2, a sialic acid containing glycosphingolipid, is a neuroblastoma-associated antigen. GD2 monoclonal antibodies

(mAb) mediate lysis of neuroblastoma cells via complement-dependent cytotoxicity (CDC) and by activation of Fc receptors on immune effector cells resulting in antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) [4]. Anti-GD2 antibody infusion is, however, frequently associated with dose limiting severe pain and perceived pain in response to light touch (allodynia) [5,6]. Moreover some patients have developed sensorimotor polyneuropathy with or without the syndrome of inappropriate antidiuretic hormone subsequent to treatment with anti-GD2 monoclonal antibodies [7]. These adverse effects were attributed to the mAb recognition of GD2 on the pituitary gland and on peripheral nerves followed by complement activation [8]. There is thus an urgent need to develop less toxic anti-GD2 therapeutic mAb.

In an effort to decrease the neurological toxicities of ch14.18, a humanized antibody was recently designed in which the Fc region was mutated in the CH2 domain to no longer engage C1q. The resultant antibody, hu14.18 K322A, retained potent ADCC activity against GD2-expressing tumor with impaired complement activation *in vitro* and reduced allodynia effects in rats [9]. This format would not be suitable, however, for developing more potent immunotherapeutic agents by conjugation of anti-GD2 mAbs to toxins, radionuclides or other effector molecules because it retains its binding activity to peripheral nerve fibers. In another strategy, a pretreatment dose of heat-modified anti-GD2 mouse mAb 3F8 (HM3F8) lacking effector functions was given prior to 3F8, allowing 3F8 dose escalation. It was suggested that HM3F8 might block GD2 on nerves, thereby reducing nerve-related adverse effects of a subsequent dose of native 3F8, and at low dose it would not have any deleterious effect on 3F8 targeting neuroblastoma cells in patients [10].

In our laboratory, we have generated a mouse monoclonal antibody that is specific for the O-acetylated derivative of GD2 (OAcGD2) with no cross-reaction to GD2 observed by immune-TLC [11]. Like GD2, Ganglioside OAcGD2 is expressed highly by GD2-positivetumor cells [12,13], but importantly it is not found on human peripheral nerve fibers [14]. These properties provide distinct advantage to mAb 8B6 for selectively targeting to neuroblastoma *in vivo* and suggest that anti-OAcGD2 antibodies have the potential to be less toxic than anti-GD2 therapeutic antibodies. Murine mAbs, however, are highly immunogenic in human: they induce Human Anti-Mouse Antibody (HAMA) response in patients, thereby reducing clinical efficacy by removing circulating antibodies [15]. Thus, a mouse/human chimeric version of mAb 8B6 has been made to facilitate clinical development of anti-OAcGD2 mAbs. In the present study, we describe the generation and characterization of a chimeric mouse-human anti-OAcGD2 antibody (c.8B6). The chimeric IgG1 c.8B6 antibody was obtained from the mouse mAb 8B6 to OAcGD2 and expressed in CHO-S cells. It retains the same antigen binding affinity and specificity as its parental mouse mAb. The *in vitro* and *in vivo* antitumor activity of c.8B6 was further examined in the mouse NXS2 neuroblastoma model and compared with ch14.18 anti-GD2 therapeutic antibody.

Materials and Methods

Cell Lines

Mouse neuroblastoma Neuro 2a cells and mouse lymphoma YAC-1 cells were obtained from the American Tissue Culture Collection (ATCC). Mouse neuroblastoma NXS2 cell line was given to us by Dr. H. N. Lode (Universitätsklinikum Greifswald, Greifswald, Germany). Human NK-92 cells transfected with CD-16 (RFcγIII) were a gift from Dr. B. Clemenceau (INSERM U. 892, Nantes, France) [16]. CHO-S cells obtained from Life

Technologies (Saint-Aubin, France). NXS2 cells were grown at 37°C in 5% CO₂ in DMEM with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM L-Glutamin, 100 units/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. Neuro-2a and YAC-1 cells were grown at 37°C in 5% CO₂ in RPMI 1640 with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM L-Glutamine, 100 units/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. Human NK-92 cells transfected with CD-16 were grown at 37°C in 5% CO₂ in RPMI 1640 with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM L-Glutamine, 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 100 U/ml human recombinant IL-2. CHO-S cells were grown in suspension at 37°C in PowerCHO 2 serum-free CD medium (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 4 mM L-Glutamine and ProHT reagent (Lonza).

Antibodies

Chimeric mAb ch14.18 (γ1,κ) specific for GD2 was kindly provided by Dr. H. N. Lode (Universitätsklinikum Greifswald, Greifswald, Germany). Rituximab®—a chimeric IgG1 mAb against the human protein CD20, which is primarily found on B cells—was used as a negative control. Chimeric anti-OAcGD2 mAb c.8B6 was constructed by joining the complementary deoxyribonucleic acid for the variable region of the murine antibody 8B6 [11] with the human constant regions of the γ1 heavy chain and the κ light chain. The light and heavy chain expression vectors for chimeric antibody were constructed using the same method as described in a previous report [17]. Appropriate light and heavy expression vectors were co-transfected into Chinese hamster ovary (CHO-S) cells and stable transfectants were isolated. The clone producing the highest amount of recombinant mAb was grown in serum-free medium. Monoclonal antibody c.8B6 was affinity-purified from culture supernatant by protein A affinity chromatography followed by anion-exchange chromatography on Sepharose Q for endotoxin removal. The purity of mAb preparations was verified by SDS-PAGE analysis. Endotoxin quantitation was evaluated using the LAL kinetic chromogenic assay (Lonza).

Flow Cytometry Analysis

Analysis of cell surface OAcGD2- and GD2-expression on tumor cells was performed by indirect immunofluorescence measured by flow cytometry. Briefly, cells were incubated with either mAb c.8B6, ch14.18 or Rituximab at 10 µg/mL for 30 min at 4°C. Antibody binding was detected by incubation with a fluorescein-isothiocyanate-conjugated-labeled F(ab')₂ fragment of goat anti-human IgG (Jackson ImmunoResearch, Soham, UK) for 30 min at 4°C. Cell fluorescence was analyzed using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and CellQuestPro software (BD Biosciences).

Extraction and Purification of Gangliosides

Gangliosides were prepared from tumor cells and/or tumor xenografts according to Bouchon *et al.* [18]. Gangliosides were extracted from tumor cells at room temperature with 20 volumes each of 1:2 and 2:1 (v/v) chloroform/methanol mixture. The total lipid extract was evaporated to dryness in a rotary evaporator, re-suspended and Folch-partitioned 3 times. The gangliosides were then obtained from the pooled upper phase from the Folch partitions by reverse-phase chromatography on styrene divinylbenzene copolymer columns (EnviChrom™, Supelco, L'isle D'Abeau, France) as described by Popa *et al.* [19]. In some experiments, the O-acetyl groups from gangliosides were removed by alkaline treatment with concentrated ammonium hydroxide overnight at 25°C. The total ganglioside extracts were analyzed by TLC on silica 60 high performance TLC plates (Machery-Nagel

GmbH & Co KG, Düren, Germany), using chloroform/methanol/0.2% aqueous calcium chloride (55:45:10, by volume). Orcinol reagent was used to visualize the separated gangliosides. Gangliosides were identified by the nomenclature of Svennerholm [20].

Enzyme Immunostaining on TLC Plates

Detection of GD2 and OAcGD2 was performed by TLC-immunostaining (I-TLC) with mAb ch14.18 and mAb c.8B6 respectively as described by Cerato *et al.* [11]. Briefly, the developed TLC plates were fixed by 0.05% polyisobutylmethacrylate in hexane and treated with PBS-1% BSA for 1 h at 25°C. They were then overlaid with either antibody ch14.18 or c.8B6 at 10 µg/mL in PBS-0.1% BSA overnight at 4°C. After three washings with PBS, mAb binding was detected by stepwise incubation with biotinylated chain specific anti-human immunoglobulins (1:2000, diluted) (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) for 1 h at room temperature, followed by streptavidin-horseradish peroxidase complex (1:1000, diluted) (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) for 1 h at room temperature. After extensive washings with PBS, the bound peroxidases were visualized with 4-chloro-1-naphthol solution (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Purification of Gangliosides from NXS2 Tumor Bearing Mouse Serum

Serum was collected from subcutaneous NXS2 tumor-bearing mice. For this purpose, A/J mice were injected subcutaneously with NXS2 cells (10^6 cells) in the right flank. Tumor volume and health of the mice were monitored. After grafts became visible, the tumor size was determined three times a week by externally measuring the tumors in two dimensions. Tumor volume was calculated according to the equation: $V = (L \times W^2) \times 0.5$, where L is the length and W the width of the tumor. Mice were euthanized when the tumors reached 1000 mm^3 . Serum samples were taken. Serum-gangliosides were reclaimed by reverse-phase chromatography on styrene divinylbenzene copolymer columns from sera diluted once (V/V) in methanol according to Popa *et al.* [19]. The total ganglioside extracts were analyzed by I-TLC as describe above.

Immunohistochemistry

Portions of Sprague–Dawley rat sural nerves or NXS2 tumors grown in A/J mice were embedded in Tissue Tek-II O.C.T. (Miles, Naperville, IL), snap frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C . Ten micrometer-sections were cut, fixed in acetone, and stained with chimeric mAbs c.8B6 or ch14.18 for 1 hour. After washing with PBS, mAb binding was detected by stepwise incubation with biotinylated chain specific anti-human immunoglobulins (1:500, diluted) (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) for 1 hour at room temperature, followed by streptavidin-horseradish peroxidase complex (1:1000, diluted) (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) for 1 hour at room temperature. After rinsing, the bound antibody was detected with DAB chromogen substrate solution (Dako, Glostrup, Denmark), which was used to produce a brown deposit. Rituximab was used as a negative control. A mAb specific to mouse neural cell adhesion molecule (CD56) purchased from Abbiotec (San Diego, CA, USA) was used as positive control. The concentration 5 µg/mL was selected for the study because it would result in minimal background and maximal detection signal. Slides were counterstained with hematoxylin before immunocytological evaluation.

Staining was graded as positive or negative according to the presence or absence of immunoreactivity, respectively.

Radioiodination and Immunoreactivity of Radiolabeled Antibodies

Monoclonal antibodies (30 µg in 50 µl PBS) were labeled with iodine-125 (PerkinElmer, Billerica, MA) using the iodogen method and were purified by gel filtration chromatography on a PD10 column (Sephadex G25, GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Immunoreactivity was determined by binding assays of 10 ng of either ^{125}I -c.8B6 or ^{125}I -ch14.18 with serially diluted NXS2 cell suspension concentrations for 2 hours at 4°C. Cell-bound radioactivity was then separated from free antibody by centrifugation through a dibutylphthalate oil cushion in microfuge tubes. Cell pellets and supernatant activities were then separately measured using a gamma counter (Wallac, Finland). The binding data were analyzed with the Equilibrium Expert software [21] according to a one-site equilibrium binding equation and the percentage of binding was determined by measuring the radioactivity bound to cells. For each experiment, non-specific binding evaluated in the presence of an excess of the unlabeled antibody 8B6 ($2.0 \times 10^{-6} \text{ M}$), was modelled as linearly dependent on the cell number.

Determination of Binding Parameters

A competition cell-binding assay was carried out to assess the reactivity of mAb c.8B6 and mAb ch14.18 against their respective target antigens. Two competitive binding assays between ^{125}I -mAb and unlabeled mAbs were carried out on NXS2 cells. Antibodies c.8B6- and ch14.18-binding activities against OAcGD2 and GD2, respectively, were determined by homologous competition binding activity. Antibody ch14.18 cross-reactivity against OAcGD2, and binding activity of c.8B6 to GD2, were studied by heterologous competition using ^{125}I -labelled c.8B6 and ch14.18, respectively. For homologous competition assays, the radiolabelled antibody (10 ng) in the presence of increasing concentrations of the corresponding unlabeled mAb (1.7×10^{-11} to $1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$) was added to NXS2 cells (1×10^6) under mild shaking. For heterologous competition experiments, ^{125}I -mAb c.8B6 or ch14.18 competed with increasing concentrations of unlabeled ch14.18 and c.8B6, respectively. After 2 h at 4°C, cell-bound radioactivity was separated from free antibody by centrifugation through a dibutylphthalate oil cushion in microfuge tubes. Cell pellet and supernatant activities were then separately measured using a gamma counter (Wallac, Finland). Competition binding curves were plotted as uncorrected bound/total (B/T) as a function of competing antibody concentration and were analyzed with the Equilibrium Expert software according to two-site (GD2 and OAcGD2) equilibrium binding for each antibody. All binding data were analysed simultaneously using the software package taking into account the immunoreactive fraction of the labelled antibodies determined as described above. This analysis allowed an estimation of the binding affinities (expressed in terms of dissociation constant, Kd) of both antibodies to GD2 and to OAcGD2, and the number of binding sites per cell, as well as non-specific binding isotherms.

Complement Dependent Cytotoxicity (CDC)

Aliquots of NXS2 cells (1×10^4) were incubated with 80 µL of antibody solution at various concentrations for 2 h at 37°C, human serum (20 µl) was added to provide complement. Cytotoxicity was determined within the tumor cell population after addition of the viability probe propidium iodide (PI) using a

FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and CellQuestPro software (BD Biosciences). The percentage of specific lysis was calculated as: $100 \times (\text{non viable PI}^+ \text{ tumor cells}) / (\text{non viable PI}^+ \text{ tumor cells} + \text{viable tumor cells})$.

Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity (ADCC)

An ADCC assay was performed as reported previously [22]. Tumor cells were labeled with membrane dye PKH-26 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) according to the manufacturer's instructions. Aliquots of the labeled cells (1×10^4 cells/100 μ l) and were incubated with 50 μ l of antibodies in 96-well microtiter plates. The human NK-92-RF γ III+ cells were used as effector cells [23]. Fifty μ l of NK-92-RF γ III+ cells at the indicated effector-to-target ratio (E/T) were added to the tumor cells and incubated for 24 hours at 37°C. Cell death within the PKH-26+ target cell population was then assessed by the addition of TO-PRO-3 iodide (TP3) (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). The double-positive TP3+, PKH26+ dead target cell population was detected by flow cytometry analysis using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) in conjunction with CellQuestPro software (BD Biosciences). The percentage of specific lysis was calculated as: $100 \times (\text{non viable double-positive target cells}) / (\text{non viable double-positive target cells} + \text{viable PKH26}^+ \text{ target cells})$. The lysis of the NK-sensitive mouse T cell lymphoma YAC-1 was used as an indicator of NK-92-RF γ III+ activity [24].

Murine Tumor Model

The anti-neuroblastoma efficacy was determined in the murine NXS2 neuroblastoma experimental liver metastasis model previously described by Lode *et al.* [25]. The NXS2 cell line is a syngeneic murine neuroblastoma in A/J mice by Zeng *et al.* [26] in the ch14.18 preclinical setting. This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the French Department of Agriculture (agreement number 44–278). The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Région Pays de la Loire (Permit Number: B4459). All injections were performed under sodium pentobarbital anesthesia, and standard protocols were made to minimize suffering. Female A/J mice (6–8 weeks of age) were obtained from Harlan Sprague-Dawley (Sulzfeld, Germany). Briefly, 2.5×10^5 tumor cells were inoculated by tail vein in PBS. After 3 days, mice were injected daily for five consecutive days with dose 200 μ g or 25 μ g of chimeric mAb c.8B6 or ch14.18, total dose at 1000 or 125 μ g. Rituximab (200 μ g per dose) was used as a negative control. Mice were sacrificed after 28 days post inoculation, and anti-tumor efficacy was evaluated by liver weight of the fresh specimen.

Allodynia

Experiments using adult (200–300 g) male Sprague–Dawley, PVG (C+) (Harlan Industries, Indianapolis, IN), were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of California, San Diego (Permit Number: S12314). All rats were allowed to recover from shipping for at least 72 hours prior to experiments. Animals were acclimated to the test facility and the testing equipment during 2 sessions prior to the actual experiment. On the test day, animals were placed in individual plastic compartments (26 \times 11 \times 20 cm) with wire mesh floors for 30 min prior to determination of basal 50% probability mechanical withdrawal threshold for each rat. Animals were then lightly anesthetized with isoflurane (about 2%) and injected with antibody or vehicle through the tail vein, using a 30 g needle. Anesthesia was discontinued after injection and the animal placed back in the testing compartment. Rats were awake within 3 min and in most

experiments, mechanical withdrawal thresholds were re-measured every hour for the first 5 h after injection of agent. Experiments began between 9 and 10 a.m. Animals were kept two to a cage under a 12/12 hours day/night cycle with food and water available *ad libitum*. Rats were injected with mAb ch14.18 (anti-GD2 antibody) (1 mg/kg; n = 7), an equal amount of mAb c.8B6 (anti-OAcGD2) (n = 9), an increased dose (3 mg/kg; n = 7) of mAb c.8B6 antibody or rituximab (1 mg/kg; n = 7). One mg/kg of mAb ch14.18 antibody produces maximum allodynia in the rat [27]. The person performing the behavioral testing was blinded to the contents of the syringe. Mechanical withdrawal thresholds following the various treatments were measured with a set of von Frey filaments (Stoelting) with exponentially incremental bending forces ranging from 0.41 to 15.1 g. When the animal was quiet and resting on all four paws, a filament was presented perpendicular to the plantar surface of the hind-paw with sufficient force to elicit a slight bend. Filaments, beginning with the 2.0 g filament, were presented in ascending order of stiffness until an abrupt paw withdrawal (escape) or the stiffest (15.1 g) filament in the set was applied. Stimuli were maintained for 6 s. Successive stimuli were separated by several seconds or until the animal was again calm with hind-paws placed flat on the mesh flooring. Testing followed an up–down paradigm [28], i.e., when a response was made, filaments of decreasing strength were applied until the animal no longer responded, at which point filaments were again presented in ascending order. This pattern was repeated for four stimulus presentations after the first withdrawal response. The 50% probability withdrawal threshold was calculated [29]. Animals that did not respond to the stiffest filament, were considered to have thresholds at cut-off (15.1 g). This process was repeated for both the left and right hind-paws at each timepoint, the average value of the two hind-paws was considered to be the animal's response.

Statistic Analysis

Group results are illustrated as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.). Statistical significance of liver weights of experimental groups of mice was determined by two-tailed Student's *t*-test $p > 0.05$ using GraphPad Prism software. Percent allodynia area under the curve (AUC) was calculated for each animal based on their individual baseline responses using the trapezoidal method. This was then normalized such that 0 = no change from baseline and 100 = maximal allodynia. Statistics were performed on the 50% probability withdrawal threshold and maximal allodynia using ANOVA for repeated measures and Bonferroni's post hoc test. $p < 0.05$ was considered to be significant.

Results

Expression of the Mouse/Human Chimeric mAb c.8B6

The chimeric antibody expression vectors were constructed as described in the Material and Methods section and chimeric c.8B6 was expressed in stably transfected CHO-S cells. We purified mAb c.8B6 from culture medium using protein A affinity chromatography. SDS-PAGE under reducing conditions showed that the molecular weights of chimeric light and heavy chains were 25,000 and 50,000, respectively (data not shown). From analysis by non-reducing SDS-PAGE, the molecular weight of chimeric antibodies was \sim 150,000 (data not shown). These results indicated that the chimeric light and heavy chains were assembled as correct tetrameric molecules. Endotoxin levels in the purified mAb solutions were found to be 3.08 EU/ml for mAb c.8B6 and 0.11 EU/ml for mAb ch14.18.

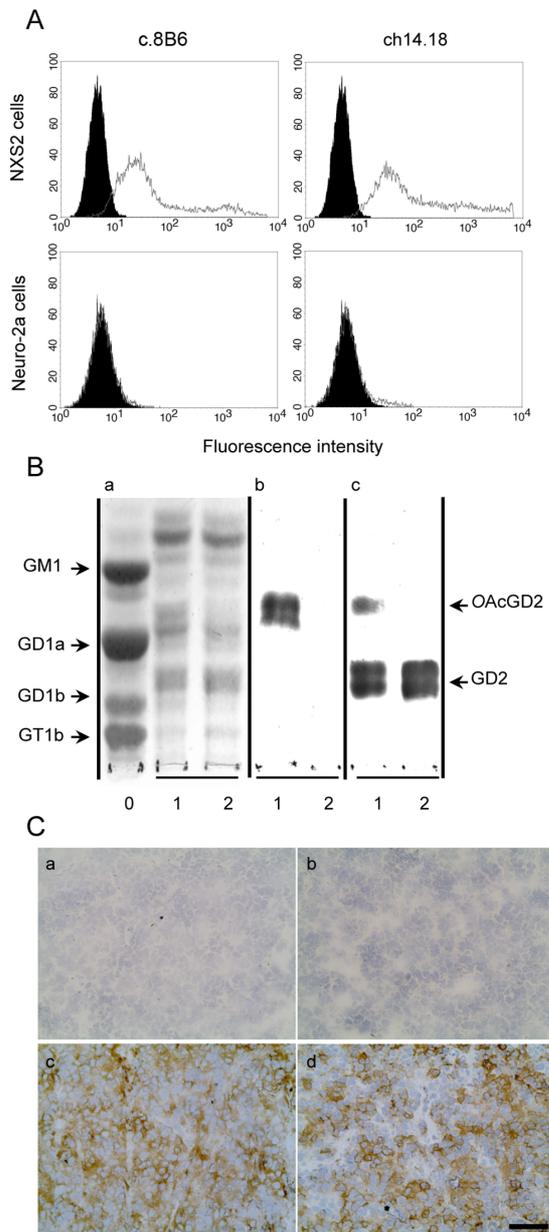


Figure 1. Binding specificity chimeric mAbs c.8B6 and ch14.18 measured by flow-cytometric analysis (A), by TLC-immunostaining (B) and by immunohistochemistry on NXS2 tumor (C). (A) NXS2 and the OAcGD2/GD2⁻ Neuro2A cells were stained as described in Materials and Methods. Representative flow cytometry histogram of OAcGD2 expression. Antibody c.8B6 or mAb ch14.18 (grey) and control antibody (black). The same staining pattern was observed for mAb c.8B6 or ch14.18 on OAcGD2/GD2⁺ NXS2 cells whereas neither mAb c.8B6 nor mAb ch14.18 bind OAcGD2/GD2⁻ Neuro-2a cells. These experiments were independently replicated 3 times. (B) TLC of gangliosides extracted from rat brain (Lane 0) and NXS2 cells with (Lane 1) or without (Lane 2) alkaline treatment and stained with resorcinol-HCl (Panel a) or immunostained with mAbs c.8B6 (Panel b), or ch14.18 (Panel c). Chimeric mAb 8B6 reacted with the alkali-labile OAcGD2

ganglioside with no cross-reactivity against GD2 ganglioside (Panel b) whereas ch14.18 reacted with GD2 and OAcGD2 (Panel c). The same results were obtained in 3 independent experiments. (C) An immunoperoxidase assay was performed on NX2 neuroblastoma tumor sections as described in Material and Methods. Strong immunostaining was detected on neuroblastoma cells with either mAb c.8B6 (c) or mAb ch14.18 (d). The anti-CD20 chimeric antibody rituximab was used as a negative control (b). No antibody (a). NXS2 neuroblastoma tumors from 6 different mice were tested with the same results. Scale bar = 20 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0087210.g001

Specificity of mAb c.8B6 against OAcGD2

We reported the specificity of mouse mAb 8B6 for OAcGD2 previously [14]. Here, we studied the specific surface binding of chimeric mAbs c.8B6 for OAcGD2. The binding activity of mAb c.8B6 against the mouse neuroblastoma OAcGD2-expressing NXS2 cells was demonstrated using an indirect immunofluorescence assay and flow cytometry analysis as described in the Material and Methods section. As shown in Fig. 1A, c.8B6 mAb stained virtually all NXS2 cells similar to ch14.18 mAb, whereas no staining was observed with the isotype-matched irrelevant antibody Rituximab. We also observed similar results when we studied the binding activity of mAb c.8B6 on NXS2 tumors using an immunoperoxidase assay. As depicted in Fig. 1C, either mAb c.8B6 or ch14.18 strongly stained NXS2 tumor sections, respectively. The IgG1 isotype control antibody was also negative (Fig. 1C).

We also confirmed c.8B6 mAb specificity for OAcGD2 by I-TLC analysis. Analysis of the ganglioside composition revealed that NXS2 cells contained at least 7 ganglioside species (Fig. 1B, Panel a, Lane 1). After base treatment, the intensity of the ganglioside specie migrating between GD1a and GM1 diminished (Lane 2). This ganglioside specie was identified as OAcGD2 by mAb c.8B6 (Panel b, Lane 1). Its activity against OAcGD2 was lost after alkaline treatment (Panel b, Lane 2) due to the O-acetyl function hydrolysis during alkaline treatment. Importantly, mAb c.8B6 stained exclusively OAcGD2 when tested on total NXS2 neuroblastoma gangliosides (Panel b, Lane 1). In particular, no cross-reaction with GD2 ganglioside was detected before (Panel b, Lane 1) or after (Panel b, Lane 2) alkaline treatment. In the same experiment, we examined the binding activity of mAb ch14.18. Fig. 1B shows that mAb ch14.18 bound specifically to GD2 and cross-reacted to OAcGD2 (Panel c, Lane 1). After alkaline treatment no binding activity to OAcGD2 was observed (Panel c, Lane 2). Taken together, these results demonstrate that chimeric mAb 8B6 retained the same specificity to OAcGD2 as the mouse parental mAb 8B6 with no cross-reactivity to GD2 ganglioside.

Determination of Binding Parameters

A K_d value of 32 nM has previously been reported for mouse mAb 8B6 to OAcGD2 [14]. Here, we delineated the binding affinity (K_d) of both chimeric mAbs c.8B6 and ch14.18 against their respective epitopes using ¹²⁵I-labeled chimeric mAbs c.8B6 and ch14.18. In our radiolabeling antibody experiments, ¹²⁵I-labeled mAb c.8B6 was found to be 48.8% immunoreactive, whereas ¹²⁵I-labeled mAb ch14.18 exhibited 51.3% immunoreactivity (Table 1). The non-specific binding was less than 0.8% (data not shown). Simultaneous analysis of homologous and heterologous competitive binding data using NXS2 cells (Fig. 2) allowed us to obtain an estimate of the K_d values of both antibodies for GD2 and OAcGD2, as well as of the expression of GD2 and OAcGD2 molecules at the surface of NXS2 cells (Table 1). Such a simultaneous analysis of binding data obtained under a variety of conditions is made possible by the Equilibrium Expert software [21] which runs as an add-in to Microsoft® Excel.

A partition function, involving the concentrations of the different free molecular species and of the different complexes present in the experiment, is used to describe the experimental system. Binding parameters are estimated by non-linear least square fitting of experimental measurements with user-defined weighting of the experimental data. As shown in Table 1, the estimate of the average number of OAcGD2 binding sites was $0.5 \pm 0.2 \times 10^6$ molecules per NXS2 cell whereas the average number of GD2 binding sites was $1.0 \pm 0.1 \times 10^6$ per NXS2 in accordance with results obtained with other techniques. The Kd value of mAb c.8B6 for OAcGD2 was estimated as 87.7 ± 28.7 nM (Table 1), and the Kd values of mAb ch14.18 for GD2 and OAcGD2 were 22.6 ± 2.2 and 626 ± 180 nM, respectively (Table 1). Curve fitting for the competition of labeled ch14.18 by unlabeled c.8B6 was improved by assuming that c.8B6 has a weak affinity (Kd > 1 μ M) for GD2 (Fig. 2D).

Chimeric mAb c.8B6 Induces CDC and ADCC in vitro against OAcGD2-expressing Neuroblastoma Cells

In a previous work we described the capacity of the parental mouse mAb 8B6 to induce CDC and ADCC against NXS2 cells [14]. Here, we evaluated and compared the capacity of chimeric

Table 1. Binding properties of mAbs c.8B6 and ch14.18 on NXS2 cells*.

| Antibody | Immunoreactivity (%) | Kd (nM) | | Binding site ($\times 10^6$) | |
|----------|----------------------|-----------------|---------------|--------------------------------|---------------|
| | | OAcGD2 | GD2 | OAcGD2 | GD2 |
| c.8B6 | 48.8 | 87.7 ± 28.7 | >1000 | 0.5 ± 0.2 | – |
| ch14.18 | 51.3 | 22.6 ± 2.2 | 626 ± 180 | – | 1.0 ± 0.1 |

*Determined as described in the Material and Methods Section. Data are presented as the mean \pm SEM for three independent experiments, each in triplicate.

doi:10.1371/journal.pone.0087210.t001

mAbs c.8B6 and ch14.18 to induce CDC in the presence of human serum and ADCC by NK-92-RF γ III+. For the CDC assay, NXS2 cells were incubated with various concentrations of mAbs in the presence of human serum as a source of complement. Cell death was assessed by the addition of the viability probe propidium iodide. CDC was observed with either chimeric mAb c.8B6 or mAb ch14.18 (Fig. 3A). Cytotoxicity was correlated with

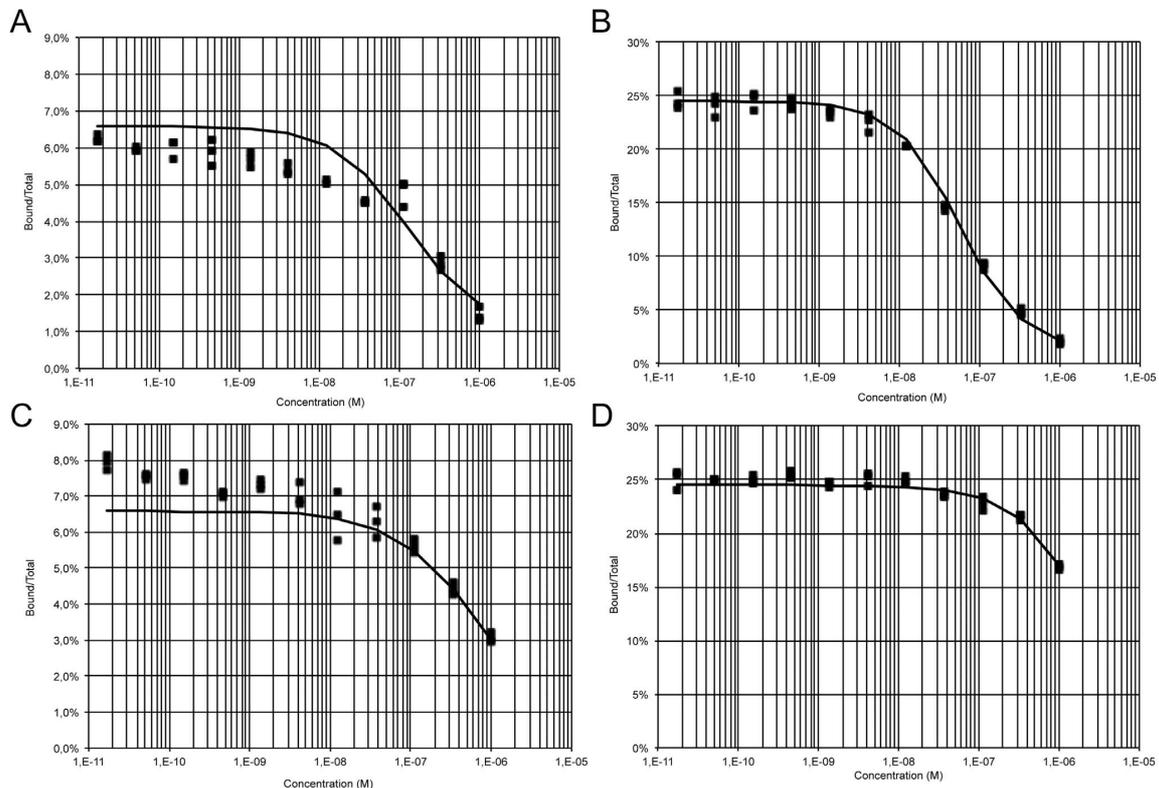


Figure 2. Binding curves of mAb c.8B6 and mAb ch14.18. Iodine-125-labeled mAbs (c.8B6 and ch14.18) were competed with unlabeled mAbs for binding to OAcGD2- and GD2-positive NXS2 cells for 2 h at 4°C. Cell-bound radioactivity was separated from free antibody by centrifugation through a dibutylphthalate oil cushion in triplicates and counted. Competition binding curves were plotted as bound/total (B/T) as a function of competing antibody concentration (solid squares). Binding curves were simulated with the Equilibrium Expert software (solid lines). (A), iodine-125-labeled c.8B6 mAb was competed with mAb c.8B6 (A); (B), iodine-125-labeled ch 14.18 mAb was competed with mAb ch 14.18; (C) iodine-125-labeled c.8B6 mAb was competed with mAb ch 14.18; (D), iodine-125-labeled ch 14.18 mAb was competed with mAb c.8B6. Estimated binding parameters are given in Table 1.

doi:10.1371/journal.pone.0087210.g002

the concentration of antibody. Specific lysis achieved maximum values of $31.3 \pm 0.3\%$ with chimeric mAb ch14.18 and $22.7 \pm 0.7\%$ with chimeric mAb c.8B6, at $10 \mu\text{g}/\text{mL}$. The differences in CDC between mAbs c.8B6 and ch14.18 were statistically significant ($p < 0.01$). We next calculated the EC_{50} of both mAb c.8B6 and ch14.18. The EC_{50} value for c.8B6 was $0.65 \pm 0.04 \mu\text{g}/\text{mL}$ and the EC_{50} value of mAb ch14.18 was $0.85 \mu\text{g}/\text{mL} \pm 0.04 \mu\text{g}/\text{mL}$ (data not shown). These data suggest that mAb c.8B6 had similar potency as mAb ch14.18. Specific lysis was demonstrated by comparing the CDC results of mAbs c.8B6 and ch14.18 with the

non-specific IgG1 control using Rituximab, which showed only background lysis (Fig. 3A).

For the ADCC assay, NXS2 cells were labeled with the PKH-26 membrane dye, and incubated with various concentration of either chimeric mAbs c.8B6 or ch14.18. The NK-92-RF γ III+ cells were used as effector cells at 12 to 1 effector-to-target ratio. After incubation, cell death within the PKH-26+ target cell population was detected by the addition of the viability probe TP3. As shown in Fig. 3B, ADCC was observed with either chimeric mAb c.8B6 or ch14.18 on the NXS2 cells. Specific lysis achieved maximum values of $19.2 \pm 1.3\%$ for mAb ch14.18 and $11.5 \pm 1.5\%$

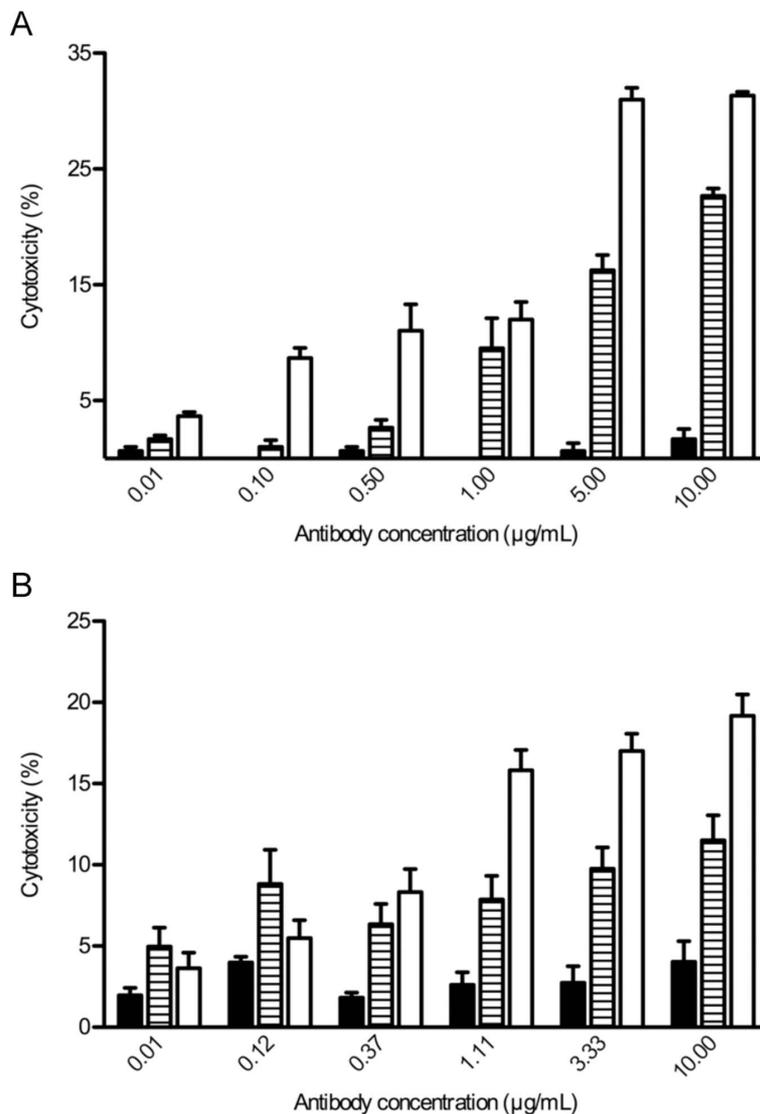


Figure 3. Immune effector functions of both mAbs c.8B6 and ch14.18. (A) Complement-dependent specific lysis was determined for the NXS2 cells as described in Materials and Methods. (B) The NK-92-RF γ III+ ADCC activity with NXS2 target cells at E/T ratio 12 to 1 as described in Materials and Methods. Horizontally hatched columns, mAb c.8B6; white columns, mAb ch14.18; black columns, irrelevant antibody. Data are presented as the mean \pm SEM for three independent experiments, each in triplicate. doi:10.1371/journal.pone.0087210.g003

for chimeric mAb c.8B6. The differences in ADCC between mAbs c.8B6 and ch14.18 were statistically significant ($p < 0.01$). The ADCC activity of mAb c.8B6 was 2.8-fold weaker than mAb ch14.18 when their EC_{50} values were compared, with an EC_{50} value for mAb ch14.18 of 0.64 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and an EC_{50} value for mAb c.8B6 of 1.81 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (data not shown). Maximum capacity of lysis by NK-92-RFc γ III+ was determined to be $64.7 \pm 4.8\%$ with the NK-sensitive mouse T cell lymphoma YAC-1 as a target cell (data not shown). Specificity was demonstrated by comparing the ADCC results of either mAb c.8B6 and ch14.18 with the isotype-match irrelevant mAb Rituximab, which showed only background lysis (Fig. 3B). These results suggest that mAb ch14.18 had higher potencies *in vitro* than did mAb c.8B6.

Chimeric Antibody c.8B6 Demonstrates Anti-neuroblastoma Activity *in vivo*

We next determined the anti-tumor efficacy of chimeric mAb c.8B6 using the NXS2 mouse neuroblastoma experimental liver metastasis model [25], and compared its effects to that obtained with mAb ch14.18. This model was previously used by Zeng *et al.* for the preclinical evaluation of mAb ch14.18 [26]. We found that the treatment of mice ($n = 6$) at the dose of 25 μg of either mAb c.8B6 or mAb ch14.18/day for 5 days was effective in reducing neuroblastoma liver metastasis, as indicated by decreased liver weight from from 2.3 \pm 0.2 g (PBS) to 1.1 \pm 0.1 g (mAb c.8B6 treated mice) and 1.2 \pm 0.2 g for ch14.18 ($p < 0.05$) (Fig. 4A and 4B). The effect of c.8B6 treatment was not statistically different from that obtained upon treatment with ch14.18 ($p = 0.94$). The specificity of mAb c.8B6 therapy was demonstrated, since treatment with an equivalent amount of the anti-CD20 isotype-matched control antibody Rituximab was completely ineffective. The liver weight in the latter group was found to be 2.2 \pm 0.3 g (Fig. 4A).

OAcGD2 Ganglioside is not Present in the Serum of NXS2 Neuroblastoma Tumor-bearing Mice

Patients with neuroblastoma were found to have significantly elevated free GD2 levels in serum compared with normal children [30]. Therefore we determined whether the OAcGD2 antigen could be detected in the circulation by analyzing the reactivity of mAb c.8B6 with gangliosides extracted from NXS2 tumor-bearing mice. Gangliosides extracted from 1 ml of serum were separated on a TLC plate and immunostained to assess the binding using an immunoperoxidase assay. Fig. 5 clearly depicts that OAcGD2 is absent in the sera of mouse bearing NXS2 neuroblastoma tumors (Panel b, Lane 2), whereas mAb ch14.18 reacts strongly with GD2 present in the serum (Panel c, Lane 2). Neither OAcGD2 nor GD2 could be detected in normal mouse serum samples (Panel b and c, Lane 1). These data suggest that either OAcGD2 is not shed *in vivo* or that after shedding it might be deacetylated by esterase activity in the serum to yield GD2.

Chimeric Antibody c.8B6 to OAcGD2 does not Induce Allodynia in Contrast to Anti-GD2 mAb ch14.18

Intravenous infusion of the anti-GD2 antibody in patients is frequently associated with rapid onset spontaneous pain and mechanical allodynia [5,31]; bolus injection in rats causes quantifiable allodynia within 30 minutes [27]. Location of GD2 ganglioside in peripheral nerves in combination with the ability of anti-GD2 antibodies to induce complement activation and ectopic firing of C 'pain' fibers are contributing factors to anti-GD2 antibody induced-allodynia [9,32]. Therefore, we next compared allodynia evoked by mAbs c.8B6 and ch14.18. First, we analysed

mAb c.8B6 reactivity against rat sural nerves by immunohistochemistry using an immunoperoxidase assay. The absence of OAcGD2 expression on human peripheral nerves was reported previously [14]. Figure S1 shows that mAb 8B6 does not bind to rat peripheral nerves (Panel c) whereas mAb ch14.18 reacts with some of the nerves fibers (d). No staining was observed with the control chimeric mAb Rituximab (Panel a). We also used a mAb specific to CD56 mAb as a positive control (Panel e).

After demonstrating that mAb c.8B6 did not bind peripheral nerves in rats, we compared mAb c.8B6 to ch14.18 *in vivo* by injecting one or the other antibody into the rat tail vein and testing mechanical allodynia (Fig. 6A). Prior to injection, rats in all groups had 50% probability withdrawal thresholds at cut-off (15.1 g). After IV injection of IgG1-isotype matched irrelevant control antibody, thresholds were essentially unchanged for the next 5 hours and percent allodynia averaged 10.83 g \pm 4.6, this modest decrease in withdrawal threshold probably results from peripheral sensitization due to repeated testing within a relatively short period of time. Injection of mAb ch14.18 (1 mg/kg) caused thresholds to fall precipitously (Fig. 6B). One hour post-injection, mean mechanical threshold was 4.92 g \pm 0.4 and remained low, between 3.8 and 5.2 g, for the next 4 hours. Mean percent allodynia for this group was 60.0 \pm 1.8 (Fig. 6B). These results duplicated those reported in earlier studies [9,27]. In contrast, animals treated with either 1 or 3 mg/kg of c.8B6 did not develop allodynia, mean withdrawal thresholds for the animals given the higher dose of c.8B6 were never below 11.5 g for the entire duration of the experiment (Fig. 6A). After mAb c.8B6 injection, percent allodynia was no different that seen in IgG1 control antibody- groups (Fig. 6B).

Discussion

Anti-GD2 antibody is a proven therapy for GD2-positive neuroblastoma and mAb against GD2 and their derivatives, such as chimeric mAb ch14.18, have provided benchmarks for improving anti-GD2 therapy [3]. Pain can, however, hinder immunotherapy with anti-GD2 therapeutic antibodies such as ch14.18 [3]. The adverse effects are attributed to inflammatory effects via complement activation on GD2-expressing nerves [8,9]. Consideration for these factors impedes the development of treatment intensification strategies to improve the outcome of neuroblastoma patients. We reported earlier that the O-acetyl derivative of GD2, OAcGD2, is not expressed by human peripheral nerve fibers using the specific mouse mAb 8B6 to OAcGD2. Thus, we suggested that antibodies targeting OAcGD2 offer an effective treatment option with reduced adverse side effects [14]. Human anti-mouse antibody (HAMA) is, however, a limiting factor. Therefore, we established a mouse-human chimeric antibody in order to reduce potential immunogenicity in patients and to fill the need for a selective agent that can kill neuroblastoma cells without inducing neurotoxicity caused by anti-GD2 antibody immunotherapy. We further analyzed some of its functional properties compared with the anti-GD2 ch14.18 therapeutic antibody used in the treatment for children with high-risk neuroblastoma, after stem cell transplant [3].

One criterion for successful chimerization is the preservation of specificity and affinity during genetic engineering. Analogous to its murine counterpart, we showed here that c.8B6 bound to OAcGD2 with reduced or very low cross reactivity against GD2 with an equivalent Kd value [14]. This Kd value is within the range of other anti-ganglioside antibodies reported by others [33,34,35]. We also demonstrated that ch14.18 antibody retained the same specificity as its parental mouse antibody against GD2

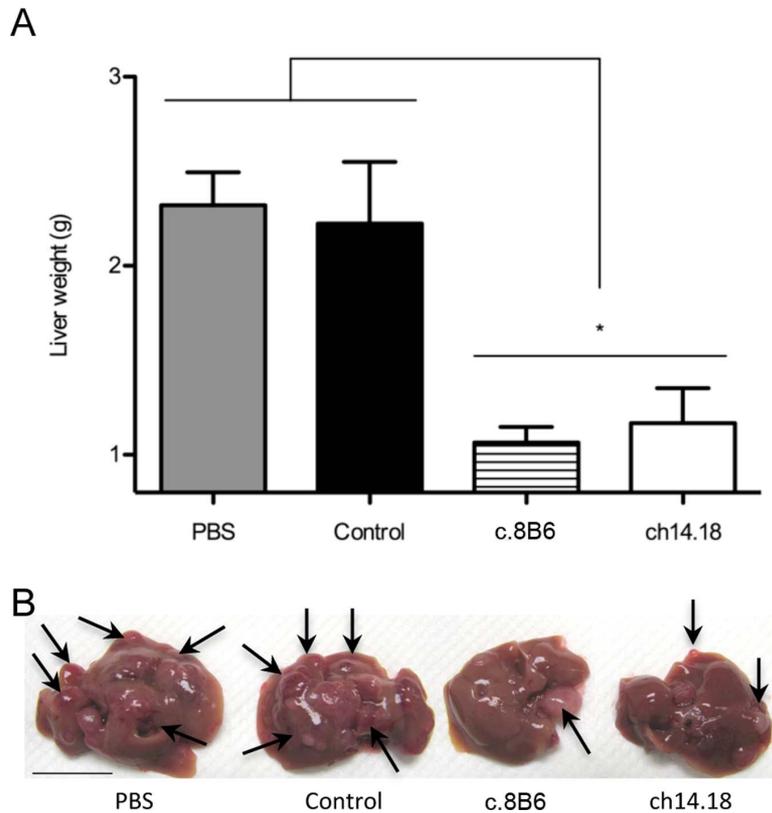


Figure 4. Anti-neuroblastoma activity of mAb c.8B6 against established experimental liver metastasis. Mice ($n=6/\text{group}$) were inoculated with 1×10^5 NX52 cells by IV injections. Treatment was initiated three days after tumor cells inoculation and consisted of 5 daily IV injections of 25 μg of mAb c.8B6, mAb ch14.18, and anti-CD20 antibody. Mice were euthanised 28 days post-tumor cell inoculation. (A) The liver weight was determined on fresh specimen. The y-axis starts at 0.8 g corresponding to the average normal liver weight. Data are presented as the mean \pm SEM. The differences in mean liver weight between experimental groups treated with mAbs c.8B6 and ch14.18 and all control groups (PBS, control antibody) was statistically significant ($*p < 0.05$). (B) Representative liver specimen of each experimental group is shown. Arrows indicate the location of macroscopic liver metastasis. (Scale bar = 1 cm).
doi:10.1371/journal.pone.0087210.g004

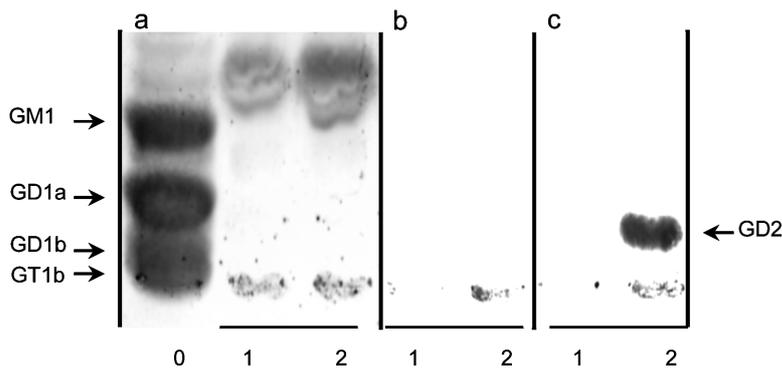


Figure 5. Absence of mAb 8B6-specific OAcGD2 in mouse neuroblastoma sera. I-TLC of gangliosides from rat brain (Lane 0), NX52 neuroblastoma tumor bearing mice sera (Lane 2), and mouse control sera (Lane 1) stained with resorcinol-HCl (Panel A) or immunostained with chimeric mAbs c.8B6 (Panel B), or ch14.18 (Panel C). Total ganglioside fractions presented in lanes 2 and 3 represents 1 ml of serum. Ganglioside GD2 was detected in the neuroblastoma-tumor bearing mice but not in the control sera when mAb ch14.18 was used. In contrast, no OAcGD2 was detected in sera from neuroblastoma-tumor bearing mice and control mouse sera when either mAb c.8B6 or ch14.18 was tested. Serums from 6 different mice were tested with the same results.
doi:10.1371/journal.pone.0087210.g005

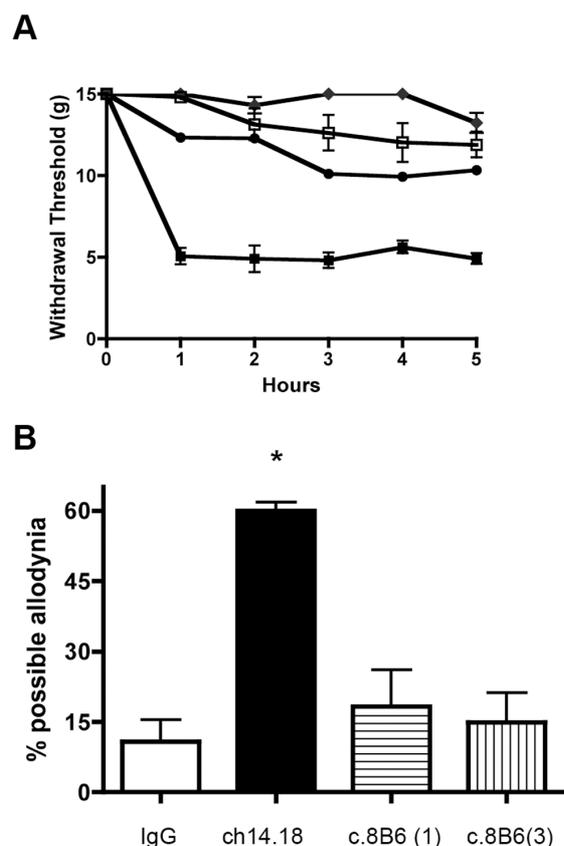


Figure 6. Intravenous injection of mAb c.8B6 does not induce allodynia. (A) Intravenous injection of either 1 mg/kg (●) or 3 mg/kg (◆) of mAb c.8B6 in Sprague-Dawley rats did not result in a decrease in mechanical thresholds. In contrast, ch14.18 injected at 1 mg/kg (■) resulted in a prolonged decrease in threshold. Threshold of animal injected with anti-CD20 chimeric control antibody rituximab (1 mg/kg) (□) are shown for comparison. (B) Results shown in panel B were recalculated as area under the curve and then normalized such that 100 would be equal to a theoretical maximal allodynia. Animals administered ch14.18 displayed more allodynia than any of the other treatment groups ($p \leq 0.0001$). doi:10.1371/journal.pone.0087210.g006

[12]. We further calculated ch14.18's affinity for the OAcGD2 epitope, which has not yet been reported, using a cell-binding competition assay. Antibody ch14.18 and c.8B6 compete with each other for binding to the GD2 and OAcGD2 antigen expressed at the cell surface, and ch14.18 showed an apparent approximately 9-fold weaker binding affinity than c.8B6. Moreover, these data allowed us to demonstrate that the number of OAcGD2 molecules present at the tumor cell surface, although 50% of GD2 binding site, is within the range of that of the mAb ch14.18 epitope. These results are in agreement with our previous report [14].

Ch14.18 and other anti-GD2 antibodies have been shown to induce ADCC as well as CDC in GD2-expressing cell lines. A number of preclinical studies have, however, shown that ADCC, is a major mechanism of action of ch14.18 mAb against GD2-expressing cell lines [26]. ADCC is associated with the Fc region of the antibody, and Fc/Fc γ R interaction is believed to be the

mechanism for ADCC. The ADCC effects have been correlated with Fc γ R interaction affinity for a number of antibodies. Furthermore, the importance of ADCC has also been shown by clinical trials, which have provided evidence of significant correlation between Fc γ RIIIa functional polymorphisms and clinical outcomes, demonstrated by multiple therapeutic antibodies, including rituximab [36], trastuzumab [37], cetuximab [38], and infliximab [39]. Thus, ADCC is now considered an important clinical mechanism, and enhancing ADCC has become a logical approach to improve the efficacy of anti-GD2 therapeutic antibodies [9] [40]. There is significant variation in the affinities of IgG isotypes for individual Fc receptors, which is reflected by the capacity of active isotypes to recruit immune effector cells efficiently based on their Fc γ receptor expression profile. Fragment Fc-related functions also included long serum half-lives through interaction with the neonatal Fc receptor (FcRn). IgG1 is considered the principal active human isotype based on its comparative affinities for activating receptors [41] and FcRn [42]. Thus, we developed the chimeric c.8B6 with a human IgG1 isotype and demonstrated that anti-OAcGD2 c.8B6 antibody seems particularly effective as compared to ch14.18 therapeutic antibody. Nonetheless, we did observe a 2.8-fold higher ADCC potency of ch14.18. This may due to its binding to both GD2 and OAcGD2, while c.8B6 only binds to the latter. The ch14.18's ADCC activity against NXS2 neuroblastoma cells reported here is, however, weaker than that reported earlier by Zeng *et al.* [26]. These differences may be related to the chromium-51 release assay used in their study to quantify ch14.18's ADCC properties. Here we used the flow cytometry-based assay developed by Wilkinson *et al.* [22] because of the alkaline pH of the sodium chromate solution that remove the O-acetyl function of OAcGD2. Thus, this assay may be less sensitive than the chromium-51 release assay.

The use of GD2 antibody in the treatment of cancers also leads to complement dependent cytotoxicity (CDC) [43]. The relationship between complement activation and antibody anti-tumor activity is also suggested for a number of anti-tumor therapeutic antibodies. One of the most convincing examples of the therapeutic importance of this activity is the good clinical responses seen in a phase I study of ofatumumab [44], a second-generation anti-CD20 antibody, which is capable of inducing much more potent CDC activity than rituximab due to its distinct epitope [45]. As mentioned above, all anti-GD2 antibodies mediate efficient CDC [43], and our data suggest that anti-OAcGD2 c.8B6 antibody induces significant, but 4-fold weaker CDC, as compared to ch14.18 therapeutic antibody. This difference may be linked to the lower c.8B6 target site number expressed by the tumor cell as compared to ch14.18 antibody. Yet, anti-GD2 antibody CDC activity is believed to be responsible for the pain side effects [9]. Thus, leveraging ADCC over CDC is one strategy currently used to further optimize the potential clinical efficacy of anti-GD2 antibodies [9,46]. As an example, a new version of the ch14.18 antibody, hu-14.18K322A, has been made. Hu14.18K322A is a humanized ch14.18 with a single point mutation to alanine at lysine 322 that limits its ability to activate the complement cascade and thereby reduces the pain associated with ch14.18 while retaining its ADCC capabilities. Preclinical studies in rats confirmed that hu14.18K322 elicited substantially less allodynia than ch14.18 [9]. The impact of reduced CDC activity on its anti-tumor potency, however, awaits further clinical investigations. Given these considerations, an overdrive of CDC is probably desirable to further enhance anti-OAcGD2 mAb anti-tumor activity.

We also evidenced earlier that the parental mouse mAb 8B6 induce apoptosis as well [14,47]. Apoptosis induced by anti-

OAcGD2 mAbs is another mechanism that may contribute to their antitumor effects [48]. We were, however, unable to detect apoptosis after tumor cells treatment with either ch14.18 or c.8B6 mAbs in our experiments. The loss of pro-apoptotic activity upon chimerization of mouse mAb 60C3 specific for GD2 ganglioside was also observed previously [17]. Although the cell death mechanism initiated by the mouse mAb 8B6 have not been yet elucidated, our results suggest that the pro-apoptotic activity of anti-GD2 and anti-OAcGD2 mAbs can not fully explained by their sole antigen recognition activity. This question is currently under investigation in our laboratory.

The main purpose of our study was to compare the *in vivo* anti-tumor effect of chimeric c.8B6 to ch14.18 therapeutic antibody on neuroblastoma tumors. Therefore we evaluated the anti-neuroblastoma activity of c.8B6 in the syngeneic NXS2 mouse neuroblastoma in A/J mice as used previously in the preclinical setting of mAb ch14.18 by Zeng *et al.* [26]. Despite a weaker anti-tumor activity measured *in vitro*, we demonstrated here that c.8B6 was able to inhibit NXS2 liver metastasis as efficiently as the ch14.18 therapeutic. More importantly, our *in vivo* studies in rat showed that intravenous c.8B6 treatment did not induce allodynia as compared to ch14.18. Our results confirm earlier findings demonstrating profound mechanical allodynia resulting from intravenous ch14.18 treatment due to peripheral nerve cross-reactivity [9]. Our principal novel finding here is that anti-OAcGD2 mAb c.8B6 did not induce allodynia, even at the dose of 3 mg/kg. The mechanical withdrawal threshold values observed in the rats receiving mAb c.8B6 infusion was comparable to that observed with anti-CD20 rituximab mAb used as a non-specific antibody. These data were consistent with the absence of c.8B6 mAb binding activity with rat peripheral nerves, and argue that antibodies targeting OAcGD2 may offer an effective option for the development of treatment intensification strategies.

Studies by others demonstrated that GD2 is circulating in the sera of neuroblastoma patients [30]. Schulz *et al.* demonstrated further that GD2 serum levels inhibited anti-GD2 mAb binding to the corresponding neuroblastoma targets *in vitro* [30]. Our data demonstrate the absence of circulation OAcGD2 in the mice sera

and suggest that OAcGD2 is either not shed *in vivo* or else is deacetylated by ample esterase activity in the serum to yield GD2 after shedding. The clinical relevance of these findings on anti-GD2 mAb pharmacokinetics properties, however, needs to be investigated.

Thus, c.8B6 antibody is a novel agent that possesses the same anti-neuroblastoma attributes as therapeutic anti-GD2 mAb when tested in cell-based assay and *in vivo* in an animal model. The absence of OAcGD2 expression of nerve fibers and the lack of allodynia—which are believed to play a major role in mediating anti-GD2 mAb dose-limiting side effects—provide an important rationale for the *in vivo* application of c.8B6 in patients with high-grade neuroblastoma.

Supporting Information

Figure S1 An immunoperoxidase assay was performed as described in Material and Methods on sural rat nerves. Antibody c.8B6 did not react with nerve fibers (b) whereas myelin sheaths were stained with mAb ch14.18 (c). The anti-CD20 chimeric antibody was used as a negative control (a) and the anti-CD56 mAb as a positive control (d). Scale bar = 50 μ m. (TIF)

Acknowledgments

We thank Gaetane Wielgoz, Jeff Abrahamson, CYTOCELL, the P2R protein-, UTE-, and the PT radioactivity-facilities of the *Structure Fédérative de Recherche Français Bonamy* for technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MT MD DC LSS SB. Performed the experiments: MT MD DC WX SB TC. Analyzed the data: MT MD DC WX JB LSS SB. Contributed reagents/materials/analysis tools: MBD JB ALY. Wrote the paper: MT MD JB ALY FP LSS SB.

References

- Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL (2007) Neuroblastoma. *Lancet* 369: 2106–2120.
- Matthay KK, Reynolds CP, Seeger RC, Shimada H, Adkins ES, *et al.* (2009) Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a children's oncology group study. *J Clin Oncol* 27: 1007–1013.
- Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, London WB, Kreissman SG, *et al.* (2010) Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med* 363: 1324–1334.
- Barker E, Mueller BM, Handgretinger R, Herter M, Yu AL, *et al.* (1991) Effect of a chimeric anti-ganglioside GD2 antibody on cell-mediated lysis of human neuroblastoma cells. *Cancer Res* 51: 144–149.
- Cheung NK, Lazarus H, Miraldi FD, Abramowsky CR, Kallieck S, *et al.* (1987) Ganglioside GD2 specific monoclonal antibody 3F8: a phase I study in patients with neuroblastoma and malignant melanoma. *J Clin Oncol* 5: 1430–1440.
- Handgretinger R, Baader P, Dopfer R, Klingebiel T, Reuland P, *et al.* (1992) A phase I study of neuroblastoma with the anti-ganglioside GD2 antibody 14.G2a. *Cancer Immunol Immunother* 35: 199–204.
- Saleh MN, Khazaeli MB, Wheeler RH, Dropcho E, Liu T, *et al.* (1992) Phase I trial of the murine monoclonal anti-GD2 antibody 14G2a in metastatic melanoma. *Cancer Res* 52: 4342–4347.
- Yuki N, Yamada M, Tagawa Y, Takahashi H, Handa S (1997) Pathogenesis of the neurotoxicity caused by anti-GD2 antibody therapy. *J Neurol Sci* 149: 127–130.
- Sorkin LS, Otto M, Baldwin WM 3rd, Vail E, Gillies SD, *et al.* (2010) Anti-GD2 with an FC point mutation reduces complement fixation and decreases antibody-induced allodynia. *Pain* 149: 135–142.
- Kushner BH, Kramer K, Modak S, Cheung NK (2011) Successful multifold dose escalation of anti-GD2 monoclonal antibody 3F8 in patients with neuroblastoma: a phase I study. *J Clin Oncol* 29: 1168–1174.
- Cerato E, Birkle S, Portoukalian J, Mezaizigh A, Chatal JF, *et al.* (1997) Variable region gene segments of nine monoclonal antibodies specific to disialogangliosides (GD2, GD3) and their O-acetylated derivatives. *Hybridoma* 16: 307–316.
- Sjoberg ER, Manzi AE, Khoo KH, Dell A, Varki A (1992) Structural and immunological characterization of O-acetylated GD2. Evidence that GD2 is an acceptor for ganglioside O-acetyltransferase in human melanoma cells. *J Biol Chem* 267: 16200–16211.
- Ye JN, Cheung NK (1992) A novel O-acetylated ganglioside detected by anti-GD2 monoclonal antibodies. *Int J Cancer* 50: 197–201.
- Alvarez-Rueda N, Desselle A, Cochonneau D, Chaumette T, Clemenceau B, *et al.* (2011) A Monoclonal Antibody to O-Acetyl-GD2 Ganglioside and Not to GD2 Shows Potent Anti-Tumor Activity without Peripheral Nervous System Cross-Reactivity. *PLoS One* 6: e25220.
- Khazaeli MB, Saleh MN, Wheeler RH, Huster WJ, Holden H, *et al.* (1988) Phase I trial of multiple large doses of murine monoclonal antibody CO17-1A. II. Pharmacokinetics and immune response. *J Natl Cancer Inst* 80: 937–942.
- Vincent M, Bessard A, Cochonneau D, Teppaz G, Sole V, *et al.* (2013) Tumor targeting of the IL-15 superagonist RLI by an anti-GD2 antibody strongly enhances its antitumor potency. *Int J Cancer* 133: 757–765.
- Alvarez-Rueda N, Leprieux S, Clemenceau B, Supiot S, Sebille-Rivain V, *et al.* (2007) Binding activities and antitumor properties of a new mouse/human chimeric antibody specific for GD2 ganglioside antigen. *Clin Cancer Res* 13: 5613s–5620s.
- Bouchon B, Portoukalian J, Madec AM, Orgiazzi J (1990) Evidence for several cell populations in human thyroid with distinct glycosphingolipid patterns. *Biochim Biophys Acta* 1051: 1–5.
- Popa I, Vlad C, Bodenec J, Portoukalian J (2002) Recovery of gangliosides from aqueous solutions on styrene-divinylbenzene copolymer columns. *J Lipid Res* 43: 1335–1340.
- Svennerholm L (1963) Chromatographic Separation of Human Brain Gangliosides. *J Neurochem* 10: 613–623.

21. Raguin O, Gruaz-Guyon A, Barbet J (2002) Equilibrium expert: an add-in to Microsoft Excel for multiple binding equilibrium simulations and parameter estimations. *Anal Biochem* 310: 1–14.
22. Wilkinson RW, Lee-MacAry AE, Davies D, Snary D, Ross EL (2001) Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: a flow cytometry-based assay using fluorophores. *J Immunol Methods* 258: 183–191.
23. Clemenceau B, Gallot G, Vivien R, Gaschet J, Campone M, et al. (2006) Long-term preservation of antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of natural killer cells amplified in vitro from the peripheral blood of breast cancer patients after chemotherapy. *J Immunother* 29: 53–60.
24. Sjogren HO, Hellstrom I (1965) Induction of polyoma specific transplantation antigenicity in Moloney leukemia cells. *Exp Cell Res* 40: 208–212.
25. Lode HN, Xiang R, Varki NM, Dolman CS, Gillies SD, et al. (1997) Targeted interleukin-2 therapy for spontaneous neuroblastoma metastases to bone marrow. *J Natl Cancer Inst* 89: 1586–1594.
26. Zeng Y, Fest S, Kunert R, Katinger H, Pistoia V, et al. (2005) Anti-neuroblastoma effect of ch14.18 antibody produced in CHO cells is mediated by NK-cells in mice. *Mol Immunol* 42: 1311–1319.
27. Slart R, Yu AL, Yaksh TL, Sorkin LS (1997) An animal model of pain produced by systemic administration of an immunotherapeutic anti-ganglioside antibody. *Pain* 69: 119–125.
28. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53: 55–63.
29. Dixon WJ (1980) Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 20: 441–462.
30. Schulz G, Cheresch DA, Varki NM, Yu A, Staffileno LK, et al. (1984) Detection of ganglioside GD2 in tumor tissues and sera of neuroblastoma patients. *Cancer Res* 44: 5914–5920.
31. Wallace MS, Lee J, Sorkin L, Dunn JS, Yaksh T, et al. (1997) Intravenous lidocaine: effects on controlling pain after anti-GD2 antibody therapy in children with neuroblastoma—a report of a series. *Anesth Analg* 85: 794–796.
32. Xiao WH, Yu AL, Sorkin LS (1997) Electrophysiological characteristics of primary afferent fibers after systemic administration of anti-GD2 ganglioside antibody. *Pain* 69: 145–151.
33. Cheresch DA, Rosenberg J, Mujoo K, Hirschowitz L, Reisfeld RA (1986) Biosynthesis and expression of the disialoganglioside GD2, a relevant target antigen on small cell lung carcinoma for monoclonal antibody-mediated cytotoxicity. *Cancer Res* 46: 5112–5118.
34. Mujoo K, Kipps TJ, Yang HM, Cheresch DA, Wargalla U, et al. (1989) Functional properties and effect on growth suppression of human neuroblastoma tumors by isotype switch variants of monoclonal antiganglioside GD2 antibody 14.18. *Cancer Res* 49: 2857–2861.
35. Nakamura K, Tanaka Y, Shitara K, Hanai N (2001) Construction of humanized anti-ganglioside monoclonal antibodies with potent immune effector functions. *Cancer Immunol Immunother* 50: 275–284.
36. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, et al. (2002) Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 99: 754–758.
37. Gennari R, Menard S, Fagnoni F, Ponchio L, Scelsi M, et al. (2004) Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clin Cancer Res* 10: 5650–5655.
38. Taylor RJ, Chan SL, Wood A, Voskens CJ, Wolf JS, et al. (2009) FcγRIIIa polymorphisms and cetuximab induced cytotoxicity in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Immunol Immunother* 58: 997–1006.
39. Louis E, El Ghou Z, Vermeire S, Dall'Ozzo S, Rutgeerts P, et al. (2004) Association between polymorphism in IgG Fc receptor IIIa coding gene and biological response to infliximab in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 19: 511–519.
40. Ahmed M, Goldgur Y, Hu J, Guo HF, Cheung NK (2013) In silico driven redesign of a clinically relevant antibody for the treatment of GD2 positive tumors. *PLoS One* 8: e63359.
41. Stęplewski Z, Sun LK, Shearman CW, Ghrayeb J, Daddona P, et al. (1988) Biological activity of human-mouse IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 chimeric monoclonal antibodies with antitumor specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 4852–4856.
42. Hinton PR, Jöhls MG, Xiong JM, Hanestad K, Ong KC, et al. (2004) Engineered human IgG antibodies with longer serum half-lives in primates. *J Biol Chem* 279: 6213–6216.
43. Imai M, Landen C, Ohta R, Cheung NK, Tomlinson S (2005) Complement-mediated mechanisms in anti-GD2 monoclonal antibody therapy of murine metastatic cancer. *Cancer Res* 65: 10562–10568.
44. Hagenbeek A, Gadeberg O, Johnson P, Pedersen LM, Walewski J, et al. (2008) First clinical use of ofatumumab, a novel fully human anti-CD20 monoclonal antibody in relapsed or refractory follicular lymphoma: results of a phase 1/2 trial. *Blood* 111: 5486–5495.
45. Teeling JL, Mackus WJ, Wiegman IJ, van den Brakel JH, Beers SA, et al. (2006) The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J Immunol* 177: 362–371.
46. Cheung NK, Guo H, Hu J, Tassev DV, Cheung IY (2012) Humanizing murine IgG3 anti-GD2 antibody m3F8 substantially improves antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity while retaining targeting in vivo. *Oncoimmunology* 1: 477–486.
47. Aixinjueluo W, Furukawa K, Zhang Q, Hamamura K, Tokuda N, et al. (2005) Mechanisms for the apoptosis of small cell lung cancer cells induced by anti-GD2 monoclonal antibodies: roles of anoikis. *J Biol Chem* 280: 29828–29836.
48. Cochemeau D, Terme M, Michaud A, Dorvillius M, Gautier N, et al. (2013) Cell cycle arrest and apoptosis induced by O-acetyl-GD2-specific monoclonal antibody 8B6 inhibits tumor growth in vitro and in vivo. *Cancer Lett* 333: 194–204.

Chapitre III

Obtention d'anticorps chimériques spécifiques du GD2 *O*-acétylé présentant une activité apoptotique

Introduction

Lors de la caractérisation des propriétés anti-tumorales de l'AcM chimérique c.8B6, nous avons observé une perte de propriété apoptotique par rapport à l'AcM parental de souris (résultats non communiqués). Nos observations indiquent que les propriétés apoptotiques de l'AcM murin 8B6 ne reposent pas seulement sur son paratope mais également sur la structure de l'IgG3 de souris. En effet, les IgG3 de souris présentent des propriétés d'agrégation homophile qui impliquent des interactions au niveau de leur fragment Fc (Cooper et al., 1991; Greenspan et al., 1989) mais également, dans certains cas, au niveau des régions variables (Kaminski et al., 1999; Kang et al., 1988; Yan et al., 1996). Il est admis que ces propriétés permettent d'augmenter l'affinité fonctionnelle de cette sous-classe d'AcM mais également de lui conférer des propriétés pro-apoptotiques.

L'AcM 8B6 (IgG3, κ) spécifique du marqueur tumoral GD2-Oac présente une activité pro-apoptotique. Cette propriété est perdue lors de la chimérisation de l'AcM de souris à l'isotype IgG1, κ humain. Cette perte d'activité pro-apoptotique a également été observée lors de la chimérisation de l'AcM 60C3 (IgG3, κ) ciblant le GD2 (Alvarez-Rueda et al., 2007). En effet, l'AcM chimérique c.60C3 (IgG1, κ) présente une activité pro-apoptotique diminuée par rapport à l'AcM de souris parental. De même, la chimérisation de l'AcM R24 (IgG3, κ) anti-GD3 entraîne une diminution des propriétés ADCC et CDC interprété par les auteurs par une perte d'avidité de l'AcM chimérique chR24 (IgG1, κ) (Chapman et al., 1994).

Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse que ces propriétés sont liées à la capacité de coopérativité des IgG3 de souris. Cette sous-classe d'IgG présente des propriétés d'agrégation homophile qui pourraient augmenter son avidité, stabiliser sa liaison à sa cible et induire une cytotoxicité directe par remodelage de la membrane plasmique. Cependant, les régions responsables de ces phénomènes ne sont pas clairement identifiées et plusieurs hypothèses contradictoires sont développées dans la littérature. En effet, certaines études décrivent l'existence de liaisons non-covalentes entre les régions Fc, alors que d'autres indiquent qu'il s'agirait d'interactions VH-VH par des liaisons peptide-peptide spécifiques.

Nous souhaitons donc identifier plus clairement le ou les domaines immunoglobuliniques de l'IgG3 de souris impliqués dans ses propriétés apoptotiques. Il sera alors possible de produire des AcM humanisés aux propriétés cytotoxiques optimisées par rapport à l'AcM chimérique initialement obtenu. Pour répondre à cette question, nous avons construit différents formats d'AcM chimériques combinant des régions de l'IgG1 humaine et

de l'IgG3 murine. L'activité pro-apoptotique de chacune des constructions est ici présentée. Ainsi, nous avons pu produire différents variants d'AcM chimériques ciblant le GD2-Oac et ayant une activité pro-apoptotique. L'ensemble de ces résultats fait l'objet d'un brevet intitulé "Antibody against GD2-O-acetylated ganglioside with pro-apoptotic activity".

Matériels et Méthodes

Anticorps

L'ensemble des AcM produit possède les régions variables de l'AcM murin 8B6 (Cerato et al., 1997). Les régions constantes et variables des AcM sont co-transfectées dans des cellules CHO-S (*chinese hamster ovary*) par la société Evitria (Schleiren, Zürich, Switzerland). Les surnageants sont ensuite purifiés sur une colonne de protéine A, (Hi-Trap Protein A, GE Healthcare). La pureté de la préparation d'AcM est vérifiée par HPLC (Superdex 200, GE Healthcare). La structure des AcM est vérifiée par gel SDS-page. Six microgrammes d'échantillon d'AcM sont déposés sur des gels SDS-page (Biorad). Les échantillons migrent 30 min à 200 volts avant d'être révélés par la solution de coloration Bio-Safe Coomassie G-250 Stain (Biorad) selon les recommandations du fournisseur.

Cellules

Les cellules de neuroblastome humain IMR5 sont cultivées en RPMI 1640 complété par 10% de SVF inactivés, 2 mM de L-Glutamine, 100 UI/ml de penicilline et 100 μ g/ml de streptomycine.

Etude de la séquence des anticorps

Les séquences protéiques des régions constantes des AcM sont obtenues à partir du répertoire IMGT (imgt.org). L'analyse comparative de ces séquences est réalisée à l'aide du logiciel CLC Sequence Viewer (Qiagen, Venlo, Pays-Bas). L'analyse des modifications de structure des AcM est réalisée à partir des données IMGT.

Inhibition de la croissance tumorale

La viabilité cellulaire est mesurée, comme décrit précédemment (Cochonneau et al., 2013) en utilisant un test MTT (Roche). Les cellules (1.10^4 /puits) sontensemencées dans une plaque 96

puits et incubées pendant 24h à 37°C. Les dilutions d'AcM de 80 à 0,15 µg/ml (50 µl) sont ajoutées dans chaque puits. Après 24h d'incubation, 5 µg de MTT sont ajoutés pendant 4h à 37°C avant d'ajouter la solution de solubilisation (SDS 10%). Les cellules sont incubées sur la nuit à 37°C. La valeur A570 nm - A650 nm permet d'obtenir la valeur d'absorbance. La viabilité est exprimée en pourcentage relatif des valeurs des cellules traitées par rapport aux cellules non traitées contrôles. Les AcM anti-GD3-Oac 7H2 (IgG3,κ) et anti-CD20 rituximab (IgG1,κ) sont utilisés comme contrôles isotypiques.

Résultats et discussion

Première génération :

Dans un premier temps, nous avons cherché à identifier les domaines de l'IgG3 murine impliqués dans sa capacité pro-apoptotique. Pour cela, nous avons construit différents AcM chimériques dans lesquels un ou plusieurs domaines de l'IgG3 murine ont été substitués par le même domaine de l'IgG1 humaine (Figure 1). Pour chacune de ces constructions, ainsi produites, nous avons, dans un premier temps, vérifié par SDS-page la structure (Figure 2), puis évalué les propriétés de cytotoxicité directe par test MTT. Nous avons, par l'intermédiaire de courbes effets-doses, déterminé un maximum observé à la concentration 80 µg/ml (Figure 3).

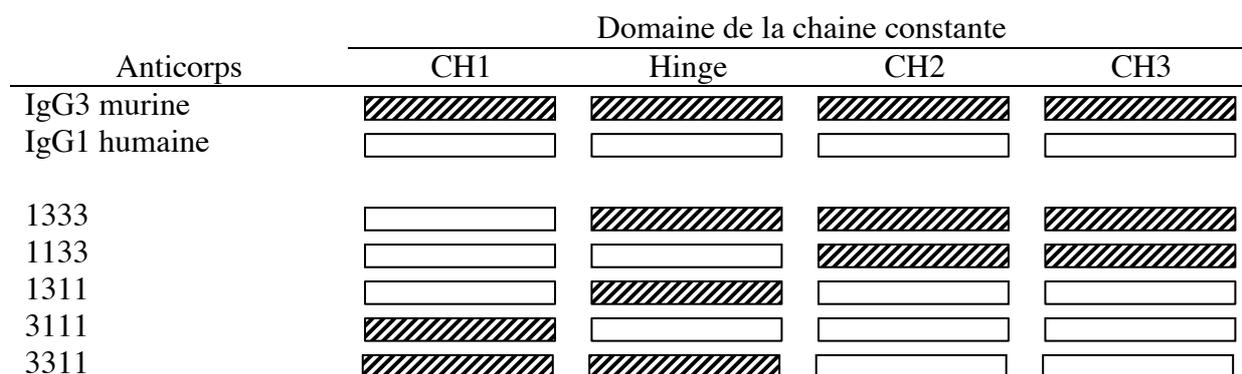


Figure 1 : Représentation schématique des constructions d'anticorps chimériques IgG1 humaines/IgG3 murines de la première génération.

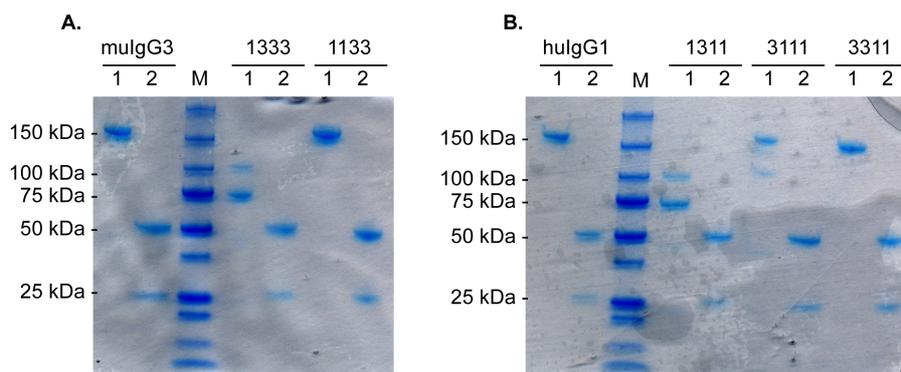


Figure 2 : Analyse des anticorps chimériques anti-GD2-Oac, de la première génération, par SDS-page. Les différents anticorps sont analysés en conditions non dénaturantes (colonne 1) et dénaturantes (colonne 2). Les anticorps composés du CH2/CH3 de l'IgG3 murine sont représentés en A en utilisant le 8B6 (muIgG3) comme contrôle. Les anticorps composés du CH2/CH3 de l'IgG1 humain sont représentés en B en utilisant le c.8B6 (huIgG1) comme contrôle.

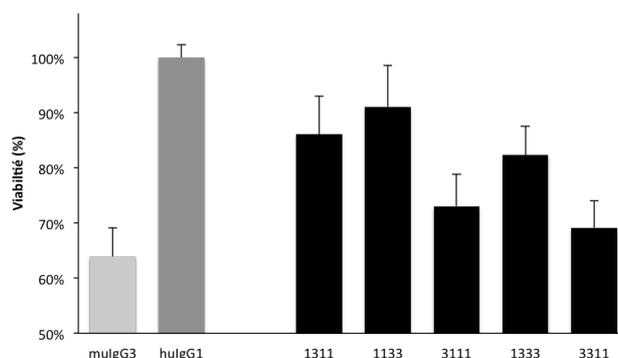


Figure 3 : Cytotoxicité directe des anticorps chimériques IgG1 humaines/IgG3 murines de la première génération. Les cellules sont traitées comme décrit dans la section Matériels et Méthodes. La viabilité cellulaire est mesurée par test MTT. Les résultats représentent le pourcentage de viabilité par rapport aux cellules contrôles non traitées après 24h de traitement à 80 μ g/ml pour chaque anticorps. Les résultats sont obtenus sur trois expériences indépendantes et sont représentés en moyenne \pm SD.

L'analyse par SDS-page des différents anticorps montre dans un premier temps, des mésappariements des constructions 1333 et 1311 au niveau des liaisons cystéine-cystéine dans les ponts disulfure assurant la stabilité de l'AcM. En effet, on observe l'absence de bande de 150 kDa correspondant à un AcM complet bivalent en conditions non dénaturantes (Figure 2). En revanche, dans ces conditions deux formes anormales d'anticorps de 100 et 75 kDa sont observées. En conditions dénaturantes, ces deux constructions ont un profil normal avec des fragments de 50 et 25 kDa correspondant respectivement aux chaînes lourdes et légères de l'AcM. La forme de 75 kDa, obtenue en conditions non dénaturantes, correspond à un AcM monovalent associant une chaîne lourde et une chaîne légère. La forme de 100 kDa correspond à l'association de deux chaînes lourdes entre elles sans chaîne légère. Toutes les

autres constructions possèdent un profil normal d'anticorps avec en conditions non dénaturantes une forme de 150 kDa et en conditions dénaturantes des fragments de 50 et 25 kDa (Figure 2).

Nous avons également évalué la cytotoxicité de ces différentes constructions par test MTT (Figure 3). Les résultats confirment, dans un premier temps, l'activité pro-apoptotique de l'AcM murin 8B6 IgG3 ($36,1 \pm 9,5\%$). Nous confirmons également l'absence de cytotoxicité avec l'AcM chimérique IgG1 c.8B6. Nous montrons par la suite des profils de cytotoxicité différents entre les cinq autres constructions. De façon intéressante, seule une construction, l'AcM 1133, ne déclenche pas d'effet cytotoxique. Ce résultat suggère que les domaines CH2 et CH3 de l'IgG3 murine 8B6 ne semblent pas participer à l'activité apoptotique de cet AcM. Dans un second temps, l'AcM 1133 déclenche une activité apoptotique similaire à celle de l'AcM murin 8B6 (respectivement $30,9 \pm 7,9\%$ et $36,1 \pm 9,5\%$), suggérant que les domaines CH1-hinge de l'IgG3 murine sont responsables de cette activité. Afin de confirmer cette hypothèse, les AcM 3111 et 1311 ont été produits. L'AcM 3111 démontre une activité apoptotique similaire à celle de l'AcM murin parental (respectivement $26,9 \pm 7\%$ et $36,1 \pm 9,5\%$). Ces résultats semblent indiquer que le domaine CH1 de l'IgG3 murine est suffisant pour déclencher une activité apoptotique. Néanmoins, la construction 1311 montre elle aussi une activité ($13,9 \pm 2,3\%$). Bien que cette activité soit moins importante que celle des autres constructions, cela suggère que l'hinge joue un rôle dans l'activité pro-apoptotique. Cependant cette dernière construction, comme décrit précédemment, n'est pas stable d'un point de vue structurel. Afin de démontrer un possible rôle des domaines CH2 et CH3 de l'IgG3 murine dans la stabilité de l'AcM, nous avons produit la construction 3111. Cette construction montre la même instabilité structurelle que la construction 1311 et une activité similaire ($17,8 \pm 3,2\%$). Ces dernières observations excluent donc un rôle des domaines CH2 et CH3 dans la stabilité de la molécule et tente à confirmer un rôle de l'hinge dans la capacité pro-apoptotique de l'IgG3 murine. Enfin, l'instabilité structurelle des constructions 1311 et 1113 indique clairement un problème d'appariement entre les ponts disulfures impliquant l'hinge de l'IgG3 murine et le CH1 de l'IgG1 humaine.

Cette première partie de l'étude nous permet donc de conclure sur l'implication des domaines CH1 et hinge de l'IgG3 murine dans la capacité pro-apoptotique de l'AcM 8B6. En effet, les constructions avec l'un ou l'autre de ces domaines développent des propriétés de cytotoxicité directe. Le meilleur candidat obtenu semble être la construction 3111 car, en plus de développer une structure normale en SDS-page, cette construction montre une activité

cytotoxicité similaire à celle de l'IgG3 murine. De plus, cet AcM possède un seul domaine murin, le domaine CH1, qui devra, le cas échéant, être humanisé. Enfin, l'ensemble de ces résultats suggère que la structure même de l'IgG3 murine, entre les domaines CH1 et hinge, est à l'origine de sa capacité pro-apoptotique. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons développé une seconde génération d'AcM chimérique ciblant le GD2-Oac.

Deuxième génération :

Nous avons, dans un premier temps, étudié la structure et la séquence protéique de ces deux immunoglobulines : l'IgG3 murine et IgG1 humaine. Nous nous sommes tout particulièrement intéressés à la position des cystéines et des ponts disulfures entre les domaines CH1 et hinge. Le nombre de cystéines entre les différentes IgG varient notamment en fonction du nombre de ponts disulfures au niveau de l'hinge, par exemple les IgG3 murines ne possèdent qu'un pont disulfure alors que les IgG3 humaines en possèdent onze.

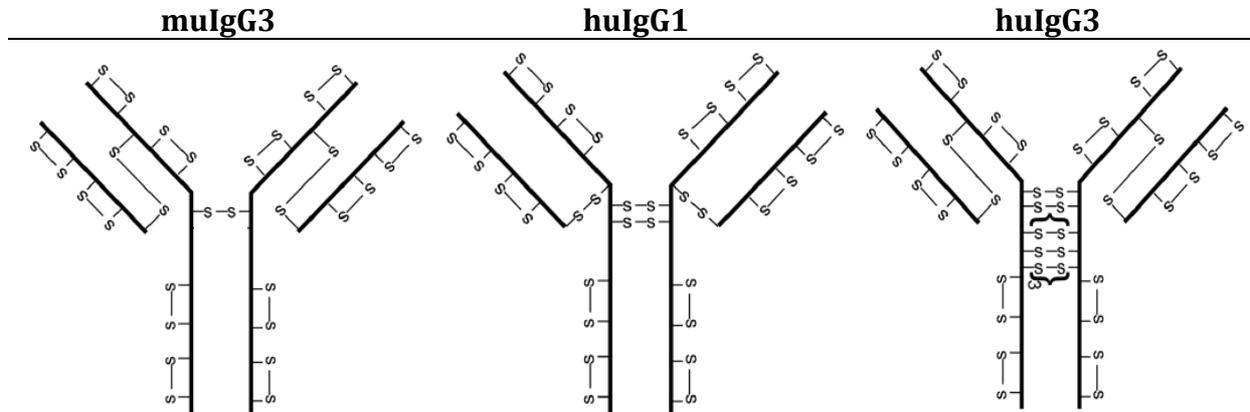
L'IgG3 murine comprend 30 cystéines impliquées dans les ponts disulfures (Figure 4A). Parmi ces cystéines, 24 sont impliquées dans des ponts disulfures intra-chaînes, sachant que chaque domaine immunoglobulinique possède un pont disulfure (CH1, CH2, CH3, C κ , VH et VL). Deux cystéines en position 15 (nomenclature IMGT) sont impliquées dans le pont disulfure au niveau de l'hinge, permettant la liaison stable entre les deux chaînes lourdes. Les quatre dernières cystéines sont impliquées dans les ponts disulfures entre le domaine CH1 et le domaine C κ , respectivement les cystéines en position 11 et 126 (Figure 4B).

L'IgG1 humaine possède une structure unique. Elle possède 32 cystéines dont 24, comme pour les autres IgG, sont impliquées dans les ponts disulfures intra-chaînes. L'IgG1 humaine est constituée d'un hinge de 16 acides aminés possédant deux ponts disulfures inter-hinge, entre les cystéines en position 11 et 14. De plus, elle possède au niveau de l'hinge une troisième cystéine, en position 5, qui forme un pont disulfure avec le domaine C κ (C126). Cette sous-classe d'IgG ne possède donc pas, contrairement à l'IgG3 murine, de cystéine, dans le domaine CH1, impliquée dans les ponts disulfures inter-chaîne (Figure 4B).

L'IgG3 humaine possède une structure particulière avec un long hinge constitué de 67 acides aminés. Un premier motif de 17 acides aminés permettant de créer deux ponts disulfure inter-hinge et un second motif répété trois fois créant trois autres ponts disulfures inter-hinge (Figure 4A). La longueur de cet hinge est à l'origine de la courte demi-vie de cette IgG, 7 jours contre 21 jours pour les autres IgG. Enfin, cette IgG possède un domaine CH1 très

proche de celui de l'IgG1 humaine, avec seulement quatre acides aminés différents dont, de façon particulièrement intéressante une cystéine en position 10 permettant le pont disulfure entre les CH1 et C κ (C126) (Figure 4B).

A.



B.

CH1

11

| | | | | | | |
|---------------|------------|---------------------|------------|------------|------------|-------------|
| muIgG3 | ATTTAPSVYP | LVP <u>G</u> CSDTSG | SSVTLGCLVK | GYFPEPVTVK | WNYGALSSGV | RTVSSVLQSS |
| huIgG1 | ASTKGPSVFP | LAPSSKSTSG | GTAALGCLVK | DYFPEPVTVS | WNYGALTSGV | HTFP AVLQSS |
| huIgG3 | ASTKGPSVFP | LAP <u>C</u> SRSTSG | GTAALGCLVK | DYFPEPVTVS | WNYGALTSGV | HTFP AVLQSS |

| | | | | |
|---------------|------------|------------|--------------------|-------------------|
| muIgG3 | GFYSLSSLVT | VPSSTWPSQT | VICNVAHPAS | KTELIKRI |
| huIgG1 | GLYSLSSVVT | VPSSSLGTQT | YICNVNHKPS | NTKVDKKV |
| huIgG3 | GLYSLSSVVT | VPSSSLGTQT | <u>Y</u> TCNVNHKPS | NTKVDK <u>R</u> V |

Hinge

5

15

| | |
|---------------|---|
| muIgG3 | EPRIKPSTPPGSS <u>C</u> P |
| huIgG1 | EPK <u>S</u> CDKTH <u>T</u> CP <u>P</u> CP |
| huIgG3 | ELKTPLGDTTHT <u>C</u> PR <u>C</u> P (EPK <u>S</u> CDT <u>P</u> PP <u>C</u> PR <u>C</u> P) 3 |

Figure 4 : (A) Structure générale des différents IgG et (B) séquences protéiques des domaines hinge et CH1 de l'IgG3 murine (muG3), de l'IgG1 humaine (huG1), et de l'IgG3 humaine (huG3) d'après imgt.org. En rouge, sont représentées les cystéines impliquées dans le pont disulfure avec la C κ , en vert celles impliquées dans les ponts disulfures entre les chaînes lourdes. Les acides aminés différents entre le CH1 de l'huG1 et de l'huG3 sont soulignés.

Ces observations nous ont amené à réaliser deux nouvelles constructions sur le modèle de la construction 1311, possédant, par conséquent, les domaines CH1, CH2 et CH3 de l'IgG1 humaine et l'hinge de l'IgG3 murine. Nous avons modifié le domaine CH1 humain de cette construction en mutant spécifiquement l'acide aminé en position 10, une sérine, en cystéine (S10C), afin de retrouver une structure similaire de celle de l'IgG3 murine (Figure 5). Nous avons privilégié la mutation de la sérine en position 10 par rapport à celle de la sérine en

position 11 car nous souhaitons conserver le motif CS, présent sur l'IgG3 murine et l'IgG3 humaine (Figure 4B). Nous avons également substitué entièrement le domaine CH1 par celui de l'IgG3 humaine (Figure 5). Enfin, comme précédemment nous avons vérifié la structure de ces constructions par SDS-page et évalué la cytotoxicité directe par test MTT (Figure 6).

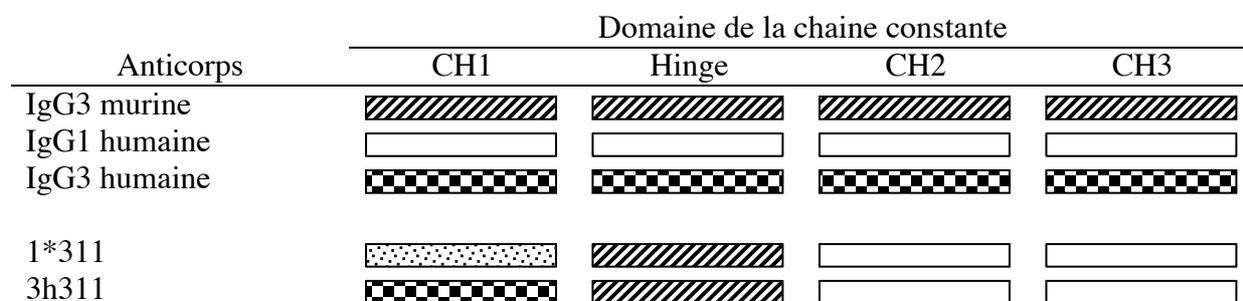


Figure 5 : Représentation schématique des constructions des anticorps chimériques de la seconde génération. La mutation S10C est notée par *.

Dans un premier temps, nous montrons le rôle primordial de la cystéine 10, présente dans la séquence du domaine CH1 de l'IgG3 murine, dans le maintien de la structure de cette classe d'anticorps. En effet, la construction 1*311, possédant la mutation S10C dans la séquence du domaine CH1 de l'IgG1 humaine, montre par analyse SDS-Page, une structure normale. De même, la construction 3h311, dont le domaine CH1 de l'IgG1 humaine est substitué par le domaine CH1 de l'IgG3 humaine, montre elle aussi une structure normale. Ce résultat permet donc de confirmer le rôle de la cystéine 10 dans le maintien de la structure des constructions contenant un hinge de l'IgG3 murin.

Nous avons ensuite comme décrit précédemment, évalué la cytotoxicité de ces constructions par test MTT (Figure 6). Les résultats montrent de façon étonnante, une capacité cytotoxique similaire de la construction 3h311 ($34,7\% \pm 7\%$) par rapport à l'IgG3 murine. De plus, contrairement à l'IgG1 humaine, la construction 1*311 ayant une structure identique à celle de l'IgG3 murine montre une activité cytotoxique. Cependant, cette activité est plus faible ($16,3\% \pm 4\%$) que celle de l'IgG3 murine.

Nous avons ensuite évalué la cytotoxicité de ces constructions par test MTT (Figure 6). Les résultats semblent confirmer l'hypothèse selon laquelle la capacité apoptotique de l'IgG3 murine est dépendante de la structure de cet AcM et notamment du positionnement des ponts disulfures (Figure 4). En effet, la substitution de la sérine en position 10 par une cystéine dans la séquence du domaine CH1 de l'IgG1 humaine n'est pas suffisant pour restaurer entièrement les propriétés pro-apoptotiques de l'IgG3 murine native. La construction 1*311 montre une activité cytotoxique plus faible ($16,3 \pm 4\%$) que celle de l'IgG3 murine

(36,1 ± 9,5%). D'autre part, la substitution du domaine CH1 de l'IgG1 humaine par celui de l'IgG3 humaine semble suffisante pour restaurer cette activité. La différence d'activité entre ces deux constructions reste inexpliquée. En effet, les séquences du domaine CH1 de l'IgG1 et de l'IgG3 humaines ne diffèrent que pour quatre acides aminés : S10C, K12R, I123T et K120R (Figure 4B) dont le dernier acide aminé K120 est impliqué dans les allotypes de l'IgG1 humaine, une lysine pour l'allotype G1m17 une arginine pour l'allotype G1m3 (imgt.org). L'étude des différentes propriétés physico-chimiques singulières de ces acides aminés ne permet pas d'expliquer les différences observées entre les constructions 1*311 et 3h311. En effet, hormis la cystéine en position 10 aucun de ces acides aminés ne semble pouvoir influencer la structure globale de cet AcM.

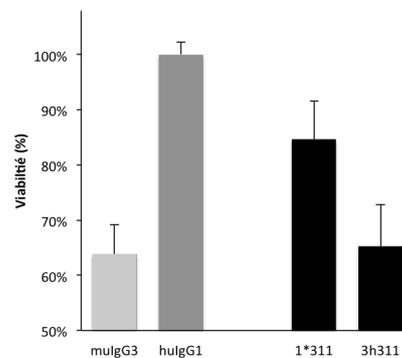


Figure 6 : Cytotoxicité directe des anticorps chimériques de la seconde génération. Les cellules sont traitées comme décrit dans la section Matériels et Méthodes et la viabilité cellulaire est mesurée par test MTT. Les résultats représentent le pourcentage de viabilité par rapport aux cellules contrôles non traitées après 24h de traitement à 80 µg/ml pour chaque anticorps. Les résultats sont obtenus sur trois expériences indépendantes et sont représentés en moyenne ± SD.

Troisième génération :

Précédemment, nous avons pu établir une relation structure/fonction permettant de restaurer l'activité pro-apoptotique de l'IgG3 murine sur une IgG1 humaine non cytotoxique. Ainsi, ce phénomène semble dépendant du pont disulfure entre la cystéine en position 10 du domaine CH1 et la cystéine 126 du domaine C γ . Cependant, toutes les constructions précédentes sont constituées d'un ou plusieurs domaines murins et notamment de l'hinge de l'IgG3 murine. Afin d'humaniser ces constructions, nous avons substitué l'hinge de l'IgG3 murine par celui de l'IgG1 humaine sur le modèle des constructions 1*311 et 3h311 (Figure 7). De plus, le pont disulfure entre la chaîne légère et la chaîne lourde de l'IgG1 humaine s'effectue avec la cystéine en position 5 de l'hinge (Figure 4). Par conséquent, afin de s'assurer

de la liaison du domaine C κ avec la cystéine en position 10 dans le domaine CH1 de l'IgG1 humaine mutée, la cystéine en position 5 dans l'hinge a été substituée par une sérine (C5S) dans la construction 1*1[#]11 (Figure 7).

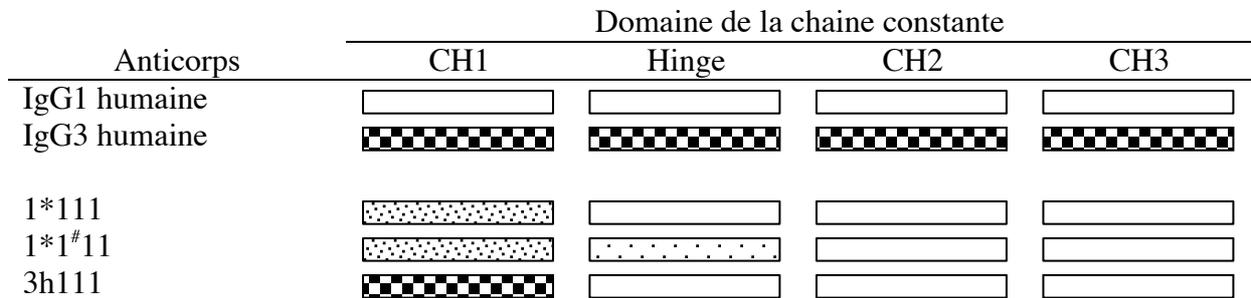


Figure 7 : Représentation schématique des constructions des anticorps chimériques de la troisième génération. La mutation S10C est notée par *, la mutation C5S est notée par #.

L'analyse par SDS-page montre que ces trois nouvelles constructions possèdent une structure normale et correctement appariée au niveau des ponts disulfures. Nous avons ensuite évalué la cytotoxicité de ces constructions par test MTT (Figure 8). Les résultats montrent, dans un premier temps, que ces trois constructions développent une capacité de cytotoxicité directe. De façon très intéressante, une différence d'activité est observée entre les constructions 1*111 et 1*1[#]11. En effet, si cette dernière possède une activité similaire à celle de l'IgG3 murine parentale (respectivement 41,1% \pm 5,3% et 36,1% \pm 9,5%), la première développe une activité plus faible (24,2% \pm 1,5%). Cette différence peut être expliquée par la présence dans cette construction de deux formes d'AcM. Une forme possédant le pont disulfure recherché avec la cystéine en position 10 et l'autre possédant la structure classique de l'IgG1 humaine et le pont disulfure avec la cystéine en position 5 de l'hinge (Figure 4). Cependant, aucune expérience n'a permis de vérifier cette hypothèse. D'autre part, la construction 3h111 possède une activité similaire à celle de l'IgG3 murine native (42,9% \pm 2,3%).

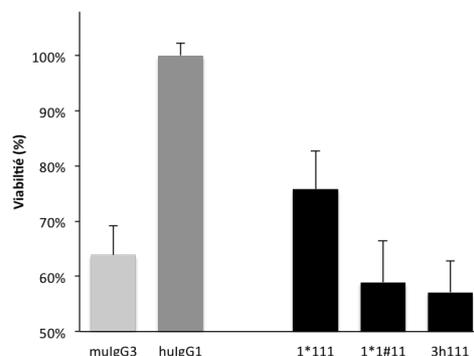


Figure 8 : Cytotoxicité directe des anticorps chimériques de la troisième génération. Les cellules sont traitées comme décrit dans la section Matériels et Méthodes et la viabilité

cellulaire est mesurée par test MTT. Les résultats représentent le pourcentage de viabilité par rapport aux cellules contrôles non traitées après 24h de traitement à 80 $\mu\text{g/ml}$ pour chaque anticorps. Les résultats sont obtenus sur trois expériences indépendantes et sont représentés en moyenne \pm SD.

Cette dernière étape nous a donc permis de développer deux anticorps chimériques -1*1[#]11 et 3h111- pouvant être utilisés pour une application clinique chez l'homme et possédant une capacité apoptotique optimisée et similaire à celle de l'AcM murin 8B6.

Conclusion

Nous avons souhaité ici déterminer les domaines de l'IgG3 de souris 8B6 impliqués dans ses propriétés apoptotiques. Nous avons identifié une relation structure de l'IgG et fonction pro-apoptotique. Ainsi, nous avons pu développer des AcM chimériques spécifique du GD2-Oac possédant une capacité apoptotique. Nous avons montré que le pont disulfure entre la chaîne lourde et la chaîne légère de l'IgG joue un rôle clé dans l'acquisition d'une activité apoptotique des AcM chimériques ciblant le GD2-Oac. En effet, nous montrons que la présence de la cystéine en position 10 (Nomenclature IMGT) dans le domaine CH1 est indispensable à la fonction pro-apoptotique des AcM anti-GD2-Oac. D'autre part, les AcM chimériques ainsi développés possèdent les domaines CH2 et CH3 de l'IgG1 humaine. Par conséquent, ils devraient développer des activités ADCC et CDC importante au même titre que l'AcM chimérique IgG1 c.8B6.

Par ailleurs, il est important de considérer que le changement de structure de l'AcM a pu induire un changement des propriétés de liaison des AcM. Ainsi, l'affinité de ces AcM est un paramètre important qui doit encore être étudié. De plus, nous avons précédemment décrit que les IgG3 murines développent une capacité d'auto-association. Cette capacité pourrait permettre un remodelage voire une déstabilisation de la membrane plasmique après la liaison avec sa cible. Il est ainsi possible que les changements dans la séquence protéique de ces AcM chimériques anti-GD2-Oac leurs permettent de développer ce comportement auto-associatif.

Enfin, il reste important de réaliser des études sur des nouveaux modèles tumoraux exprimant le GD2-Oac et de confirmer ces résultats dans des modèles murins.

Chapitre IV

Nouvelles cibles thérapeutiques pour les anticorps ciblant le marqueur tumoral GD2 *O*-acétylé

Introduction

Le ciblage thérapeutique des cancers à l'aide d'AcM anti-GD2 suscite un nouvel intérêt auprès de la communauté scientifique depuis la publication des résultats de l'essai clinique de phase III dans le cadre du neuroblastome de haut grade (Yu et al., 2010). Plusieurs équipes se sont engagées dans des travaux d'ingénierie afin de disposer de nouveaux format d'anticorps présentant des effets neurotoxiques diminués (Kushner et al., 2011b; Sorkin et al., 2010) mais également dans la conception de médicament de thérapie innovante comme par exemple les lymphocytes CAR (Heczey et al., 2014). Un autre aspect concerne la recherche de nouvelles indications thérapeutiques pour ces AcM. Ainsi, la pertinence du ciblage du GD2 dans l'ostéosarcome a récemment été confirmé (Roth et al., 2014). De même, le GD2 a été retrouvé sur des cellules souches tumorales du cancer du sein (Battula et al., 2012; Liang et al., 2013). Ces cellules souches tumorales seraient à l'origine de la prolifération tumorale, mais également des phénomènes de résistance et d'extravasation (Al-Hajj and Clarke, 2004; Al-Hajj et al., 2003). Ces cellules semblent, en effet, échapper à l'action de la radiothérapie et de la chimiothérapie. Ainsi, de nombreux travaux portent sur la caractérisation de nouvelles cibles co-exprimées spécifiquement par ces cellules. Des études récentes ont corrélé l'expression des gangliosides GD2 et GD3 au phénotype souche $CD44^{high}/CD24^{low}$ de cellules du cancer du sein (Liang et al., 2013). De même les travaux publiés par l'équipe du Pr. M. Andreff définissent le GD2 comme un marqueur des cellules souches tumorales du cancer du sein impliqué dans la promotion tumorale de ces cellules en favorisant la transition épithélio-mésenchymale (Battula et al., 2012; Sarkar et al., 2014). Ces auteurs montrent au sein de la population des cellules souches tumorales $CD44^{high}/CD24^{low}$ deux sous-populations qui se distinguent par l'expression du GD2. Le tri des cellules exprimant le GD2 permet de démontrer que ces cellules $GD2^+$ possèdent les caractères fonctionnels des cellules souches tumorales incluant la formation de mammosphères, les capacités prolifératives et invasives, ainsi que la capacité à former des tumeurs *in vivo*. De façon très intéressante l'AcM murin anti-GD2 14G2a utilisé lors de ces études présente une réactivité croisée contre le GD2 O-acétylé.

Nous avons cherché à savoir si le GD2-Oac était également exprimé par cette population tumorale et étudié son rôle dans différents modèles cellulaires. Nous retrouvons ici l'expression du GD2-Oac sur les cellules souches tumorales du cancer du sein. De plus, l'AcM murin 8B6 anti-GD2-Oac est capable d'inhiber la viabilité de cette population cellulaire décrite comme étant résistante à la radiothérapie et à la chimiothérapie,

indépendamment du recrutement des effecteurs du système immunitaire. De même, nous montrons cette activité anti-tumorale sur des lignées de cancer pulmonaire à petites cellules. Des données récentes suggèrent la présence de cellules souches tumorales dans ce cancer (Kubo et al., 2013; Sarvi et al., 2014). Ainsi, l'utilisation des AcM anti-GD2-Oac permettrait de cibler ces cellules souches et de prévenir les rechutes liées à ces cellules. L'ensemble de ces résultats font l'objet d'un brevet intitulé "Targeting O-acetylated GD2 ganglioside as a new therapeutic and diagnostic strategy for cancer stem cells cancer".

Matériels et Méthodes

Cellules

Les lignées cellulaires de cancer du sein humaines SUM159PT, MDA-MB-231, MDA-MB-468, la lignée de cancer du sein murine 4T1, les cellules de cancer de poumons H69, H187, H196, H524 ont été obtenues auprès de l'ATCC et sont cultivées selon ses recommandations.

Anticorps

L'anticorps murin 8B6 est produits des cellules CHO-S (*chinese hamster ovary*) par la société Evitria (Schleiren, Zürich, Switzerland). Les surnageants sont ensuite purifiés sur une colonne de chromatographie d'affinité protéine A, (Hi-Trap Protein A, GE Healthcare). La structure des AcM est vérifiée par gel SDS-page.

Cytométrie en flux

L'analyse de l'expression du GD2-Oac à la surface cellulaire est réalisée par immunofluorescence indirecte. Les cellules sont incubées 30 min sur glace en présence de l'anticorps primaire à 10 $\mu\text{g/ml}$. Après lavages, les cellules sont incubées 30 min en présence d'un fragment F(ab')₂ de chèvre anti-souris couplé à l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC). Pour le triple marquage, les cellules sont ensuite incubées 10 min en présence de PFA 4% puis incubées 30 min en présence des anticorps anti-CD24 couplé à la phycoérythrine (PE) et anti-CD44 couplé à l'allophycocyanine (APC) (BD Biosciences). La fluorescence est analysée sur un cytomètre LSRII (BD Biosciences).

Inhibition de la croissance tumorale

La viabilité cellulaire est mesurée, comme décrit précédemment (Cochonneau et al., 2013) par test MTT (Roche). Les cellules (1.10^4 /puits) sontensemencées dans une plaque 96 puits et incubées pendant 24h à 37°C. Les dilutions d'AcM de 80 à 0,15 $\mu\text{g/ml}$ (50 μl) sont ajoutées dans chaque puits. Après 24h d'incubation, 5 μg de MTT sont ajoutés pendant 4h à 37°C avant d'ajouter la solution de solubilisation (SDS 10%). Les cellules sont incubées sur la nuit à 37°C. L'absorbance est mesurée à 570 et 650 nm. La soustraction $A_{570}-A_{650}$ permet d'obtenir la valeur d'absorbance. La viabilité est exprimée en pourcentage relatif des valeurs des cellules traitées par rapport aux cellules non traitées contrôles. L'anti-GD3-Oac 7H2 (IgG3, κ) est utilisé comme anticorps contrôle.

Résultats

A. Immunociblage des cellules souches tumorales par des AcM anti-GD2-Oac dans le cancer du sein

1. Le GD2-Oac est exprimé dans le cancer du sein

L'analyse par cytométrie en flux de l'expression du GD2-Oac sur plusieurs lignées cellulaires montre un marquage avec l'AcM murin 8B6 (Figure 1). Les trois lignées humaines de cancer du sein SUM159PT, MDA-MB-468 et MDA-MB-231, sont décrites pour être des modèles de cancer du sein triple négatif. Le taux d'expression du GD2-Oac varie entre ces lignées. La lignées SUM159PT et la lignée murine 4T1 expriment fortement le GD2-Oac.

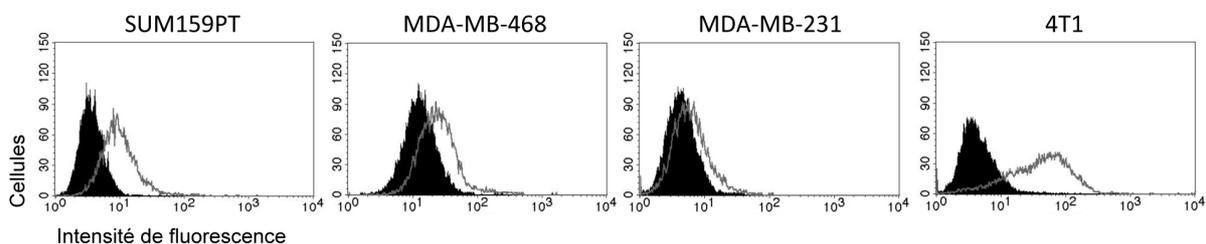


Figure 1: Expression du GD2Oac sur des lignées de cancer du sein. Les cellules sont marquées comme décrit dans la section Matériels et Méthodes. L'abscisse du graphique montre l'expression du GD2-Oac représentée en intensité de fluorescence.

2. Le GD2-Oac est exprimé sur des cellules à phénotype cellules souches tumorales

Battula et al. ont identifié le ganglioside GD2 comme un nouveau marqueur des cellules souches tumorales dans le cancer du sein (Battula et al., 2012). Après avoir retrouvé l'expression du GD2-Oac à la surface des cellules tumorales de cancer du sein, nous avons recherché l'expression du GD2-Oac sur cette population à phénotype cellule souche. Pour cela, nous avons réalisé en cytométrie en flux des co-marquages du GD2-Oac sur les cellules à phénotype cellules souches $CD44^{high}/CD24^{low}$ dans la lignée SUM159PT. Les résultats obtenus indiquent que 94,3% des cellules exprimant le GD2-Oac possèdent un phénotype $CD44^{high}/CD24^{low}$ (Figure 2).

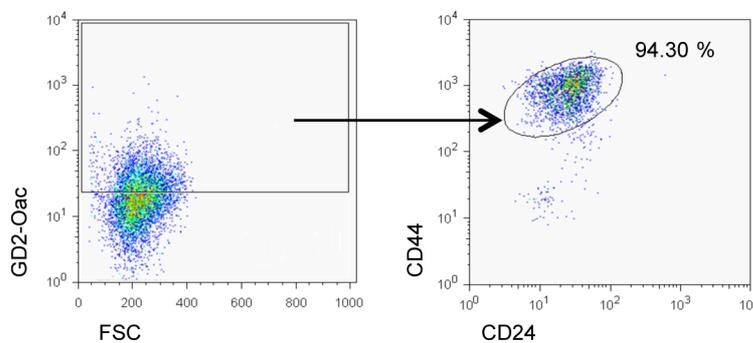


Figure 2: Les cellules GD2-Oac⁺ possèdent un phénotype de cellules souches $CD44^{high}/CD24^{low}$. Les cellules sont marquées comme décrit dans la section Matériels et Méthodes. Le dot-plot sur le graphique de gauche représente : en ordonnée l'expression du GD2-Oac en intensité de fluorescence, en abscisse la FSC (*Forward Scatter*, taille relative des cellules). Le dot-plot sur le graphique de droite représente l'expression du CD44 (ordonnée) et du CD24 (abscisse) en intensité de fluorescence sur les cellules GD2-Oac⁺.

3. Les anticorps anti-GD2-Oac inhibent la viabilité des cellules de cancer du sein

Nous avons précédemment montré que l'AcM 8B6 est capable d'induire une inhibition de la viabilité cellulaire avec un blocage du cycle cellulaire et l'induction d'un programme de mort cellulaire des cellules tumorales (Cochonneau et al., 2013). Les cellules souches tumorales sont décrites pour leur résistance à l'apoptose induite notamment par la radiothérapie et la chimiothérapie (Al-Hajj and Clarke, 2004) Nous avons donc cherché à savoir si l'AcM 8B6 était également capable d'inhiber la viabilité des cellules souches cancéreuses. Nous avons mesuré l'inhibition de la viabilité cellulaire induite par le traitement par l'AcM murin 8B6 anti-GD2 O-acétylé sur la lignée SUM159PT par test MTT. Cette lignée est composée majoritairement de cellules souches tumorales à phénotype $CD44^{high}/CD24^{low}$. Les résultats présentés dans la Figure 3 montrent que l'AcM 8B6 est capable d'inhiber la viabilité des cellules SUM159PT de manière dose-dépendante. Nous observons une inhibition maximale

de 25% en présence de 20 $\mu\text{g/ml}$ d'AcM, après 24h de traitement. Aucune inhibition de la viabilité cellulaire n'est observée avec l'AcM contrôle. Des résultats similaires ont été obtenus avec les lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-468 (résultats non communiqués).

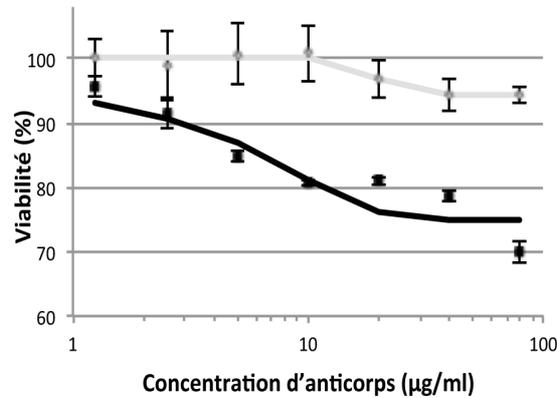


Figure 3: Les anticorps anti-GD2-Oac inhibent la viabilité cellulaire de cellules du cancer du sein. Les résultats sont représentés en pourcentage de cytotoxicité par rapport au contrôle non traité après 24h de traitement en présence de concentrations variables de l'anticorps 8B6 (noir) et du contrôle isotypique (gris). Ces résultats montrent une expérience représentative de trois expériences indépendantes et sont représentés en moyenne \pm SD.

B. Activité anti-tumorale des anticorps ciblant le GD2-Oac dans le cancer du poumon à petites cellules

1. Le GD2-Oac est exprimé dans le cancer du poumon à petites cellules

L'expression du GD2-Oac a été précédemment retrouvée dans des tumeurs de cancer du poumon à petites cellules (Alvarez-Rueda et al., 2011). L'analyse par cytométrie en flux de l'expression du GD2-Oac sur différentes lignées cellulaires montre que l'AcM murin 8B6 se fixe sur l'ensemble de ces lignées (Figure 4).

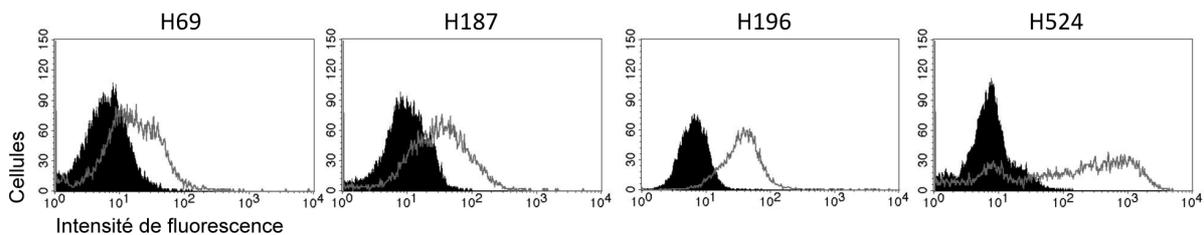


Figure 4: Expression du GD2-Oac sur des lignées de cancer du poumon à petites cellules. Les cellules sont marquées comme décrit dans la section Matériels et Méthodes. L'abscisse montre l'expression du GD2-Oac représentée en intensité de fluorescence.

2. Les anticorps anti-GD2-Oac inhibent la viabilité des cellules de cancer du poumon à petites cellules

Nous avons ensuite étudié les propriétés d'inhibition de la viabilité cellulaire de l'AcM murin 8B6 dans les lignées H187 et H524. Les résultats présentés dans le Figure 5 montrent que l'AcM 8B6 induit une inhibition de la viabilité cellulaire de ces cellules, de manière dose-dépendante, après 24h de traitement. Un effet maximum d'environ 30% est observé à partir de 20 $\mu\text{g/ml}$ d'AcM 8B6 pour la lignée H187 (Figure 5A). Pour la lignée H524 (Figure 5B), nous observons une inhibition maximale d'environ 40% dès la concentration 5 $\mu\text{g/ml}$ d'AcM. Aucune inhibition de viabilité de ces cellules n'est observée en présence de l'AcM contrôle.

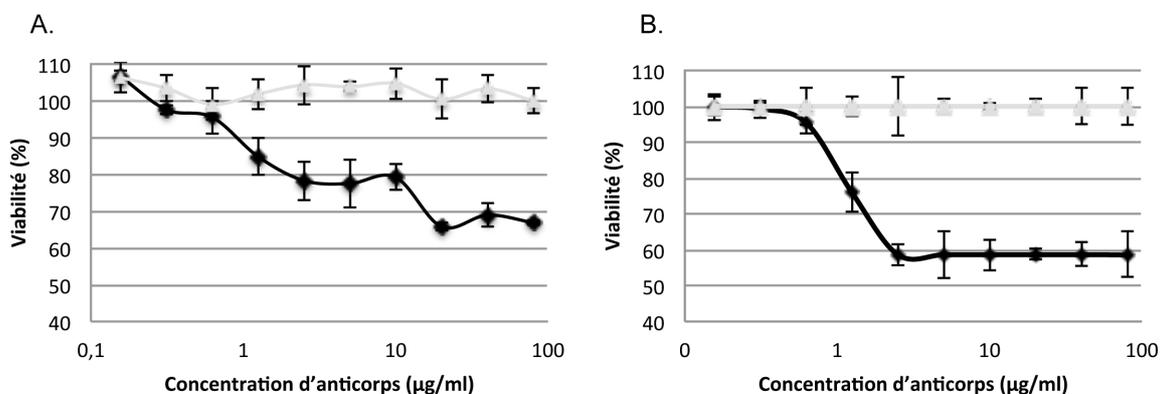


Figure 5: Les AcM anti-GD2-Oac inhibent la viabilité cellulaire de cellules du cancer du poumon à petites cellules. Les résultats sont représentés en pourcentage de cytotoxicité par rapport aux cellules non traitées après 24h de traitement en présence de concentration variables de l'AcM 8B6 (noir) et du contrôle isotypique (gris). Ces résultats montrent une expérience représentative de trois expériences indépendantes et sont représentés en moyenne \pm SD.

Discussion

Nous avons recherché, dans ce chapitre, la présence du GD2 O-acétylé sur les cellules souches tumorales. Nous rapportons l'expression du GD2-Oac sur les cellules souches tumorales du cancer du sein que nous avons identifiées par le phénotype $\text{CD44}^{\text{high}}/\text{CD24}^{\text{low}}$ (Al-Hajj et al., 2003). Ainsi, nous avons pu montrer sur des lignées cellulaires de cancer du sein que les cellules exprimant le GD2-Oac ont un phénotype de cellules souches tumorales $\text{CD44}^{\text{high}}/\text{CD24}^{\text{low}}$. De même, une autre étude menée au laboratoire en collaboration avec l'équipe du Dr. F. Valette (U. 892 Inserm) a permis de démontrer l'expression du GD2-Oac

sur des cellules souches tumorales dans le gliome et le neuroblastome, caractérisées par l'expression du marqueur CD133.

Le ciblage thérapeutique de ces cellules est particulièrement intéressant. En effet, cette population cellulaire serait à l'origine de la prolifération tumorale et également de l'apparition des rechutes. En effet, du fait de leur multiplication lente, ces cellules développent une résistance aux traitements de radiothérapie et de chimiothérapie, qui ciblent préférentiellement les cellules en division. Actuellement, la sensibilité de ces cellules à l'action du système immunitaire et notamment à la cytotoxicité immunologique des anticorps, CDC et ADCC, n'est pas décrite. Nos observations préliminaires obtenues dans la lignée de cancer du sein SUM159PT suggèrent toutefois que la viabilité cellulaire de ces cellules peut être inhibée par des AcM anti-GD2-Oac. Ces observations doivent maintenant être confirmées dans d'autres modèles de cellules souches tumorales.

Des études récentes définissent le GD2 comme un marqueur des cellules souches tumorales du cancer du sein jouant un rôle clé dans la promotion tumorale de ces cellules en favorisant la transition épithélio-mésenchymale (Battula et al., 2012; Sarkar et al., 2014). Du fait de la réactivité croisée, contre le GD2-Oac, de l'AcM 14G2a utilisé dans ces études, il n'est pas exclu que ce ganglioside *O*-acétylé puisse participer également à la promotion tumorale de ces cellules. Afin d'étudier le rôle du GD2-Oac dans ce phénomène, nous développons actuellement une approche d'isolement de ces cellules souches GD2-Oac⁺. Le tri cellulaire nous permettra de caractériser les propriétés fonctionnelles de ces cellules en fonction de l'expression du GD2-Oac.

D'autre part, nous montrons ici que le GD2-Oac se révèle une cible intéressante pour l'immunociblage dans le cancer du poumon à petites cellules. Ce cancer d'origine neuroectodermique représente 20% des carcinomes bronchiques avec un taux de survie à 5 ans de 5% et une médiane de survie de 6 à 18 mois (Cooper and Spiro, 2006). Nos observations sont corrélées avec l'étude de distribution du GD2-Oac dans le cancer du poumon à petites cellules réalisées par l'équipe du Dr. C. Badoual et du Dr. E. Tartour (HEGP, Paris). Les résultats de cette étude montrent que le GD2-Oac est retrouvé dans 12,5% des biopsies (n=16). De plus, nous montrons sur des lignées cellulaires que l'AcM 8B6 est capable d'inhiber la viabilité tumorale indépendamment des effecteurs immunitaires. Nos observations préliminaires montrent donc que le GD2-Oac représente un antigène d'intérêt pour le ciblage de cancer chez l'adulte. Dans le cas du cancer du poumon à petites cellules, l'intérêt de l'immunociblage par des AcM anti-GD2-Oac doit être encore démontré dans différents modèles *in vitro* et *in vivo* avant d'envisager un développement clinique. Par

ailleurs des études récentes semblent indiquer, au sein des cellules tumorales de ce cancer, l'existence d'une population de cellules souches tumorales, caractérisées par le marqueur CD133 (Kubo et al., 2013; Sarvi et al., 2014). Des études doivent encore être menées afin de démontrer l'expression GD2-Oac sur ces cellules.

Discussion générale et perspectives

Nous démontrons dans ce manuscrit l'intérêt du ciblage des tumeurs exprimant le GD2 *O*-acétylé par des AcM thérapeutiques. L'AcM 8B6 spécifique du GD2-Oac permettrait de développer une nouvelle approche de traitement du neuroblastome. Les caractéristiques de cet AcM le place aux côtés des deux seuls anticorps thérapeutiques utilisés dans le neuroblastome: le 3F8 et le ch14.18, qui ciblent tout les deux le disialoganglioside GD2 (Cheung et al., 2012a; Yu et al., 2010). Cependant, leur spécificité pour le GD2 est également une limite car le GD2 est exprimé à l'état de trace sur différents tissus sains et notamment sur les fibres sensitives des nerfs périphériques. Par conséquent l'injection chez le patient de ces AcM déclenche d'importants effets secondaires douloureux, impliquant une DMT limitée. Par conséquent, le ciblage du GD2-Oac est un atout majeur en faveur de l'AcM 8B6. En effet, l'étude de la distribution chez l'homme du GD2-Oac sur 33 tissus recommandés par la FDA a confirmé que l'AcM 8B6 ne se fixe sur aucun tissu humain y compris les nerfs périphériques (Alvarez-Rueda et al., 2011). La valorisation clinique de cet anticorps de souris nous a conduit à le produire sous un format chimérique utilisable chez l'homme.

Nous avons ainsi produit l'anticorps chimérique homme-souris appelé c.8B6 (IgG1, κ) (Terme et al., 2014). Nous démontrons ici que cet AcM présente la même activité anti-tumorale que l'AcM ch14.18, sans déclencher d'effets neurotoxiques dans un modèle animal. Différents mécanismes d'action anti-tumoraux *in vitro* ont été identifiés avec l'AcM de souris 8B6 (IgG3, κ) (Alvarez-Rueda et al., 2011; Cochonneau et al., 2013). Cet AcM présente une cytotoxicité immunologique induite à la fois par le recrutement du système du complément et par les lymphocytes NK exprimant le récepteur Fc γ RIIIa. Un troisième mécanisme repose sur l'induction de la mort cellulaire des cellules tumorales indépendamment du système immunitaire. D'autre part, les travaux concernant les deux anticorps anti-GD2 développés aux Etats-Unis suggèrent un rôle déterminant de l'activité ADCC dans leurs propriétés anti-tumorales (Zeng et al., 2005). Néanmoins, plusieurs études ont montré récemment que les AcM anti-GD2 peuvent également induire l'apoptose des cellules tumorales exprimant le GD2 (Aixinjueluo et al., 2005; Kowalczyk et al., 2009; Yoshida et al., 2002; Doronin et al., 2014). Cependant, le mécanisme moléculaire conduisant à la mort de la cellule tumorale reste mal défini. Certains auteurs démontrent l'intervention de la cascade des caspase (Kowalczyk et al., 2009) ; à l'inverse d'autres études montrent l'existence d'une voie indépendante des caspases (Yoshida et al., 2002). De plus, dans le cas des AcM ciblant le ganglioside NeuGc-GM3, la mort cellulaire résulte d'une déstabilisation de la membrane plasmique conduisant à la formation de pore à l'origine d'une nécrose cellulaire (Roque-Navarro et al., 2008). Ces

travaux suggèrent que les mécanismes moléculaires conduisant à la mort cellulaire sont multiples et peuvent s'expliquer en partie par le type cellulaire utilisé qui diffère selon les auteurs mais également par les propriétés intrinsèques des anticorps utilisés. Néanmoins, l'implication des propriétés pro-apoptotiques des anticorps thérapeutiques ciblant des gangliosides n'a jamais été démontrée *in vivo*. L'identification précise des voies moléculaires mise en jeu par ces anticorps thérapeutiques et leur implication dans les mécanismes anti-tumoraux *in vivo* présentent un intérêt clinique évident. Ainsi, il deviendrait possible de cibler des cellules tumorales devenues résistantes à la cytotoxicité immunologique des AcM ou aux autres thérapie anti-cancer.

Avant mon arrivé au laboratoire, l'activité ADCC et CDC de l'AcM 8B6 ont été caractérisées *in vitro* dans différentes lignées tumorales exprimant le GD2 O-acétylé (Alvarez-Rueda et al., 2011). Par ailleurs, l'activité anti-tumorale de cet AcM a également été démontrée *in vivo* dans le modèle syngénique de lymphome T chez la souris C57BL/6. Cependant, l'absence de récepteur FcγR capable de lier les IgG3 chez la souris nous a conduit à caractériser davantage les propriétés pro-apoptotiques de l'AcM 8B6 et notamment de déterminer leur implication dans son efficacité anti-tumorale *in vivo* (Bruhns, 2012; Mujoo et al., 1989).

Nous nous sommes ainsi intéressés à des aspects plus fondamentaux concernant les propriétés pro-apoptotiques des anticorps anti-GD2-Oac que nous mettons en évidence ici. Nous montrons que l'IgG3 8B6 induit l'apoptose des cellules tumorales par la voie endogène de la mitochondrie dépendante des caspases. De plus, cet AcM inhibe le développement tumorale *in vivo* dans un modèle de xélogreffe de tumeur chez la souris NOD-SCID, modèle murin caractérisé par une déficience complète des lymphocytes NK, un dysfonctionnement des macrophages et une absence de complément circulant. Nos résultats démontrent que les propriétés pro-apoptotiques de l'AcM 8B6 contribuent à l'efficacité thérapeutique des anticorps anti-gangliosides *in vivo*. L'ADCC et la CDC ne sont donc pas les seuls mécanismes impliqués dans les propriétés anti-tumorales des anticorps spécifiques des gangliosides chez l'animal. Bien que la caractérisation des voies de signalisation mises en jeu dans ce phénomène ne soit pas complète, nos données nous permettent d'ores et déjà d'envisager de nouvelles stratégies d'optimisation thérapeutiques en association avec la chimiothérapie ou la radiothérapie permettant de renforcer l'activité anti-tumorale des anticorps anti-GD2-Oac.

Il serait très intéressant d'identifier les voies de signalisation induites par la liaison de l'AcM 8B6 au GD2-Oac. Ces données permettrons ainsi d'identifier les molécules de

chimiothérapies les plus aptes à induire un effet anti-tumoral additif, voire synergique en association avec ces AcM. Pour Aixinjueluo et al., la liaison des molécules d'anticorps au GD2 induit la dissociation du complexe GD2-intégrine (Aixinjueluo et al., 2005). Cette dissociation induit la déphosphorylation de FAK entraînant l'activation de la voie p38. L'O-acétylation des acides sialiques modifie leur affinité pour différents ligands. Il n'est donc pas exclu que le GD2-Oac ne soit pas associé aux intégrines membranaires à l'état physiologique et que le mécanisme utilisé par l'AcM 8B6 soit différent. Bien que nous démontrons l'activation de p38 dans les cellules de neuroblastome traitées avec l'AcM 8B6, nous n'avons pas pu mettre en évidence jusqu'ici l'implication de FAK dans nos modèles expérimentaux. Plusieurs hypothèses peuvent alors être émises pour expliquer cette différence. Un partenaire membranaire associé spécifiquement aux GD2-Oac serait-il impliqué ? L'accumulation cytoplasmique de céramide suite à l'internalisation et la dégradation du GD2-Oac, après la liaison de l'AcM, conduirait-elle à l'induction de l'apoptose ? L'internalisation du GD2-Oac induirait-elle le transport de celui-ci à la mitochondrie comme cela a pu être décrit pour le ganglioside GD3 (Malisan and Testi, 2002).

Très peu d'études ont pu mettre en évidence le devenir des AcM anti-gangliosides après la liaison à leur cible, cependant plusieurs exemples peuvent être cités. Par exemple, la liaison de l'AcM de souris R24 (IgG3, κ) anti-GD3 entraîne une internalisation rapide du complexe antigène-anticorps. Toutefois, cette internalisation ne conduit pas à la dégradation de l'AcM mais plutôt à son recyclage à la surface des cellules (Iglesias-Bartolomé et al., 2006). L'AcM 14G2a (IgG2a, κ) semble également être internalisé. Ces observations ont conduit au développement d'immunotoxines ciblant le ganglioside GD2. Nos travaux antérieurs ont également montré que l'AcM 60C3 spécifique du GD2 et du GD2-Oac était rapidement internalisé (Alvarez-Rueda et al., 2007). Cependant, la majorité des AcM restait présente à la surface des cellules tumorales. Quoiqu'il en soit, les propriétés d'internalisation des AcM ciblant le GD2-Oac doivent être décrites. D'un point de vue fondamental, elles serviront à préciser les mécanismes moléculaires conduisant à l'induction d'un programme de mort cellulaire dans la cellule tumorale ciblée. D'un point de vue clinique, ces données sont nécessaires à la conception d'un format d'anticorps aux fonctions effectrices optimisées. Quoiqu'il en soit, la caractérisation précise des voies de signalisation induite par l'AcM 8B6 est sans doute complexe. En effet, l'utilisation de l'inhibiteur des caspases z-vad montre une inhibition partielle de la mort cellulaire induite par l'AcM 8B6. Ces observations suggèrent

que plusieurs mécanismes contribuent à l'induction d'un programme de mort dans la cellule tumorale (Doronin et al., 2014).

L'induction de la cytotoxicité non immunologique de l'AcM 8B6 est observée *in vitro* à partir de concentration en AcM $\geq 20 \mu\text{g/ml}$. Cette concentration correspond chez le patient à la concentration sérique maximale observée ($22,4 \mu\text{g/ml}$) après une injection d'AcM thérapeutique anti-GD2 ($100 \text{ mg/m}^2/\text{jour}$) (Cheung et al., 1987; Uttenreuther-Fischer et al., 1995a). La contribution de ce mécanisme de cytotoxicité directe dans l'efficacité anti-tumorale de l'AcM 8B6 est illustrée dans nos travaux par le modèle de xénogreffe de cellules de neuroblastome humain IMR5 chez la souris NOD-SCID (Cochonneau et al., 2013). Dans ce modèle, une injection importante et unique d'AcM 8B6 ($500 \mu\text{g/injection/souris}$) suffit à inhiber la croissance de tumeur établies. La contribution de ce mécanisme chez les patients, nécessitera donc de disposer d'un format d'anticorps présentant une DMT plus importante que les AcM thérapeutiques ciblant le GD2. Dans ce contexte, les données obtenues *in vivo* chez la rat avec l'AcM chimérique c.8B6 montre que cet AcM ne déclenche pas d'allodynie contrairement à l'AcM thérapeutique ch14.18 anti-GD2. Ce modèle animal a été développé par le Pr. L. Sorkin (University of California, San Diego) et a permis de proposer un mécanisme à l'origine des effets douloureux observés chez les patients lors de l'administration d'AcM anti-GD2. Dans ce modèle, un effet allodynique maximal est obtenu à la posologie de 1 mg/kg avec l'AcM ch14.18, soit une dose de 40 mg/m^2 chez l'homme (Sorkin et al., 2002). Nous n'avons observé aucune allodynie avec l'AcM c.8B6 administré aux doses de 1 et 3 mg/kg . D'autre part, l'utilisation de rats transgéniques dépourvus de complément a permis de mettre en évidence l'importance du système du complément dans l'induction des phénomènes douloureux par les AcM anti-GD2 (Sorkin et al., 2002). L'ensemble de ces données associé avec nos résultats de la distribution tissulaire du GD2-Oac chez l'homme, suggère que les AcM anti-GD2-Oac ne devraient pas provoquer d'effets secondaires tout en présentant une DMT largement supérieure à celle des AcM anti-GD2. Par conséquent, ces observations nous permettent d'envisager l'utilisation clinique d'AcM anti-GD2-Oac possédant des activités anti-tumorales optimisées, comme décrit ci-dessous.

Les propriétés pro-apoptotiques observées avec l'IgG3 des souris 8B6, sont perdues lors de sa chimérisation au format IgG1 humaine. Ces données soulignent l'importance des régions constantes dans les propriétés cytotoxiques d'origine non immunologique de l'AcM et soulèvent l'implication des propriétés de coopérativité moléculaire de l'IgG3 de souris. Les IgG3 de souris sont connues pour s'auto-associer de manière irréversible lorsqu'elles sont

présentes en forte concentration. Ce mécanisme permettrait à cette sous-classe d'anticorps, d'augmenter leur avidité en augmentant le nombre d'AcM à la membrane (Greenspan and Cooper, 1993). Cette accumulation d'AcM semble également induire un stress membranaire conduisant au remodelage des radeaux lipidiques, dans lesquels sont localisés les gangliosides, ainsi qu'à la transduction d'un signal conduisant à l'apoptose. Afin d'identifier les mécanismes moléculaires mis en jeu dans les propriétés biologiques de l'AcM 8B6, nous avons étudié la relation structure fonction des IgG3 de souris à l'aide d'un ensemble de constructions chimériques dans lesquelles les domaines constants CH1, hinge, CH2 et CH3 de l'IgG1 humaine sont substitués tour à tour par les domaines constants homologues de l'IgG3 de souris. Cette stratégie nous a permis d'identifier l'importance, dans le maintien de l'activité pro-apoptotique, de la structure de l'AcM et principalement du pont disulfure liant le domaine CH1 au domaine C κ de l'IgG3 parentale. En particulier, la double mutation C10S -dans le domaine CH1- et S5C -dans l'hinge- (Nomenclature IMGT) dans la séquence de l'IgG1 humaine restaure l'activité pro-apoptotique de l'IgG3 murine 8B6. L'implication de cette double mutation dans les propriétés de l'AcM 8B6 doit encore être confirmée par l'obtention et l'analyse des caractéristiques de l'IgG3 murine possédant la double mutation inverse. Ces données permettent, sous réserve que ces mutations ne diminuent pas les fonctions effectrices et pharmacologiques de ces AcM de concevoir un format d'anticorps anti-GD2-Oac humanisé et optimisé pour son activité pro-apoptotique candidat au développement clinique. Enfin, ce modèle pourra être étendu à plusieurs anticorps ciblant d'autres gangliosides ou des protéines.

En raison du caractère unique de l'AcM 8B6, il existe très peu de données dans la littérature sur l'expression du GD2-Oac dans d'autres types tumoraux. Nous montrons ici que les indications des AcM thérapeutiques anti-GD2-Oac peuvent être étendues à d'autres cancers que le neuroblastome avec notamment chez l'adulte, le cancer du sein et le cancer pulmonaire à petites cellules. Les travaux du groupe du Pr. M. Andreff (MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA) ont conduit récemment à l'identification du GD2 comme marqueur des cellules souches tumorales de cancer du sein (Battula et al., 2012; Sarkar et al., 2014). Le GD2 a été mise en évidence à l'aide de l'AcM anti-GD2 14G2a décrit par ailleurs pour présenter une réactivité croisée pour son dérivé *O*-acétylé. Ces observations nous ont conduit à étudier l'expression du GD2-Oac sur cette population cellulaire qui serait à l'origine du développement, de la dissémination et de la résistance aux traitements de la tumeur. En

effet, ces cellules sont capables de s'auto-renouveler et de donner naissance, par division asymétrique, à des cellules cancéreuses. De plus, elles développent des mécanismes de résistances à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Afin de détruire la tumeur, il s'avère donc crucial d'éradiquer ces cellules souches cancéreuses.

Nous avons observé, par cytométrie de flux en utilisant l'AcM 8B6, la présence de cellules souches tumorales GD2-Oac⁺ dans des lignées de cancer du sein. De plus, nous avons observé que l'AcM 8B6 était capable d'inhiber la viabilité de la lignée de cellules de cancer du sein SUM159PT. Aussi, l'AcM 8B6 et ses propriétés pro-apoptotiques nous permettent de disposer d'un nouvel outil pour caractériser et cibler spécifiquement les cellules souches tumorales. Il permettra d'étudier l'importance du GD2-Oac dans la biologie de ces cellules. D'un point de vue clinique, nos résultats soulèvent la question de l'importance fonctionnelle du GD2-Oac dans leur capacité à résister à l'action de la radiothérapie et la chimiothérapie. En effet, des travaux récents rapportent que l'*O*-acétylation du ganglioside GD3, est corrélé à un phénotype chimiorésistant dans des leucémies aigue lymphoblastique B (Kniep et al., 2006; Mukherjee et al., 2008; Parameswaran et al., 2013). Par conséquent la sensibilité des cellules souches cancéreuses à la cytotoxicité cellulaire induite par l'AcM 8B6 en terme d'apoptose, de CDC et d'ADCC doit, maintenant, être caractérisée.

En conclusion, au cours de ces travaux de thèse, nous avons démontré l'importance de l'activité pro-apoptotique de l'AcM de souris 8B6, spécifique du GD2 *O*-acétylé, dans l'efficacité anti-tumorale des anticorps anti-GD2-Oac. Afin de disposer d'un AcM adapté à une utilisation chez l'homme nous avons produit et caractérisé un anticorps chimérique homme-souris nommé c.8B6, dont l'activité anti-tumorale est identique à celle de l'AcM thérapeutique anti-GD2 ch14.18. De plus, le c.8B6 ne déclenche pas d'effet allodynique contrairement à l'AcM ch14.18. Ces données nous encouragent donc à poursuivre le développement de cet anticorps dans le neuroblastome. A cette fin, nous souhaitons optimiser les propriétés pro-apoptotiques des AcM anti-GD2-Oac. Par ingénierie moléculaire nous avons identifié que la structure de l'AcM est impliquée dans l'activité pro-apoptotique des IgG spécifique du GD2-Oac. Enfin, des données préliminaires suggèrent qu'il est également possible de cibler ces cellules souches tumorales avec des AcM anti-GD2-Oac. Au vue du rôle de ces cellules dans la formation et les récives tumorales, ces observations sont particulièrement prometteuses.

Références bibliographiques

- Ahmed, M., and Cheung, N.-K.V. (2014). Engineering anti-GD2 monoclonal antibodies for cancer immunotherapy. *FEBS Lett.* 588, 288–297.
- Ahmed, M., Modak, S., and Sequeira, S. (2014). Acute pain relief after Mantram meditation in children with neuroblastoma undergoing anti-GD2 monoclonal antibody therapy. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 36, 152–155.
- Aixinjueluo, W., Furukawa, K., Zhang, Q., Hamamura, K., Tokuda, N., Yoshida, S., Ueda, R., and Furukawa, K. (2005). Mechanisms for the Apoptosis of Small Cell Lung Cancer Cells Induced by Anti-GD2 Monoclonal Antibodies ROLES OF ANOIKIS. *J. Biol. Chem.* 280, 29828–29836.
- Albertini, M.R., Hank, J.A., Schiller, J.H., Khorsand, M., Borchert, A.A., Gan, J., Bechhofer, R., Storer, B., Reisfeld, R.A., and Sondel, P.M. (1997). Phase IB trial of chimeric antidisialoganglioside antibody plus interleukin 2 for melanoma patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 3, 1277–1288.
- Alvarez-Rueda, N., Leprieur, S., Clémenceau, B., Supiot, S., Sébille-Rivain, V., Faivre-Chauvet, A., Davodeau, F., Paris, F., Barbet, J., Aubry, J., et al. (2007). Binding activities and antitumor properties of a new mouse/human chimeric antibody specific for GD2 ganglioside antigen. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 5613s – 5620s.
- Alvarez-Rueda, N., Desselle, A., Cochonneau, D., Chaumette, T., Clemenceau, B., Leprieur, S., Bougras, G., Supiot, S., Mussini, J.-M., Barbet, J., et al. (2011). A monoclonal antibody to O-acetyl-GD2 ganglioside and not to GD2 shows potent anti-tumor activity without peripheral nervous system cross-reactivity. *PloS One* 6, e25220.
- Arming, S., Wipfler, D., Mayr, J., Merling, A., Vilas, U., Schauer, R., Schwartz-Albiez, R., and Vlasak, R. (2011). The human Cas1 protein: a sialic acid-specific O-acetyltransferase? *Glycobiology* 21, 553–564.
- Avrova, N.F., Ghidoni, R., Karpova, O.B., Nalivayeva, N.N., Malesci, A., and Tettamanti, G. (1986). Systematic position of fish species and ganglioside composition and content. *Comp. Biochem. Physiol. B* 83, 669–676.
- Baeuerle, P.A., and Reinhardt, C. (2009). Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy. *Cancer Res.* 69, 4941–4944.
- Barbet, J., Chatal, J.-F., and Kraeber-Bodéré, F. (2009). [Radiolabeled antibodies for cancer treatment]. *Médecine Sci.* MS 25, 1039–1045.
- Bargou, R., Leo, E., Zugmaier, G., Klinger, M., Goebeler, M., Knop, S., Noppeney, R., Viardot, A., Hess, G., Schuler, M., et al. (2008). Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science* 321, 974–977.
- Barker, E., Mueller, B.M., Handgretinger, R., Herter, M., Yu, A.L., and Reisfeld, R.A. (1991). Effect of a chimeric anti-ganglioside GD2 antibody on cell-mediated lysis of human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 51, 144–149.
- Baselga, J. (2001). The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 37 Suppl 4, S16–S22.
- Battula, V.L., Shi, Y., Evans, K.W., Wang, R.-Y., Spaeth, E.L., Jacamo, R.O., Guerra, R., Sahin, A.A., Marini, F.C., Hortobagyi, G., et al. (2012). Ganglioside GD2 identifies breast cancer stem cells and promotes tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* 122, 2066–2078.
- Beck, A., and Reichert, J.M. (2014). Antibody-drug conjugates: present and future. *mAbs* 6, 15–17.
- Becker, J.C., Pancook, J.D., Gillies, S.D., Mendelsohn, J., and Reisfeld, R.A. (1996). Eradication of human hepatic and pulmonary melanoma metastases in SCID mice by antibody-interleukin 2 fusion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 2702–2707.

- 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. *Mol. Cancer* 6, 66.
- Berger, C., Berger, M., Hackman, R.C., Gough, M., Elliott, C., Jensen, M.C., and Riddell, S.R. (2009). Safety and immunologic effects of IL-15 administration in nonhuman primates. *Blood* 114, 2417–2426.
- Bhattacharya-Chatterjee, M., Chatterjee, S.K., and Foon, K.A. (2002). Anti-idiotypic antibody vaccine therapy for cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2, 869–881.
- Birklé, S., Gao, L., Zeng, G., and Yu, R.K. (2000). Down-regulation of GD3 ganglioside and its O-acetylated derivative by stable transfection with antisense vector against GD3-synthase gene expression in hamster melanoma cells: effects on cellular growth, melanogenesis, and dendricity. *J. Neurochem.* 74, 547–554.
- Birklé, S., Zeng, G., Gao, L., Yu, R.K., and Aubry, J. (2003). Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochimie* 85, 455–463.
- Boehrer, S., Schroeder, P., Mueller, T., Atz, J., and Chow, K.U. (2011). Cytotoxic effects of the trifunctional bispecific antibody FBTA05 in ex-vivo cells of chronic lymphocytic leukaemia depend on immune-mediated mechanism. *Anticancer. Drugs* 22, 519–530.
- Bose, B., Osterholm, J.L., and Kalia, M. (1986). Ganglioside-induced regeneration and reestablishment of axonal continuity in spinal cord-transected rats. *Neurosci. Lett.* 63, 165–169.
- Boulianne, G.L., Hozumi, N., and Shulman, M.J. (1984). Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature* 312, 643–646.
- Brockner, T., and Karjalainen, K. (1995). Signals through T cell receptor-zeta chain alone are insufficient to prime resting T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 181, 1653–1659.
- Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Barrett, A., Berthold, F., Castleberry, R.P., D’Angio, G., De Bernardi, B., Evans, A.E., Favrot, M., and Freeman, A.I. (1988). International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 6, 1874–1881.
- Brodeur, G.M., Pritchard, J., Berthold, F., Carlsen, N.L., Castel, V., Castelberry, R.P., De Bernardi, B., Evans, A.E., Favrot, M., and Hedborg, F. (1993). Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 11, 1466–1477.
- Bruhns, P. (2012). Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* 119, 5640–5649.
- Buchegger, F., Press, O.W., Delaloye, A.B., and Ketterer, N. (2008). Radiolabeled and native antibodies and the prospect of cure of follicular lymphoma. *The Oncologist* 13, 657–667.
- Carpenito, C., Milone, M.C., Hassan, R., Simonet, J.C., Lakhai, M., Suhoski, M.M., Varela-Rohena, A., Haines, K.M., Heitjan, D.F., Albelda, S.M., et al. (2009). Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 3360–3365.
- Carr, A., Mullet, A., Mazonra, Z., Vázquez, A.M., Alfonso, M., Mesa, C., Rengifo, E., Pérez, R., and Fernández, L.E. (2000). A mouse IgG1 monoclonal antibody specific for N-glycolyl GM3 ganglioside recognized breast and melanoma tumors. *Hybridoma* 19, 241–247.
- Cazet, A., Groux-Degroote, S., Teylaert, B., Kwon, K.-M., Lehoux, S., Slomianny, C., Kim, C.-H., Le Bourhis, X., and Delannoy, P. (2009). GD3 synthase overexpression enhances proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biol. Chem.* 390, 601–609.

- Cazet, A., Lefebvre, J., Adriaenssens, E., Julien, S., Bobowski, M., Grigoriadis, A., Tutt, A., Tulasne, D., Le Bourhis, X., and Delannoy, P. (2010). GD₃ synthase expression enhances proliferation and tumor growth of MDA-MB-231 breast cancer cells through c-Met activation. *Mol. Cancer Res. MCR* 8, 1526–1535.
- Cazet, A., Bobowski, M., Rombouts, Y., Lefebvre, J., Steenackers, A., Popa, I., Guérardel, Y., Le Bourhis, X., Tulasne, D., and Delannoy, P. (2012). The ganglioside G(D2) induces the constitutive activation of c-Met in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the G(D3) synthase. *Glycobiology* 22, 806–816.
- Cerato, E., Birkle, S., Portoukalian, J., Mezazigh, A., Chatal, J.F., and Aubry, J. (1997). Variable region gene segments of nine monoclonal antibodies specific to disialogangliosides (GD2, GD3) and their O-acetylated derivatives. *Hybridoma* 16, 307–316.
- Chames, P., and Baty, D. (2009). Bispecific antibodies for cancer therapy. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 12, 276–283.
- Chan, A.C., and Carter, P.J. (2010). Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 301–316.
- Chapman, P.B., Gillies, S.D., Houghton, A.N., and Reilly, R.M. (1994). Mapping effector functions of a monoclonal antibody to GD3 by characterization of a mouse-human chimeric antibody. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 39, 198–204.
- Chelius, D., Ruf, P., Gruber, P., Plösch, M., Liedtke, R., Gansberger, E., Hess, J., Wasiliu, M., and Lindhofer, H. (2010). Structural and functional characterization of the trifunctional antibody catumaxomab. *mAbs* 2, 309–319.
- Cheng, M., Ahmed, M., Xu, H., and Cheung, N.-K.V. (2014). Structural design of disialoganglioside GD2 and CD3-bispecific antibodies to redirect T cells for tumor therapy. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer.*
- Cheresh, D.A., and Klier, F.G. (1986). Disialoganglioside GD2 distributes preferentially into substrate-associated microprocesses on human melanoma cells during their attachment to fibronectin. *J. Cell Biol.* 102, 1887–1897.
- Cheresh, D.A., Harper, J.R., Schulz, G., and Reisfeld, R.A. (1984a). Localization of the gangliosides GD2 and GD3 in adhesion plaques and on the surface of human melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 5767–5771.
- Cheresh, D.A., Reisfeld, R.A., and Varki, A.P. (1984b). O-acetylation of disialoganglioside GD3 by human melanoma cells creates a unique antigenic determinant. *Science* 225, 844–846.
- Cheresh, D.A., Pierschbacher, M.D., Herzig, M.A., and Mujoo, K. (1986a). Disialogangliosides GD2 and GD3 are involved in the attachment of human melanoma and neuroblastoma cells to extracellular matrix proteins. *J. Cell Biol.* 102, 688–696.
- Cheresh, D.A., Rosenberg, J., Mujoo, K., Hirschowitz, L., and Reisfeld, R.A. (1986b). Biosynthesis and expression of the disialoganglioside GD2, a relevant target antigen on small cell lung carcinoma for monoclonal antibody-mediated cytotoxicity. *Cancer Res.* 46, 5112–5118.
- Cheson, B.D., and Leonard, J.P. (2008). Monoclonal antibody therapy for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 359, 613–626.
- Cheung, N.-K.V., and Modak, S. (2002). Oral (1->3),(1->4)-beta-D-glucan synergizes with antiganglioside GD2 monoclonal antibody 3F8 in the therapy of neuroblastoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 8, 1217–1223.
- Cheung, N.K., Saarinen, U.M., Neely, J.E., Landmeier, B., Donovan, D., and Coccia, P.F. (1985). Monoclonal antibodies to a glycolipid antigen on human neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 45, 2642–2649.

- Cheung, N.K., Landmeier, B., Neely, J., Nelson, A.D., Abramowsky, C., Ellery, S., Adams, R.B., and Miraldi, F. (1986). Complete tumor ablation with iodine 131-radiolabeled disialoganglioside GD2-specific monoclonal antibody against human neuroblastoma xenografted in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* *77*, 739–745.
- Cheung, N.K., Lazarus, H., Miraldi, F.D., Abramowsky, C.R., Kallick, S., Saarinen, U.M., Spitzer, T., Strandjord, S.E., Coccia, P.F., and Berger, N.A. (1987). Ganglioside GD2 specific monoclonal antibody 3F8: a phase I study in patients with neuroblastoma and malignant melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *5*, 1430–1440.
- Cheung, N.K., Walter, E.I., Smith-Mensah, W.H., Ratnoff, W.D., Tykocinski, M.L., and Medof, M.E. (1988). Decay-accelerating factor protects human tumor cells from complement-mediated cytotoxicity in vitro. *J. Clin. Invest.* *81*, 1122–1128.
- Cheung, N.K., Cheung, I.Y., Canete, A., Yeh, S.J., Kushner, B., Bonilla, M.A., Heller, G., and Larson, S.M. (1994a). Antibody response to murine anti-GD2 monoclonal antibodies: correlation with patient survival. *Cancer Res.* *54*, 2228–2233.
- Cheung, N.K., Kushner, B.H., Yeh, S.J., and Larson, S.M. (1994b). 3F8 monoclonal antibody treatment of patients with stage IV neuroblastoma: a phase II study. *Prog. Clin. Biol. Res.* *385*, 319–328.
- Cheung, N.K., Kushner, B.H., Yeh, S.D., and Larson, S.M. (1998). 3F8 monoclonal antibody treatment of patients with stage 4 neuroblastoma: a phase II study. *Int. J. Oncol.* *12*, 1299–1306.
- Cheung, N.-K.V., Modak, S., Lin, Y., Guo, H., Zanzonico, P., Chung, J., Zuo, Y., Sanderson, J., Wilbert, S., Theodore, L.J., et al. (2004). Single-chain Fv-streptavidin substantially improved therapeutic index in multistep targeting directed at disialoganglioside GD2. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* *45*, 867–877.
- Cheung, N.-K.V., Guo, H., Hu, J., Tassev, D.V., and Cheung, I.Y. (2012a). Humanizing murine IgG3 anti-GD2 antibody m3F8 substantially improves antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity while retaining targeting in vivo. *Oncoimmunology* *1*, 477–486.
- Cheung, N.-K.V., Cheung, I.Y., Kushner, B.H., Ostrovnaya, I., Chamberlain, E., Kramer, K., and Modak, S. (2012b). Murine anti-GD2 monoclonal antibody 3F8 combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and 13-cis-retinoic acid in high-risk patients with stage 4 neuroblastoma in first remission. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *30*, 3264–3270.
- Cheung, N.-K.V., Cheung, I.Y., Kramer, K., Modak, S., Kuk, D., Pandit-Taskar, N., Chamberlain, E., Ostrovnaya, I., and Kushner, B.H. (2014). Key role for myeloid cells: Phase II results of anti-GD2 antibody 3F8 plus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for chemoresistant osteomedullary neuroblastoma. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer.*
- Choi, B.D., Cai, M., Bigner, D.D., Mehta, A.I., Kuan, C.-T., and Sampson, J.H. (2011). Bispecific antibodies engage T cells for antitumor immunotherapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* *11*, 843–853.
- Cochonneau, D., Terme, M., Michaud, A., Dorvillius, M., Gautier, N., Frikeche, J., Alvarez-Rueda, N., Bougras, G., Aubry, J., Paris, F., et al. (2013). Cell cycle arrest and apoptosis induced by O-acetyl-GD2-specific monoclonal antibody 8B6 inhibits tumor growth in vitro and in vivo. *Cancer Lett.* *333*, 194–204.
- Cooper, S., and Spiro, S.G. (2006). Small cell lung cancer: treatment review. *Respirol. Carlton Vic* *11*, 241–248.
- Cooper, L.J., Schimenti, J.C., Glass, D.D., and Greenspan, N.S. (1991). H chain C domains influence the strength of binding of IgG for streptococcal group A carbohydrate. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *146*, 2659–2663.

- Cooper, L.J.N., Topp, M.S., Serrano, L.M., Gonzalez, S., Chang, W.-C., Naranjo, A., Wright, C., Popplewell, L., Raubitschek, A., Forman, S.J., et al. (2003). T-cell clones can be rendered specific for CD19: toward the selective augmentation of the graft-versus-B-lineage leukemia effect. *Blood* *101*, 1637–1644.
- Crespo, P.M., Demichelis, V.T., and Daniotti, J.L. (2010). Neobiosynthesis of Glycosphingolipids by Plasma Membrane-associated Glycosyltransferases. *J. Biol. Chem.* *285*, 29179–29190.
- Crocker, P.R., Paulson, J.C., and Varki, A. (2007). Siglecs and their roles in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 255–266.
- Cuvillier, O. (2002). Sphingosine in apoptosis signaling. *Biochim. Biophys. Acta* *1585*, 153–162.
- Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P.G., Coso, O.A., Gutkind, S., and Spiegel, S. (1996). Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* *381*, 800–803.
- Daniotti, J.L., and Iglesias-Bartolomé, R. (2011). Metabolic pathways and intracellular trafficking of gangliosides. *IUBMB Life* *63*, 513–520.
- Degroote, S., Wolthoorn, J., and van Meer, G. (2004). The cell biology of glycosphingolipids. *Semin. Cell Dev. Biol.* *15*, 375–387.
- Deng, W., Li, R., and Ladisch, S. (2000). Influence of cellular ganglioside depletion on tumor formation. *J. Natl. Cancer Inst.* *92*, 912–917.
- Diermeier-Daucher, S., Ortmann, O., Buchholz, S., and Brockhoff, G. (2012). Trifunctional antibody ertumaxomab: Non-immunological effects on Her2 receptor activity and downstream signaling. *mAbs* *4*, 614–622.
- Dippold, W.G., Lloyd, K.O., Li, L.T., Ikeda, H., Oettgen, H.F., and Old, L.J. (1980). Cell surface antigens of human malignant melanoma: definition of six antigenic systems with mouse monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *77*, 6114–6118.
- Doronin, I.I., Vishnyakova, P.A., Kholodenko, I.V., Ponomarev, E.D., Ryazantsev, D.Y., Molotkovskaya, I.M., and Kholodenko, R.V. (2014). Ganglioside GD2 in reception and transduction of cell death signal in tumor cells. *BMC Cancer* *14*, 295.
- Dorvillius, M., Garambois, V., Pourquier, D., Gutowski, M., Rouanet, P., Mani, J.-C., Pugnière, M., Hynes, N.E., and Pèlerin, A. (2002). Targeting of human breast cancer by a bispecific antibody directed against two tumour-associated antigens: ErbB-2 and carcinoembryonic antigen. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *23*, 337–347.
- Dotti, G., Savoldo, B., and Brenner, M. (2009). Fifteen years of gene therapy based on chimeric antigen receptors: “are we nearly there yet?” *Hum. Gene Ther.* *20*, 1229–1239.
- Van Echten, G., and Sandhoff, K. (1993). Ganglioside metabolism. Enzymology, Topology, and regulation. *J. Biol. Chem.* *268*, 5341–5344.
- Eidels, L., Proia, R.L., and Hart, D.A. (1983). Membrane receptors for bacterial toxins. *Microbiol. Rev.* *47*, 596–620.
- Eissler, N., Ruf, P., Mysliwicz, J., Lindhofer, H., and Mocikat, R. (2012). Trifunctional Bispecific Antibodies Induce Tumor-Specific T Cells and Elicit a Vaccination Effect. *Cancer Res.* *72*, 3958–3966.
- Epardaud, M., Elpek, K.G., Rubinstein, M.P., Yonekura, A., Bellemare-Pelletier, A., Bronson, R., Hamerman, J.A., Goldrath, A.W., and Turley, S.J. (2008). Interleukin-15/interleukin-15R alpha complexes promote destruction of established tumors by reviving tumor-resident CD8+ T cells. *Cancer Res.* *68*, 2972–2983.

- Erdmann, M., Wipfler, D., Merling, A., Cao, Y., Claus, C., Kniep, B., Sadick, H., Bergler, W., Vlasak, R., and Schwartz-Albiez, R. (2006). Differential surface expression and possible function of 9-O- and 7-O-acetylated GD3 (CD60 b and c) during activation and apoptosis of human tonsillar B and T lymphocytes. *Glycoconj. J.* *23*, 627–638.
- Esser, R., Müller, T., Stefes, D., Kloess, S., Seidel, D., Gillies, S.D., Aperlo-Iffland, C., Huston, J.S., Uherek, C., Schönfeld, K., et al. (2012). NK cells engineered to express a GD2 -specific antigen receptor display built-in ADCC-like activity against tumour cells of neuroectodermal origin. *J. Cell. Mol. Med.* *16*, 569–581.
- Ferrara, N., Hillan, K.J., Gerber, H.-P., and Novotny, W. (2004). Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* *3*, 391–400.
- Finney, H.M., Lawson, A.D., Bebbington, C.R., and Weir, A.N. (1998). Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *161*, 2791–2797.
- Frost, J.D., Hank, J.A., Reaman, G.H., Friedrich, S., Seeger, R.C., Gan, J., Anderson, P.M., Ettinger, L.J., Cairo, M.S., Blazar, B.R., et al. (1997). A phase I/IB trial of murine monoclonal anti-GD2 antibody 14.G2a plus interleukin-2 in children with refractory neuroblastoma: a report of the Children's Cancer Group. *Cancer* *80*, 317–333.
- Fukuda, M., Horibe, K., and Furukawa, K. (1998). Enhancement of in vitro and in vivo anti-tumor activity of anti-GD2 monoclonal antibody 220-51 against human neuroblastoma by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor. *Int. J. Mol. Med.* *2*, 471–475.
- Fukuda, M., Rutishauser, U., and Schnaar, R.L. (2005). *Neuroglycobiology* (Oxford University Press).
- Furukawa, K., Takamiya, K., and Furukawa, K. (2002). β 1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase—GM2/GD2 synthase: a key enzyme to control the synthesis of brain-enriched complex gangliosides. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1573*, 356–362.
- Furukawa, K., Hamamura, K., Aixinjueluo, W., and Furukawa, K. (2006). Biosignals modulated by tumor-associated carbohydrate antigens: novel targets for cancer therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1086*, 185–198.
- Furukawa, K., Aixinjueluo, W., Kasama, T., Ohkawa, Y., Yoshihara, M., Ohmi, Y., Tajima, O., Suzumura, A., Kittaka, D., and Furukawa, K. (2008). Disruption of GM2/GD2 synthase gene resulted in overt expression of 9-O-acetyl GD3 irrespective of Tis21. *J. Neurochem.* *105*, 1057–1066.
- Furukawa, K., Hamamura, K., Ohkawa, Y., Ohmi, Y., and Furukawa, K. (2012). Disialyl gangliosides enhance tumor phenotypes with differential modalities. *Glycoconj. J.* *29*, 579–584.
- Furukawa, K., Kambe, M., Miyata, M., Ohkawa, Y., Tajima, O., and Furukawa, K. (2014). Ganglioside GD3 induces convergence and synergism of adhesion and hepatocyte growth factor/Met signals in melanomas. *Cancer Sci.* *105*, 52–63.
- Garcia, A.D., Chavez, J.L., and Mechref, Y. (2014). Rapid and sensitive LC-ESI-MS of gangliosides. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* *947-948*, 1–7.
- Gelderman, K.A., Tomlinson, S., Ross, G.D., and Gorter, A. (2004). Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. *Trends Immunol.* *25*, 158–164.
- Gillies, S.D., Lo, K.M., and Wesolowski, J. (1989). High-level expression of chimeric antibodies using adapted cDNA variable region cassettes. *J. Immunol. Methods* *125*, 191–202.
- Gillies, S.D., Reilly, E.B., Lo, K.M., and Reisfeld, R.A. (1992). Antibody-targeted interleukin 2 stimulates T-cell killing of autologous tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 1428–1432.
- Gillies, S.D., Young, D., Lo, K.M., and Roberts, S. (1993). Biological activity and in vivo clearance of antitumor antibody/cytokine fusion proteins. *Bioconjug. Chem.* *4*, 230–235.

- Gilman, A.L., Ozkaynak, M.F., Matthay, K.K., Krailo, M., Yu, A.L., Gan, J., Sternberg, A., Hank, J.A., Seeger, R., Reaman, G.H., et al. (2009). Phase I study of ch14.18 with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 in children with neuroblastoma after autologous bone marrow transplantation or stem-cell rescue: a report from the Children's Oncology Group. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *27*, 85–91.
- Giraudo, C.G., and Maccioni, H.J.F. (2003). Ganglioside glycosyltransferases organize in distinct multienzyme complexes in CHO-K1 cells. *J. Biol. Chem.* *278*, 40262–40271.
- Giraudo, C.G., Daniotti, J.L., and Maccioni, H.J. (2001). Physical and functional association of glycolipid N-acetyl-galactosaminyl and galactosyl transferases in the Golgi apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 1625–1630.
- Gluck, W.L., Hurst, D., Yuen, A., Levine, A.M., Dayton, M.A., Gockerman, J.P., Lucas, J., Denis-Mize, K., Tong, B., Navis, D., et al. (2004). Phase I studies of interleukin (IL)-2 and rituximab in B-cell non-hodgkin's lymphoma: IL-2 mediated natural killer cell expansion correlations with clinical response. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *10*, 2253–2264.
- Goldenberg, D.M., Sharkey, R.M., Paganelli, G., Barbet, J., and Chatal, J.-F. (2006). Antibody pretargeting advances cancer radioimmunodetection and radioimmunotherapy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *24*, 823–834.
- Gómez, R.E., and Ardigo, M.L. (2012). Anti-idiotypic antibodies in cancer treatment: the pharmaceutical industry perspective. *Front. Oncol.* *2*, 147.
- Govindan, S.V., and Goldenberg, D.M. (2010). New antibody conjugates in cancer therapy. *ScientificWorldJournal* *10*, 2070–2089.
- Govindan, S.V., and Goldenberg, D.M. (2012). Designing immunoconjugates for cancer therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* *12*, 873–890.
- Greenspan, N.S., and Cooper, L.J. (1993). Cooperative binding by mouse IgG3 antibodies: implications for functional affinity, effector function, and isotype restriction. *Springer Semin. Immunopathol.* *15*, 275–291.
- Greenspan, N.S., Dacek, D.A., and Cooper, L.J. (1989). Cooperative binding of two antibodies to independent antigens by an Fc-dependent mechanism. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *3*, 2203–2207.
- Gross, N., Beck, D., Portoukalian, J., Favre, S., and Carrel, S. (1989). New anti-GD2 monoclonal antibodies produced from gamma-interferon-treated neuroblastoma cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *43*, 665–671.
- Grosso, J.F., and Jure-Kunkel, M.N. (2013). CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. *Cancer Immun.* *13*, 5.
- Al-Hajj, M., and Clarke, M.F. (2004). Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* *23*, 7274–7282.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 3983–3988.
- Hakomori, S. -i. (2002). The glycosynapse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 225–232.
- Hammache, D., Piéroni, G., Yahi, N., Delézay, O., Koch, N., Lafont, H., Tamalet, C., and Fantini, J. (1998). Specific interaction of HIV-1 and HIV-2 surface envelope glycoproteins with monolayers of galactosylceramide and ganglioside GM3. *J. Biol. Chem.* *273*, 7967–7971.
- Handgretinger, R., Baader, P., Dopfer, R., Klingebiel, T., Reuland, P., Treuner, J., Reisfeld, R.A., and Niethammer, D. (1992). A phase I study of neuroblastoma with the anti-ganglioside GD2 antibody 14.G2a. *Cancer Immunol. Immunother. CII* *35*, 199–204.

- Handgretinger, R., Anderson, K., Lang, P., Dopfer, R., Klingebiel, T., Schrappe, M., Reuland, P., Gillies, S.D., Reisfeld, R.A., and Neithammer, D. (1995). A phase I study of human/mouse chimeric antiganglioside GD2 antibody ch14.18 in patients with neuroblastoma. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 *31A*, 261–267.
- Hank, J.A., Robinson, R.R., Surfus, J., Mueller, B.M., Reisfeld, R.A., Cheung, N.K., and Sondel, P.M. (1990). Augmentation of antibody dependent cell mediated cytotoxicity following in vivo therapy with recombinant interleukin 2. *Cancer Res.* *50*, 5234–5239.
- Hank, J.A., Surfus, J., Gan, J., Chew, T.L., Hong, R., Tans, K., Reisfeld, R., Seeger, R.C., Reynolds, C.P., and Bauer, M. (1994). Treatment of neuroblastoma patients with antiganglioside GD2 antibody plus interleukin-2 induces antibody-dependent cellular cytotoxicity against neuroblastoma detected in vitro. *J. Immunother. Emphas. Tumor Immunol. Off. J. Soc. Biol. Ther.* *15*, 29–37.
- Hank, J.A., Surfus, J.E., Gan, J., Jaeger, P., Gillies, S.D., Reisfeld, R.A., and Sondel, P.M. (1996). Activation of human effector cells by a tumor reactive recombinant anti-ganglioside GD2 interleukin-2 fusion protein (ch14.18-IL2). *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *2*, 1951–1959.
- Hank, J.A., Gan, J., Ryu, H., Ostendorf, A., Stauder, M.C., Sternberg, A., Albertini, M., Lo, K.-M., Gillies, S.D., Eickhoff, J., et al. (2009). Immunogenicity of the hu14.18-IL2 immunocytokine molecule in adults with melanoma and children with neuroblastoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 5923–5930.
- Heczey, A., and Louis, C.U. (2013). Advances in chimeric antigen receptor immunotherapy for neuroblastoma. *Discov. Med.* *16*, 287–294.
- Heczey, A., Liu, D., Tian, G., Courtney, A.N., Wei, J., Marinova, E., Gao, X., Guo, L., Yvon, E., Hicks, J., et al. (2014). Invariant NKT cells with chimeric antigen receptor provide a novel platform for safe and effective cancer immunotherapy. *Blood*.
- Higa, H.H., Butor, C., Diaz, S., and Varki, A. (1989). O-acetylation and de-O-acetylation of sialic acids. O-acetylation of sialic acids in the rat liver Golgi apparatus involves an acetyl intermediate and essential histidine and lysine residues--a transmembrane reaction? *J. Biol. Chem.* *264*, 19427–19434.
- Hirabayashi, Y., Hirota, M., Suzuki, Y., Matsumoto, M., Obata, K., and Ando, S. (1989). Developmentally expressed O-acetyl ganglioside GT3 in fetal rat cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* *106*, 193–198.
- Hodi, F.S., O’Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., et al. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* *363*, 711–723.
- Hoehner, J.C., Gestblom, C., Hedborg, F., Sandstedt, B., Olsen, L., and Pählman, S. (1996). A developmental model of neuroblastoma: differentiating stroma-poor tumors’ progress along an extra-adrenal chromaffin lineage. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *75*, 659–675.
- Hoffmann, T.K., Meidenbauer, N., Dworacki, G., Kanaya, H., and Whiteside, T.L. (2000). Generation of tumor-specific T-lymphocytes by cross-priming with human dendritic cells ingesting apoptotic tumor cells. *Cancer Res.* *60*, 3542–3549.
- Hong, F., Yan, J., Baran, J.T., Allendorf, D.J., Hansen, R.D., Ostroff, G.R., Xing, P.X., Cheung, N.-K.V., and Ross, G.D. (2004). Mechanism by which orally administered beta-1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 797–806.
- Horwacik, I., Durbas, M., Boratyn, E., Węgrzyn, P., and Rokita, H. (2013). Targeting GD2 ganglioside and aurora A kinase as a dual strategy leading to cell death in cultures of human neuroblastoma cells. *Cancer Lett.* *341*, 248–264.
- Hwang, W.Y.K., and Foote, J. (2005). Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods San Diego Calif* *36*, 3–10.

- Hwu, P., Yang, J.C., Cowherd, R., Treisman, J., Shafer, G.E., Eshhar, Z., and Rosenberg, S.A. (1995). In vivo antitumor activity of T cells redirected with chimeric antibody/T-cell receptor genes. *Cancer Res.* 55, 3369–3373.
- Ichikawa, N., Iwabuchi, K., Kurihara, H., Ishii, K., Kobayashi, T., Sasaki, T., Hattori, N., Mizuno, Y., Hozumi, K., Yamada, Y., et al. (2009). Binding of laminin-1 to monosialoganglioside GM1 in lipid rafts is crucial for neurite outgrowth. *J. Cell Sci.* 122, 289–299.
- Igawa, T., Tsunoda, H., Kuramochi, T., Sampei, Z., Ishii, S., and Hattori, K. (2011). Engineering the variable region of therapeutic IgG antibodies. *mAbs* 3, 243–252.
- Iglesias-Bartolomé, R., Crespo, P.M., Gomez, G.A., and Daniotti, J.L. (2006). The antibody to GD3 ganglioside, R24, is rapidly endocytosed and recycled to the plasma membrane via the endocytic recycling compartment. Inhibitory effect of brefeldin A and monensin. *FEBS J.* 273, 1744–1758.
- Iliopoulos, D., Ernst, C., Steplewski, Z., Jambrosic, J.A., Rodeck, U., Herlyn, M., Clark, W.H., Jr, Koprowski, H., and Herlyn, D. (1989). Inhibition of metastases of a human melanoma xenograft by monoclonal antibody to the GD2/GD3 gangliosides. *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 440–444.
- Imai, K., and Takaoka, A. (2006). Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 714–727.
- Ishii, A., Ohta, M., Watanabe, Y., Matsuda, K., Ishiyama, K., Sakoe, K., Nakamura, M., Inokuchi, J., Sanai, Y., and Saito, M. (1998). Expression Cloning and Functional Characterization of Human cDNA for Ganglioside GM3 Synthase. *J. Biol. Chem.* 273, 31652–31655.
- Jin, H.J., Nam, H.Y., Bae, Y.K., Kim, S.Y., Im, I.R., Oh, W., Yang, Y.S., Choi, S.J., and Kim, S.W. (2010). GD2 expression is closely associated with neuronal differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 67, 1845–1858.
- Johnson, E.E., Lum, H.D., Rakhmilevich, A.L., Schmidt, B.E., Furlong, M., Buhtoiarov, I.N., Hank, J.A., Raubitschek, A., Colcher, D., Reisfeld, R.A., et al. (2008). Intratumoral immunocytokine treatment results in enhanced antitumor effects. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 57, 1891–1902.
- Kailayangiri, S., Altvater, B., Meltzer, J., Pscherer, S., Luecke, A., Dierkes, C., Titze, U., Leuchte, K., Landmeier, S., Hotfilder, M., et al. (2012). The ganglioside antigen GD2 is surface-expressed in Ewing sarcoma and allows for MHC-independent immune targeting. *Br. J. Cancer* 106, 1123–1133.
- Kakugawa, Y., Wada, T., Yamaguchi, K., Yamanami, H., Ouchi, K., Sato, I., and Miyagi, T. (2002). Up-regulation of plasma membrane-associated ganglioside sialidase (Neu3) in human colon cancer and its involvement in apoptosis suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 10718–10723.
- Kaminski, M.J., MacKenzie, C.R., Mooibroek, M.J., Dahms, T.E., Hirama, T., Houghton, A.N., Chapman, P.B., and Evans, S.V. (1999). The role of homophilic binding in anti-tumor antibody R24 recognition of molecular surfaces. Demonstration of an intermolecular beta-sheet interaction between vh domains. *J. Biol. Chem.* 274, 5597–5604.
- Kanamori, A., Nakayama, J., Fukuda, M.N., Stallcup, W.B., Sasaki, K., Fukuda, M., and Hirabayashi, Y. (1997). Expression cloning and characterization of a cDNA encoding a novel membrane protein required for the formation of O-acetylated ganglioside: a putative acetyl-CoA transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 2897–2902.
- Kang, C.Y., Brunck, T.K., Kieber-Emmons, T., Blalock, J.E., and Kohler, H. (1988). Inhibition of self-binding antibodies (autobodies) by a VH-derived peptide. *Science* 240, 1034–1036.
- Kawai, H., Sango, K., Mullin, K.A., and Proia, R.L. (1998). Embryonic stem cells with a disrupted GD3 synthase gene undergo neuronal differentiation in the absence of b-series gangliosides. *J. Biol. Chem.* 273, 19634–19638.
- Kawashima, I., Nakamura, O., and Tai, T. (1992). Antibody responses to ganglio-series gangliosides in different strains of inbred mice. *Mol. Immunol.* 29, 625–632.

- Kendra, K., Malkovska, V., Allen, M., Guzman, J., and Albertini, M. (1999). In vivo binding and antitumor activity of Ch14.18. *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997 22, 423–430.
- King, D.M., Albertini, M.R., Schalch, H., Hank, J.A., Gan, J., Surfus, J., Mahvi, D., Schiller, J.H., Warner, T., Kim, K., et al. (2004). Phase I clinical trial of the immunocytokine EMD 273063 in melanoma patients. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 22, 4463–4473.
- Kniep, B., Peter-Katalinić, J., Flegel, W., Northoff, H., and Rieber, E.P. (1992). CDw 60 antibodies bind to acetylated forms of ganglioside GD3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 1343–1349.
- Kniep, B., Kniep, E., Ozkucur, N., Barz, S., Bachmann, M., Malisan, F., Testi, R., and Rieber, E.P. (2006). 9-O-acetyl GD3 protects tumor cells from apoptosis. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 119, 67–73.
- Ko, K., Furukawa, K., Takahashi, T., Urano, T., Sanai, Y., Nagino, M., Nimura, Y., and Furukawa, K. (2006). Fundamental study of small interfering RNAs for ganglioside GD3 synthase gene as a therapeutic target of lung cancers. *Oncogene* 25, 6924–6935.
- Kohla, G., Stockfleth, E., and Schauer, R. (2002). Gangliosides with O-acetylated sialic acids in tumors of neuroectodermal origin. *Neurochem. Res.* 27, 583–592.
- Köhler, G., and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495–497.
- Kolesnick, R.N., and Krönke, M. (1998). Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 643–665.
- Kotani, M., Kawashima, I., Ozawa, H., Terashima, T., and Tai, T. (1993). Differential distribution of major gangliosides in rat central nervous system detected by specific monoclonal antibodies. *Glycobiology* 3, 137–146.
- Kowalczyk, A., Gil, M., Horwacik, I., Odrowaz, Z., Kozbor, D., and Rokita, H. (2009). The GD2-specific 14G2a monoclonal antibody induces apoptosis and enhances cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in IMR-32 human neuroblastoma cells. *Cancer Lett.* 281, 171–182.
- Kramer, K., Kushner, B.H., Modak, S., Pandit-Taskar, N., Smith-Jones, P., Zanzonico, P., Humm, J.L., Xu, H., Wolden, S.L., Souweidane, M.M., et al. (2010). Compartmental intrathecal radioimmunotherapy: results for treatment for metastatic CNS neuroblastoma. *J. Neurooncol.* 97, 409–418.
- Kremens, B., Hero, B., Esser, J., Weinel, P., Filger-Brillinger, J., Fleischhack, G., Graf, N., Grüttner, H.-P., Niemeyer, C., Schulz, A., et al. (2002). Ocular symptoms in children treated with human-mouse chimeric anti-GD2 mAb ch14.18 for neuroblastoma. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 51, 107–110.
- Kubo, T., Takigawa, N., Osawa, M., Harada, D., Ninomiya, T., Ochi, N., Ichihara, E., Yamane, H., Tanimoto, M., and Kiura, K. (2013). Subpopulation of small-cell lung cancer cells expressing CD133 and CD87 show resistance to chemotherapy. *Cancer Sci.* 104, 78–84.
- Kushner, B.H., and Cheung, N.K. (1989). GM-CSF enhances 3F8 monoclonal antibody-dependent cellular cytotoxicity against human melanoma and neuroblastoma. *Blood* 73, 1936–1941.
- Kushner, B.H., Kramer, K., and Cheung, N.K. (2001). Phase II trial of the anti-G(D2) monoclonal antibody 3F8 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for neuroblastoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 19, 4189–4194.
- Kushner, B.H., Kramer, K., Modak, S., Yataghene, K., and Cheung, N.-K.V. (2011a). High-dose cyclophosphamide-irinotecan-vincristine for primary refractory neuroblastoma. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 47, 84–89.
- Kushner, B.H., Kramer, K., Modak, S., and Cheung, N.-K.V. (2011b). Successful multifold dose escalation of anti-GD2 monoclonal antibody 3F8 in patients with neuroblastoma: a phase I study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29, 1168–1174.

- Ladenstein, R., Weixler, S., Baykan, B., Bleeke, M., Kunert, R., Katinger, D., Pribill, I., Glander, P., Bauer, S., Pistoia, V., et al. (2013). Ch14.18 antibody produced in CHO cells in relapsed or refractory Stage 4 neuroblastoma patients: a SIOPEN Phase 1 study. *mAbs* 5, 801–809.
- Ladisch, S., Gillard, B., Wong, C., and Ulsh, L. (1983). Shedding and immunoregulatory activity of YAC-1 lymphoma cell gangliosides. *Cancer Res.* 43, 3808–3813.
- Ladisch, S., Kitada, S., and Hays, E.F. (1987). Gangliosides shed by tumor cells enhance tumor formation in mice. *J. Clin. Invest.* 79, 1879–1882.
- Ladjemi, M.Z. (2012). Anti-idiotypic antibodies as cancer vaccines: achievements and future improvements. *Front. Oncol.* 2, 158.
- Längler, A., Christaras, A., Abshagen, K., Krauth, K., Hero, B., and Berthold, F. (2002). Topotecan in the treatment of refractory neuroblastoma and other malignant tumors in childhood - a phase-II-study. *Klin. Pädiatr.* 214, 153–156.
- Ledeen, R.W., and Yu, R.K. (1982). Gangliosides: structure, isolation, and analysis. *Methods Enzymol.* 83, 139–191.
- Ledeen, R.W., Yu, R.K., and Eng, L.F. (1973). Gangliosides of human myelin: sialosylgalactosylceramide (G7) as a major component. *J. Neurochem.* 21, 829–839.
- Lee, H.C., Wondimu, A., Liu, Y., Ma, J.S.Y., Radoja, S., and Ladisch, S. (2012). Ganglioside inhibition of CD8+ T cell cytotoxicity: interference with lytic granule trafficking and exocytosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 189, 3521–3527.
- Lee, L., Abe, A., and Shayman, J.A. (1999). Improved inhibitors of glucosylceramide synthase. *J. Biol. Chem.* 274, 14662–14669.
- Li, R., Gage, D., McKallip, R., and Ladisch, S. (1996). Structural characterization and in vivo immunosuppressive activity of neuroblastoma GD2. *Glycoconj. J.* 13, 385–389.
- Liang, Y.-J., Ding, Y., Levery, S.B., Lobaton, M., Handa, K., and Hakomori, S. (2013). Differential expression profiles of glycosphingolipids in human breast cancer stem cells vs. cancer non-stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 4968–4973.
- Liebsch, L., Kailayangiri, S., Beck, L., Altvater, B., Koch, R., Dierkes, C., Hotfilder, M., Nagelmann, N., Faber, C., Kooijman, H., et al. (2013). Ewing sarcoma dissemination and response to T-cell therapy in mice assessed by whole-body magnetic resonance imaging. *Br. J. Cancer* 109, 658–666.
- Liu, Y., Wu, H.-W., Sheard, M.A., Sposto, R., Somanchi, S.S., Cooper, L.J.N., Lee, D.A., and Seeger, R.C. (2013). Growth and activation of natural killer cells ex vivo from children with neuroblastoma for adoptive cell therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 2132–2143.
- Livingston, P.O., Ritter, G., and Calves, M.J. (1989a). Antibody response after immunization with the gangliosides GM1, GM2, GM3, GD2 and GD3 in the mouse. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 29, 179–184.
- Livingston, P.O., Ritter, G., Srivastava, P., Padavan, M., Calves, M.J., Oettgen, H.F., and Old, L.J. (1989b). Characterization of IgG and IgM antibodies induced in melanoma patients by immunization with purified GM2 ganglioside. *Cancer Res.* 49, 7045–7050.
- Lode, H.N., Xiang, R., Varki, N.M., Dolman, C.S., Gillies, S.D., and Reisfeld, R.A. (1997). Targeted interleukin-2 therapy for spontaneous neuroblastoma metastases to bone marrow. *J. Natl. Cancer Inst.* 89, 1586–1594.
- Lode, H.N., Reisfeld, R.A., Handgretinger, R., Nicolaou, K.C., Gaedicke, G., and Wrasidlo, W. (1998). Targeted therapy with a novel enediyene antibiotic calicheamicin theta(I)1 effectively suppresses growth and dissemination of liver metastases in a syngeneic model of murine neuroblastoma. *Cancer Res.* 58, 2925–2928.

- Lode, H.N., Schmidt, M., Seidel, D., Huebener, N., Brackrock, D., Bleeke, M., Reker, D., Brandt, S., Mueller, H.-P., Helm, C., et al. (2013). Vaccination with anti-idiotypic antibody ganglidiomab mediates a GD(2)-specific anti-neuroblastoma immune response. *Cancer Immunol. Immunother.* *CII* *62*, 999–1010.
- Longee, D.C., Wikstrand, C.J., Månsson, J.E., He, X., Fuller, G.N., Bigner, S.H., Fredman, P., Svennerholm, L., and Bigner, D.D. (1991). Disialoganglioside GD2 in human neuroectodermal tumor cell lines and gliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *82*, 45–54.
- Louis, C.U., Savoldo, B., Dotti, G., Pule, M., Yvon, E., Myers, G.D., Rossig, C., Russell, H.V., Diouf, O., Liu, E., et al. (2011). Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood* *118*, 6050–6056.
- Maher, J., Brentjens, R.J., Gunset, G., Rivière, I., and Sadelain, M. (2002). Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat. Biotechnol.* *20*, 70–75.
- Malisan, F., and Testi, R. (2002). GD3 ganglioside and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* *1585*, 179–187.
- Malisan, F., Franchi, L., Tomassini, B., Ventura, N., Condò, I., Rippo, M.R., Rufini, A., Liberati, L., Nachtigall, C., Kniep, B., et al. (2002). Acetylation suppresses the proapoptotic activity of GD3 ganglioside. *J. Exp. Med.* *196*, 1535–1541.
- Manches, O., Lui, G., Chaperot, L., Gressin, R., Molens, J.-P., Jacob, M.-C., Sotto, J.-J., Leroux, D., Bensa, J.-C., and Plumas, J. (2003). In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood* *101*, 949–954.
- Mandal, C., Srinivasan, G.V., Chowdhury, S., Chandra, S., Mandal, C., Schauer, R., and Mandal, C. (2009). High level of sialate-O-acetyltransferase activity in lymphoblasts of childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL): enzyme characterization and correlation with disease status. *Glycoconj. J.* *26*, 57–73.
- Mandal, C., Mandal, C., Chandra, S., Schauer, R., and Mandal, C. (2012). Regulation of O-acetylation of sialic acids by sialate-O-acetyltransferase and sialate-O-acetyltransferase activities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Glycobiology* *22*, 70–83.
- Mandal, C., Sarkar, S., Chatterjee, U., Schwartz-Albiez, R., and Mandal, C. (2014). Disialoganglioside GD3-synthase over expression inhibits survival and angiogenesis of pancreatic cancer cells through cell cycle arrest at S-phase and disruption of integrin- β 1-mediated anchorage. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *53C*, 162–173.
- Manzi, A.E., Sjöberg, E.R., Diaz, S., and Varki, A. (1990). Biosynthesis and turnover of O-acetyl and N-acetyl groups in the gangliosides of human melanoma cells. *J. Biol. Chem.* *265*, 13091–13103.
- Marimpietri, D., Petretto, A., Raffaghello, L., Pezzolo, A., Gagliani, C., Tacchetti, C., Mauri, P., Melioli, G., and Pistoia, V. (2013). Proteome profiling of neuroblastoma-derived exosomes reveal the expression of proteins potentially involved in tumor progression. *PloS One* *8*, e75054.
- Maris, J.M., Hogarty, M.D., Bagatell, R., and Cohn, S.L. (2007). Neuroblastoma. *Lancet* *369*, 2106–2120.
- Marquina, G., Waki, H., Fernandez, L.E., Kon, K., Carr, A., Valiente, O., Perez, R., and Ando, S. (1996). Gangliosides expressed in human breast cancer. *Cancer Res.* *56*, 5165–5171.
- Martínez, M.A., López, S., Arias, C.F., and Isa, P. (2013). Gangliosides have a functional role during rotavirus cell entry. *J. Virol.* *87*, 1115–1122.
- Matthay, K.K., Villablanca, J.G., Seeger, R.C., Stram, D.O., Harris, R.E., Ramsay, N.K., Swift, P., Shimada, H., Black, C.T., Brodeur, G.M., et al. (1999). Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N. Engl. J. Med.* *341*, 1165–1173.

- Matthay, K.K., Reynolds, C.P., Seeger, R.C., Shimada, H., Adkins, E.S., Haas-Kogan, D., Gerbing, R.B., London, W.B., and Villablanca, J.G. (2009). Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a children's oncology group study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *27*, 1007–1013.
- Matthay, K.K., George, R.E., and Yu, A.L. (2012). Promising therapeutic targets in neuroblastoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *18*, 2740–2753.
- Mazorra, Z., Mesa, C., and Fernández, L.E. (2009). GM3 ganglioside: a novel target for the therapy against melanoma. *Biotechnol. Appl.* *26*, 256–259.
- Merritt, W.D., Sztejn, M.B., and Reaman, G.H. (1988). Detection of GD3 ganglioside in childhood acute lymphoblastic leukemia with monoclonal antibody to GD3: restriction to immunophenotypically defined T-cell disease. *J. Cell. Biochem.* *37*, 11–19.
- Milone, M.C., Fish, J.D., Carpenito, C., Carroll, R.G., Binder, G.K., Teachey, D., Samanta, M., Lakhali, M., Gloss, B., Danet-Desnoyers, G., et al. (2009). Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy in vivo. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *17*, 1453–1464.
- Mitsuda, T., Furukawa, K., Fukumoto, S., Miyazaki, H., Urano, T., and Furukawa, K. (2002). Overexpression of ganglioside GM1 results in the dispersion of platelet-derived growth factor receptor from glycolipid-enriched microdomains and in the suppression of cell growth signals. *J. Biol. Chem.* *277*, 11239–11246.
- Miyagi, T., Wada, T., Yamaguchi, K., Hata, K., and Shiozaki, K. (2008). Plasma membrane-associated sialidase as a crucial regulator of transmembrane signalling. *J. Biochem. (Tokyo)* *144*, 279–285.
- Modak, S., Kushner, B.H., Kramer, K., Vickers, A., Cheung, I.Y., and Cheung, N.-K.V. (2013). Anti-GD2 antibody 3F8 and barley-derived (1 → 3),(1 → 4)-β-D-glucan: A Phase I study in patients with chemoresistant neuroblastoma. *Oncoimmunology* *2*, e23402.
- 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*, 6851–6855.
- Mortier, E., Quémener, A., Vusio, P., Lorenzen, I., Boublik, Y., Grötzinger, J., Plet, A., and Jacques, Y. (2006). Soluble interleukin-15 receptor alpha (IL-15R alpha)-sushi as a selective and potent agonist of IL-15 action through IL-15R beta/gamma. Hyperagonist IL-15 x IL-15R alpha fusion proteins. *J. Biol. Chem.* *281*, 1612–1619.
- Moussavou, G., Kwak, D.H., Lim, M.-U., Kim, J.-S., Kim, S.-U., Chang, K.-T., and Choo, Y.-K. (2013). Role of gangliosides in the differentiation of human mesenchymal-derived stem cells into osteoblasts and neuronal cells. *BMB Rep.* *46*, 527–532.
- Mueller, S., and Matthay, K.K. (2009). Neuroblastoma: biology and staging. *Curr. Oncol. Rep.* *11*, 431–438.
- Mueller, B.M., Romerdahl, C.A., Gillies, S.D., and Reisfeld, R.A. (1990). Enhancement of antibody-dependent cytotoxicity with a chimeric anti-GD2 antibody. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *144*, 1382–1386.
- Mujoo, K., Cheresch, D.A., Yang, H.M., and Reisfeld, R.A. (1987). Disialoganglioside GD2 on human neuroblastoma cells: target antigen for monoclonal antibody-mediated cytotoxicity and suppression of tumor growth. *Cancer Res.* *47*, 1098–1104.
- Mujoo, K., Kipps, T.J., Yang, H.M., Cheresch, D.A., Wargalla, U., Sander, D.J., and Reisfeld, R.A. (1989). Functional Properties and Effect on Growth Suppression of Human Neuroblastoma Tumors by Isotype Switch Variants of Monoclonal Antiganglioside GD2 Antibody 14.18. *Cancer Res.* *49*, 2857–2861.

- Mujoo, K., Reisfeld, R.A., Cheung, L., and Rosenblum, M.G. (1991). A potent and specific immunotoxin for tumor cells expressing disialoganglioside GD2. *Cancer Immunol. Immunother. CII* 34, 198–204.
- Mukherjee, K., Chava, A.K., Mandal, C., Dey, S.N., Kniep, B., Chandra, S., and Mandal, C. (2008). O-acetylation of GD3 prevents its apoptotic effect and promotes survival of lymphoblasts in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *J. Cell. Biochem.* 105, 724–734.
- Munn, D.H., and Cheung, N.K. (1987). Interleukin-2 enhancement of monoclonal antibody-mediated cellular cytotoxicity against human melanoma. *Cancer Res.* 47, 6600–6605.
- Munn, D.H., and Cheung, N.K. (1989). Antibody-dependent antitumor cytotoxicity by human monocytes cultured with recombinant macrophage colony-stimulating factor. Induction of efficient antibody-mediated antitumor cytotoxicity not detected by isotope release assays. *J. Exp. Med.* 170, 511–526.
- Murray, J.L., Cunningham, J.E., Brewer, H., Mujoo, K., Zukiwski, A.A., Podoloff, D.A., Kasi, L.P., Bhadkamkar, V., Fritsche, H.A., and Benjamin, R.S. (1994). Phase I trial of murine monoclonal antibody 14G2a administered by prolonged intravenous infusion in patients with neuroectodermal tumors. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 12, 184–193.
- Murray, J.L., Kleinerman, E.S., Jia, S.F., Rosenblum, M.G., Eton, O., Buzaid, A., Legha, S., Ross, M.I., Thompson, L., Mujoo, K., et al. (1996). Phase Ia/Ib trial of anti-GD2 chimeric monoclonal antibody 14.18 (ch14.18) and recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) in metastatic melanoma. *J. Immunother. Emphas. Tumor Immunol. Off. J. Soc. Biol. Ther.* 19, 206–217.
- Nairn, A.V., York, W.S., Harris, K., Hall, E.M., Pierce, J.M., and Moremen, K.W. (2008). Regulation of glycan structures in animal tissues: transcript profiling of glycan-related genes. *J. Biol. Chem.* 283, 17298–17313.
- Nakano, J., Raj, B.K., Asagami, C., and Lloyd, K.O. (1996). Human melanoma cell lines deficient in GD3 ganglioside expression exhibit altered growth and tumorigenic characteristics. *J. Invest. Dermatol.* 107, 543–548.
- Nakano, J., Yasui, H., Lloyd, K.O., and Muto, M. (1999). Biologic roles of gangliosides G(M3) and G(D3) in the attachment of human melanoma cells to extracellular matrix proteins. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. Soc. Investig. Dermatol. Inc Eur. Soc. Dermatol. Res.* 4, 173–176.
- Navid, F., Santana, V.M., and Barfield, R.C. (2010). Anti-GD2 antibody therapy for GD2-expressing tumors. *Curr. Cancer Drug Targets* 10, 200–209.
- Navid, F., Sondel, P.M., Barfield, R., Shulkin, B.L., Kaufman, R.A., Allay, J.A., Gan, J., Hutson, P., Seo, S., Kim, K., et al. (2014). Phase I trial of a novel anti-GD2 monoclonal antibody, Hu14.18K322A, designed to decrease toxicity in children with refractory or recurrent neuroblastoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 32, 1445–1452.
- Neal, Z.C., Yang, J.C., Rakhmilevich, A.L., Buhtoiarov, I.N., Lum, H.E., Imboden, M., Hank, J.A., Lode, H.N., Reisfeld, R.A., Gillies, S.D., et al. (2004). Enhanced activity of hu14.18-IL2 immunocytokine against murine NXS2 neuroblastoma when combined with interleukin 2 therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 10, 4839–4847.
- Ngamukote, S., Yanagisawa, M., Ariga, T., Ando, S., and Yu, R.K. (2007). Developmental changes of glycosphingolipids and expression of glycogenes in mouse brains. *J. Neurochem.* 103, 2327–2341.
- Nicoll, G., Avril, T., Lock, K., Furukawa, K., Bovin, N., and Crocker, P.R. (2003). Ganglioside GD3 expression on target cells can modulate NK cell cytotoxicity via siglec-7-dependent and -independent mechanisms. *Eur. J. Immunol.* 33, 1642–1648.

- Nores, G.A., Dohi, T., Taniguchi, M., and Hakomori, S. (1987). Density-dependent recognition of cell surface GM3 by a certain anti-melanoma antibody, and GM3 lactone as a possible immunogen: requirements for tumor-associated antigen and immunogen. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *139*, 3171–3176.
- Ogura, K., Nara, K., Watanabe, Y., Kohno, K., Tai, T., and Sanai, Y. (1996). Cloning and expression of cDNA for O-acetylation of GD3 ganglioside. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *225*, 932–938.
- Ohkawa, Y., Miyazaki, S., Hamamura, K., Kambe, M., Miyata, M., Tajima, O., Ohmi, Y., Yamauchi, Y., Furukawa, K., and Furukawa, K. (2010). Ganglioside GD3 enhances adhesion signals and augments malignant properties of melanoma cells by recruiting integrins to glycolipid-enriched microdomains. *J. Biol. Chem.* *285*, 27213–27223.
- Osenga, K.L., Hank, J.A., Albertini, M.R., Gan, J., Sternberg, A.G., Eickhoff, J., Seeger, R.C., Matthay, K.K., Reynolds, C.P., Twist, C., et al. (2006). A phase I clinical trial of the hu14.18-IL2 (EMD 273063) as a treatment for children with refractory or recurrent neuroblastoma and melanoma: a study of the Children’s Oncology Group. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *12*, 1750–1759.
- Ozkaynak, M.F., Sondel, P.M., Krailo, M.D., Gan, J., Javorsky, B., Reisfeld, R.A., Matthay, K.K., Reaman, G.H., and Seeger, R.C. (2000). Phase I study of chimeric human/murine anti-ganglioside G(D2) monoclonal antibody (ch14.18) with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in children with neuroblastoma immediately after hematopoietic stem-cell transplantation: a Children’s Cancer Group Study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *18*, 4077–4085.
- Parameswaran, R., Lim, M., Arutyunyan, A., Abdel-Azim, H., Hurtz, C., Lau, K., Müschen, M., Yu, R.K., von Itzstein, M., Heisterkamp, N., et al. (2013). O-acetylated N-acetylneuraminic acid as a novel target for therapy in human pre-B acute lymphoblastic leukemia. *J. Exp. Med.* *210*, 805–819.
- Perry, R.J., and Ridgway, N.D. (2005). Molecular mechanisms and regulation of ceramide transport. *Biochim. Biophys. Acta* *1734*, 220–234.
- Pichla, S.L., Murali, R., and Burnett, R.M. (1997). The crystal structure of a Fab fragment to the melanoma-associated GD2 ganglioside. *J. Struct. Biol.* *119*, 6–16.
- Popa, I., Vlad, C., Bodennec, J., and Portoukalian, J. (2002). Recovery of gangliosides from aqueous solutions on styrene-divinylbenzene copolymer columns. *J. Lipid Res.* *43*, 1335–1340.
- Portoukalian, J. (2000). Immunogenicity of glycolipids. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* *19*, 73–78.
- Portoukalian, J., Zwingelstein, G., Doré, J.F., and Bourgoin, J.J. (1976). Studies of a ganglioside fraction extracted from human malignant melanoma. *Biochimie* *58*, 1285–1287.
- Presta, L.G., Shields, R.L., Namenuk, A.K., Hong, K., and Meng, Y.G. (2002). Engineering therapeutic antibodies for improved function. *Biochem. Soc. Trans.* *30*, 487–490.
- Prinetti, A., Loberto, N., Chigorno, V., and Sonnino, S. (2009). Glycosphingolipid behaviour in complex membranes. *Biochim. Biophys. Acta* *1788*, 184–193.
- Pukel, C.S., Lloyd, K.O., Travassos, L.R., Dippold, W.G., Oettgen, H.F., and Old, L.J. (1982). GD3, a prominent ganglioside of human melanoma. Detection and characterisation by mouse monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* *155*, 1133–1147.
- Pulè, M.A., Straathof, K.C., Dotti, G., Heslop, H.E., Rooney, C.M., and Brenner, M.K. (2005). A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *12*, 933–941.
- Puryear, W.B., Yu, X., Ramirez, N.P., Reinhard, B.M., and Gummuluru, S. (2012). HIV-1 incorporation of host-cell-derived glycosphingolipid GM3 allows for capture by mature dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 7475–7480.

- Ravindranath, M.H., Morton, D.L., and Irie, R.F. (1989). An epitope common to gangliosides O-acetyl-GD3 and GD3 recognized by antibodies in melanoma patients after active specific immunotherapy. *Cancer Res.* *49*, 3891–3897.
- Regina Todeschini, A., and Hakomori, S. (2008). Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains. *Biochim. Biophys. Acta* *1780*, 421–433.
- Reichert, J.M. (2014a). Antibodies to watch in 2014. *mAbs* *6*, 5–14.
- Reichert, J.M. (2014b). Antibodies to watch in 2014: Mid-year update. *mAbs* *6*, 799–802.
- Ribas, A., Kirkwood, J.M., Atkins, M.B., Whiteside, T.L., Gooding, W., Kovar, A., Gillies, S.D., Kashala, O., and Morse, M.A. (2009). Phase I/II open-label study of the biologic effects of the interleukin-2 immunocytokine EMD 273063 (hu14.18-IL2) in patients with metastatic malignant melanoma. *J. Transl. Med.* *7*, 68.
- Ribeiro-Resende, V.T., Oliveira-Silva, A., Ouverney-Brandão, S., Santiago, M.F., Hedin-Pereira, C., and Mendez-Otero, R. (2007). Ganglioside 9-O-acetyl GD3 expression is upregulated in the regenerating peripheral nerve. *Neuroscience* *147*, 97–105.
- Roguska, M.A., Pedersen, J.T., Keddy, C.A., Henry, A.H., Searle, S.J., Lambert, J.M., Goldmacher, V.S., Blättler, W.A., Rees, A.R., and Guild, B.C. (1994). Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 969–973.
- Roque-Navarro, L., Chakrabandhu, K., de León, J., Rodríguez, S., Toledo, C., Carr, A., de Acosta, C.M., Hueber, A.-O., and Pérez, R. (2008). Anti-ganglioside antibody-induced tumor cell death by loss of membrane integrity. *Mol. Cancer Ther.* *7*, 2033–2041.
- Roth, M., Linkowski, M., Tarim, J., Piperdi, S., Sowers, R., Geller, D., Gill, J., and Gorlick, R. (2014). Ganglioside GD2 as a therapeutic target for antibody-mediated therapy in patients with osteosarcoma. *Cancer* *120*, 548–554.
- Ruf, P., Schäfer, B., Eissler, N., Mocikat, R., Hess, J., Plösch, M., Wosch, S., Suckstorff, I., Zehetmeier, C., and Lindhofer, H. (2012). Ganglioside GD2-specific trifunctional surrogate antibody Surek demonstrates therapeutic activity in a mouse melanoma model. *J. Transl. Med.* *10*, 219.
- Rusnati, M., Urbinati, C., Tanghetti, E., Dell’Era, P., Lortat-Jacob, H., and Presta, M. (2002). Cell membrane GM1 ganglioside is a functional coreceptor for fibroblast growth factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 4367–4372.
- Sadelain, M., Brentjens, R., and Rivière, I. (2013). The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov.* *3*, 388–398.
- Saleh, M.N., Khazaeli, M.B., Wheeler, R.H., Dropcho, E., Liu, T., Urist, M., Miller, D.M., Lawson, S., Dixon, P., and Russell, C.H. (1992). Phase I trial of the murine monoclonal anti-GD2 antibody 14G2a in metastatic melanoma. *Cancer Res.* *52*, 4342–4347.
- Sandhoff, K., and Kolter, T. (2003). Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *358*, 847–861.
- Sarkar, T.R., Battula, V.L., Werden, S.J., Vijay, G.V., Ramirez-Peña, E.Q., Taube, J.H., Chang, J.T., Miura, N., Porter, W., Sphyris, N., et al. (2014). GD3 synthase regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer. *Oncogene* *0*.
- Sarvi, S., Mackinnon, A.C., Avlonitis, N., Bradley, M., Rintoul, R.C., Rassl, D.M., Wang, W., Forbes, S.J., Gregory, C.D., and Sethi, T. (2014). CD133+ cancer stem-like cells in small cell lung cancer are highly tumorigenic and chemoresistant but sensitive to a novel neuropeptide antagonist. *Cancer Res.* *74*, 1554–1565.
- Satake, H., Chen, H.Y., and Varki, A. (2003). Genes modulated by expression of GD3 synthase in Chinese hamster ovary cells. Evidence that the Tis21 gene is involved in the induction of GD3 9-O-acetylation. *J. Biol. Chem.* *278*, 7942–7948.

- Satoh, J., and Kim, S.U. (1995). Ganglioside markers GD3, GD2, and A2B5 in fetal human neurons and glial cells in culture. *Dev. Neurosci.* *17*, 137–148.
- Satoh, J.I., Tai, T., and Kim, S.U. (1996). Differential expression of gangliosides and galactolipids in fetal human oligodendrocytes and astrocytes in culture. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *93*, 172–181.
- Savoldo, B., Ramos, C.A., Liu, E., Mims, M.P., Keating, M.J., Carrum, G., Kamble, R.T., Bollard, C.M., Gee, A.P., Mei, Z., et al. (2011). CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J. Clin. Invest.* *121*, 1822–1826.
- Schauer, R., Schmid, H., Pommerencke, J., Iwersen, M., and Kohla, G. (2001). Metabolism and role of O-acetylated sialic acids. *Adv. Exp. Med. Biol.* *491*, 325–342.
- Schauer, R., Srinivasan, G.V., Wipfler, D., Kniep, B., and Schwartz-Albiez, R. (2011). O-Acetylated sialic acids and their role in immune defense. *Adv. Exp. Med. Biol.* *705*, 525–548.
- Schulz, G., Cheresch, D.A., Varki, N.M., Yu, A., Staffileno, L.K., and Reisfeld, R.A. (1984). Detection of ganglioside GD2 in tumor tissues and sera of neuroblastoma patients. *Cancer Res.* *44*, 5914–5920.
- Sen, G., Chakraborty, M., Foon, K.A., Reisfeld, R.A., and Bhattacharya-Chatterjee, M.B. (1998). Induction of IgG antibodies by an anti-idiotypic antibody mimicking disialoganglioside GD2. *J. Immunother. Hagerstown Md 1997* *21*, 75–83.
- Senn, H.J., Orth, M., Fitzke, E., Wieland, H., and Gerok, W. (1989). Gangliosides in normal human serum. Concentration, pattern and transport by lipoproteins. *Eur. J. Biochem. FEBS* *181*, 657–662.
- Shen, Y., Kohla, G., Lrhorfi, A.L., Sipos, B., Kalthoff, H., Gerwig, G.J., Kamerling, J.P., Schauer, R., and Tiralongo, J. (2004). O-acetylation and de-O-acetylation of sialic acids in human colorectal carcinoma. *Eur. J. Biochem. FEBS* *271*, 281–290.
- Shepherd, A.J., Wilson, N.J., and Smith, K.T. (2003). Characterisation of endogenous retrovirus in rodent cell lines used for production of biologicals. *Biol. J. Int. Assoc. Biol. Stand.* *31*, 251–260.
- Shi, W.X., Chammass, R., and Varki, A. (1998). Induction of sialic acid 9-O-acetylation by diverse gene products: implications for the expression cloning of sialic acid O-acetyltransferases. *Glycobiology* *8*, 199–205.
- Shibuya, H., Hamamura, K., Hotta, H., Matsumoto, Y., Nishida, Y., Hattori, H., Furukawa, K., Ueda, M., and Furukawa, K. (2012). Enhancement of malignant properties of human osteosarcoma cells with disialyl gangliosides GD2/GD3. *Cancer Sci.* *103*, 1656–1664.
- Shields, R.L., Namenuk, A.K., Hong, K., Meng, Y.G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., et al. (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*, 6591–6604.
- 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. *J. Biol. Chem.* *277*, 26733–26740.
- Shusterman, S., London, W.B., Gillies, S.D., Hank, J.A., Voss, S.D., Seeger, R.C., Reynolds, C.P., Kimball, J., Albertini, M.R., Wagner, B., et al. (2010). Antitumor activity of hu14.18-IL2 in patients with relapsed/refractory neuroblastoma: a Children’s Oncology Group (COG) phase II study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *28*, 4969–4975.
- Siebert, N., Seidel, D., Eger, C., Brackrock, D., Reker, D., Schmidt, M., and Lode, H.N. (2013). Validated detection of anti-GD2 antibody ch14.18/CHO in serum of neuroblastoma patients using anti-idiotypic antibody ganglidiomab. *J. Immunol. Methods* *398-399*, 51–59.
- Siebert, N., Eger, C., Seidel, D., Jüttner, M., and Lode, H.N. (2014). Validated detection of human anti-chimeric immune responses in serum of neuroblastoma patients treated with ch14.18/CHO. *J. Immunol. Methods* *407*, 108–115.

- Simon, T., Hero, B., Faldum, A., Handgretinger, R., Schrappe, M., Niethammer, D., and Berthold, F. (2004). Consolidation treatment with chimeric anti-GD2-antibody ch14.18 in children older than 1 year with metastatic neuroblastoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *22*, 3549–3557.
- Simon, T., Hero, B., Faldum, A., Handgretinger, R., Schrappe, M., Niethammer, D., and Berthold, F. (2005). Infants with stage 4 neuroblastoma: the impact of the chimeric anti-GD2-antibody ch14.18 consolidation therapy. *Klin. Pädiatr.* *217*, 147–152.
- Simon, T., Hero, B., Faldum, A., Handgretinger, R., Schrappe, M., Klingebiel, T., and Berthold, F. (2011). Long term outcome of high-risk neuroblastoma patients after immunotherapy with antibody ch14.18 or oral metronomic chemotherapy. *BMC Cancer* *11*, 21.
- Sinha, D., Mandal, C., and Bhattacharya, D.K. (1999). Identification of 9-O acetyl sialoglycoconjugates (9-OAcSGs) as biomarkers in childhood acute lymphoblastic leukemia using a lectin, AchatininH, as a probe. *Leukemia* *13*, 119–125.
- Sjoberg, E.R., and Varki, A. (1993). Kinetic and spatial interrelationships between ganglioside glycosyltransferases and O-acetyltransferase(s) in human melanoma cells. *J. Biol. Chem.* *268*, 10185–10196.
- Smith, K.G.C., and Clatworthy, M.R. (2010). FcγRIIB in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 328–343.
- Sonnino, S., Ghidoni, R., Chigorno, V., Masserini, M., and Tettamanti, G. (1983). Recognition by two-dimensional thin-layer chromatography and densitometric quantification of alkali-labile gangliosides from the brain of different animals. *Anal. Biochem.* *128*, 104–114.
- Sorkin, L.S., Yu, A.L., Junger, H., and Doom, C.M. (2002). Antibody directed against GD(2) produces mechanical allodynia, but not thermal hyperalgesia when administered systemically or intrathecally despite its dependence on capsaicin sensitive afferents. *Brain Res.* *930*, 67–74.
- Sorkin, L.S., Otto, M., Baldwin, W.M., 3rd, Vail, E., Gillies, S.D., Handgretinger, R., Barfield, R.C., Ming Yu, H., and Yu, A.L. (2010). Anti-GD(2) with an FC point mutation reduces complement fixation and decreases antibody-induced allodynia. *Pain* *149*, 135–142.
- Sottocornola, E., Colombo, I., Vergani, V., Taraboletti, G., and Berra, B. (1998). Increased tumorigenicity and invasiveness of C6 rat glioma cells transfected with the human alpha-2,8 sialyltransferase cDNA. *Invasion Metastasis* *18*, 142–154.
- Steel, J.C., Waldmann, T.A., and Morris, J.C. (2012). Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* *33*, 35–41.
- Stoklasek, T.A., Schluns, K.S., and Lefrançois, L. (2006). Combined IL-15/IL-15Rα immunotherapy maximizes IL-15 activity in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* *177*, 6072–6080.
- Suzuki, Y., Matsunaga, M., Nagao, Y., Taki, T., Hirabayashi, Y., and Matsumoto, M. (1985). Ganglioside GM1b as an influenza virus receptor. *Vaccine* *3*, 201–203.
- Svennerholm, L. (1964). The gangliosides. *J. Lipid Res.* *5*, 145–155.
- Tagawa, S.T., Milowsky, M.I., Morris, M., Vallabhajosula, S., Christos, P., Akhtar, N.H., Osborne, J., Goldsmith, S.J., Larson, S., Taskar, N.P., et al. (2013). Phase II study of Lutetium-177-labeled anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *19*, 5182–5191.
- Tao, R.V., Sweeley, C.C., and Jamieson, G.A. (1973). Sphingolipid composition of human platelets. *J. Lipid Res.* *14*, 16–25.
- Terme, M., Dorvillius, M., Cochonneau, D., Chaumette, T., Xiao, W., Diccianni, M.B., Barbet, J., Yu, A.L., Paris, F., Sorkin, L.S., et al. (2014). Chimeric antibody c.8B6 to O-acetyl-GD2 mediates the same efficient anti-neuroblastoma effects as therapeutic ch14.18 antibody to GD2 without antibody induced allodynia. *PLoS One* *9*, e87210.

- Tettamanti, G. (2004). Ganglioside/glycosphingolipid turnover: new concepts. *Glycoconj. J.* 20, 301–317.
- Thurin, J., Thurin, M., Kimoto, Y., Herlyn, M., Lubeck, M.D., Elder, D.E., Smereczynska, M., Karlsson, K.A., Clark, W.M., Jr, and Steplewski, Z. (1987). Monoclonal antibody-defined correlations in melanoma between levels of GD2 and GD3 antigens and antibody-mediated cytotoxicity. *Cancer Res.* 47, 1229–1233.
- Todeschini, A.R., Dos Santos, J.N., Handa, K., and Hakomori, S. (2007). Ganglioside GM2-tetraspanin CD82 complex inhibits met and its cross-talk with integrins, providing a basis for control of cell motility through glycosynapse. *J. Biol. Chem.* 282, 8123–8133.
- Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., Gettinger, S.N., Smith, D.C., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Carvajal, R.D., Sosman, J.A., Atkins, M.B., et al. (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* 366, 2443–2454.
- Umaña, P., Jean-Mairet, J., Moudry, R., Amstutz, H., and Bailey, J.E. (1999). Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat. Biotechnol.* 17, 176–180.
- Uttenreuther-Fischer, M.M., Huang, C.S., Reisfeld, R.A., and Yu, A.L. (1995a). Pharmacokinetics of anti-ganglioside GD2 mAb 14G2a in a phase I trial in pediatric cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 41, 29–36.
- Uttenreuther-Fischer, M.M., Huang, C.S., and Yu, A.L. (1995b). Pharmacokinetics of human-mouse chimeric anti-GD2 mAb ch14.18 in a phase I trial in neuroblastoma patients. *Cancer Immunol. Immunother.* CII 41, 331–338.
- Uttenreuther-Fischer, M.M., Krüger, J.A., and Fischer, P. (2006). Molecular characterization of the anti-idiotypic immune response of a relapse-free neuroblastoma patient following antibody therapy: a possible vaccine against tumors of neuroectodermal origin? *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 176, 7775–7786.
- Vandamme-Feldhaus, V., and Schauer, R. (1998). Characterization of the enzymatic 7-O-acetylation of sialic acids and evidence for enzymatic O-acetyl migration from C-7 to C-9 in bovine submandibular gland. *J. Biochem. (Tokyo)* 124, 111–121.
- Varki, A., Hooshmand, F., Diaz, S., Varki, N.M., and Hedrick, S.M. (1991). Developmental abnormalities in transgenic mice expressing a sialic acid-specific 9-O-acetyl esterase. *Cell* 65, 65–74.
- Vincent, M., Bessard, A., Cochonneau, D., Teppaz, G., Solé, V., Maillason, M., Birklé, S., Garrigue-Antar, L., Quémener, A., and Jacques, Y. (2013). Tumor targeting of the IL-15 superagonist RLI by an anti-GD2 antibody strongly enhances its antitumor potency. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 133, 757–765.
- Wallace, M.S., Lee, J., Sorkin, L., Dunn, J.S., Yaksh, T., and Yu, A. (1997). Intravenous lidocaine: effects on controlling pain after anti-GD2 antibody therapy in children with neuroblastoma--a report of a series. *Anesth. Analg.* 85, 794–796.
- Wang, J., and Yu, R.K. (2013). Interaction of ganglioside GD3 with an EGF receptor sustains the self-renewal ability of mouse neural stem cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 19137–19142.
- Wang, J., Jensen, M., Lin, Y., Sui, X., Chen, E., Lindgren, C.G., Till, B., Raubitschek, A., Forman, S.J., Qian, X., et al. (2007). Optimizing adoptive polyclonal T cell immunotherapy of lymphomas, using a chimeric T cell receptor possessing CD28 and CD137 costimulatory domains. *Hum. Gene Ther.* 18, 712–725.
- Wang, X., Sun, P., Al-Qamari, A., Tai, T., Kawashima, I., and Paller, A.S. (2001). Carbohydrate-carbohydrate binding of ganglioside to integrin alpha(5) modulates alpha(5)beta(1) function. *J. Biol. Chem.* 276, 8436–8444.
- Ward, E.S., and Ghetie, V. (1995). The effector functions of immunoglobulins: implications for therapy. *Ther. Immunol.* 2, 77–94.

- Wargalla, U.C., and Reisfeld, R.A. (1989). Rate of internalization of an immunotoxin correlates with cytotoxic activity against human tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 5146–5150.
- Weil-Hillman, G., Fisch, P., Prieve, A.F., Sosman, J.A., Hank, J.A., and Sondel, P.M. (1989). Lymphokine-activated killer activity induced by in vivo interleukin 2 therapy: predominant role for lymphocytes with increased expression of CD2 and leu19 antigens but negative expression of CD16 antigens. *Cancer Res.* *49*, 3680–3688.
- Willison, H.J., and Yuki, N. (2002). Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies. *Brain J. Neurol.* *125*, 2591–2625.
- Wipfler, D., Srinivasan, G.V., Sadick, H., Kniep, B., Arming, S., Willhauck-Fleckenstein, M., Vlasak, R., Schauer, R., and Schwartz-Albiez, R. (2011). Differentially regulated expression of 9-O-acetyl GD3 (CD60b) and 7-O-acetyl-GD3 (CD60c) during differentiation and maturation of human T and B lymphocytes. *Glycobiology* *21*, 1161–1172.
- Woodcock, J. (2006). Sphingosine and ceramide signalling in apoptosis. *IUBMB Life* *58*, 462–466.
- Wu, H., Nie, Y., Huse, W.D., and Watkins, J.D. (1999). Humanization of a murine monoclonal antibody by simultaneous optimization of framework and CDR residues. *J. Mol. Biol.* *294*, 151–162.
- Xu, J., Fan, W., Tu, X.X., Zhang, T., Hou, Z.J., Guo, T., Shu, X., Luo, X., Liu, Y., Peng, F., et al. (2013). Neural ganglioside GD2(+) cells define a subpopulation of mesenchymal stem cells in adult murine bone marrow. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* *32*, 889–898.
- Xu, Y.-H., Barnes, S., Sun, Y., and Grabowski, G.A. (2010). Multi-system disorders of glycosphingolipid and ganglioside metabolism. *J. Lipid Res.* *51*, 1643–1675.
- Yamamoto, A., Haraguchi, M., Yamashiro, S., Fukumoto, S., Furukawa, K., Takamiya, K., Atsuta, M., Shiku, H., and Furukawa, K. (1996). Heterogeneity in the expression pattern of two ganglioside synthase genes during mouse brain development. *J. Neurochem.* *66*, 26–34.
- Yamashita, T., Wu, Y.-P., Sandhoff, R., Werth, N., Mizukami, H., Ellis, J.M., Dupree, J.L., Geyer, R., Sandhoff, K., and Proia, R.L. (2005). Interruption of ganglioside synthesis produces central nervous system degeneration and altered axon-glia interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 2725–2730.
- Yan, X., Evans, S.V., Kaminski, M.J., Gillies, S.D., Reisfeld, R.A., Houghton, A.N., and Chapman, P.B. (1996). Characterization of an Ig VH idiotope that results in specific homophilic binding and increased avidity for antigen. *J. Immunol. Baltim. Md* *157*, 1582–1588.
- Yanagisawa, K. (2011a). Pathological significance of ganglioside clusters in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* *116*, 806–812.
- Yanagisawa, M. (2011b). Stem cell glycolipids. *Neurochem. Res.* *36*, 1623–1635.
- Yankelevich, M., Kondadasula, S.V., Thakur, A., Buck, S., Cheung, N.-K.V., and Lum, L.G. (2012). Anti-CD3 × anti-GD2 bispecific antibody redirects T-cell cytolytic activity to neuroblastoma targets. *Pediatr. Blood Cancer* *59*, 1198–1205.
- Ye, J.N., and Cheung, N.K. (1992). A novel O-acetylated ganglioside detected by anti-GD2 monoclonal antibodies. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *50*, 197–201.
- Yoshida, S., Fukumoto, S., Kawaguchi, H., Sato, S., Ueda, R., and Furukawa, K. (2001). Ganglioside G(D2) in small cell lung cancer cell lines: enhancement of cell proliferation and mediation of apoptosis. *Cancer Res.* *61*, 4244–4252.
- Yoshida, S., Kawaguchi, H., Sato, S., Ueda, R., and Furukawa, K. (2002). An anti-GD2 monoclonal antibody enhances apoptotic effects of anti-cancer drugs against small cell lung cancer cells via JNK (c-Jun terminal kinase) activation. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* *93*, 816–824.
- Yu, R.K., and Bieberich, E. (2001). Regulation of glycosyltransferases in ganglioside biosynthesis by phosphorylation and dephosphorylation. *Mol. Cell. Endocrinol.* *177*, 19–24.

- Yu, A.L., Uttenreuther-Fischer, M.M., Huang, C.S., Tsui, C.C., Gillies, S.D., Reisfeld, R.A., and Kung, F.H. (1998). Phase I trial of a human-mouse chimeric anti-disialoganglioside monoclonal antibody ch14.18 in patients with refractory neuroblastoma and osteosarcoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *16*, 2169–2180.
- Yu, A.L., Gilman, A.L., Ozkaynak, M.F., London, W.B., Kreissman, S.G., Chen, H.X., Smith, M., Anderson, B., Villablanca, J.G., Matthay, K.K., et al. (2010). Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.* *363*, 1324–1334.
- Yu, R.K., Tsai, Y.-T., Ariga, T., and Yanagisawa, M. (2011). Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides--an overview. *J. Oleo Sci.* *60*, 537–544.
- Yuki, N., Yamada, M., Tagawa, Y., Takahashi, H., and Handa, S. (1997). Pathogenesis of the neurotoxicity caused by anti-GD2 antibody therapy. *J. Neurol. Sci.* *149*, 127–130.
- Yusuf, H.K., Schwarzmann, G., Pohlentz, G., and Sandhoff, K. (1987). Oligosialogangliosides inhibit GM2- and GD3-synthesis in isolated Golgi vesicles from rat liver. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler* *368*, 455–462.
- Yvon, E., Del Vecchio, M., Savoldo, B., Hoyos, V., Dutour, A., Anichini, A., Dotti, G., and Brenner, M.K. (2009). Immunotherapy of metastatic melanoma using genetically engineered GD2-specific T cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 5852–5860.
- Zeidler, R., Mysliwicz, J., Csánady, M., Walz, A., Ziegler, I., Schmitt, B., Wollenberg, B., and Lindhofer, H. (2000). The Fc-region of a new class of intact bispecific antibody mediates activation of accessory cells and NK cells and induces direct phagocytosis of tumour cells. *Br. J. Cancer* *83*, 261–266.
- Zeng, G., Gao, L., Birklé, S., and Yu, R.K. (2000). Suppression of ganglioside GD3 expression in a rat F-11 tumor cell line reduces tumor growth, angiogenesis, and vascular endothelial growth factor production. *Cancer Res.* *60*, 6670–6676.
- Zeng, Y., Fest, S., Kunert, R., Katinger, H., Pistoia, V., Michon, J., Lewis, G., Ladenstein, R., and Lode, H.N. (2005). Anti-neuroblastoma effect of ch14.18 antibody produced in CHO cells is mediated by NK-cells in mice. *Mol. Immunol.* *42*, 1311–1319.
- Zhou, Q., Hakomori, S., Kitamura, K., and Igarashi, Y. (1994). GM3 directly inhibits tyrosine phosphorylation and de-N-acetyl-GM3 directly enhances serine phosphorylation of epidermal growth factor receptor, independently of receptor-receptor interaction. *J. Biol. Chem.* *269*, 1959–1965.
-

Propriétés biologiques des anticorps spécifiques du marqueur gangliosidique GD2 O-acétylé : application au ciblage thérapeutique des tumeurs d'origine neuroectodermique

Les gangliosides représentent une famille importante des glycosphingolipides porteurs d'acide sialique. Ils sont exprimés majoritairement au niveau de la membrane plasmique et sont impliqués dans les phénomènes d'adhésion et de prolifération. L'expression du disialoganglioside GD2 et de son dérivé O-acétylé (GD2-Oac) est restreinte aux tissus tumoraux et notamment d'origine neuroectodermique. Ils sont de ce fait des cibles intéressantes pour l'immunothérapie des cancers. Le ch14.18, un anticorps chimérique dirigé contre le GD2, a montré son efficacité thérapeutique lors d'un essai clinique de phase III développé contre le neuroblastome. Cependant, d'importants effets secondaires ont été observés et notamment l'apparition de douleurs neuropathiques due à l'expression du GD2 sur les nerfs périphériques. En revanche, le GD2-Oac n'est pas exprimé sur les fibres nerveuses. Afin de disposer d'un format idéal à l'homme malade, nous avons développé un anticorps chimérique spécifique du GD2-Oac, nommé c.8B6. Nous montrons que cet anticorps possède la même efficacité anti-tumorale que le ch14.18 dans un modèle de neuroblastome chez la souris. D'autre part, nous démontrons sur un modèle de mesure de la douleur (allodynie) chez le rat que cet anticorps ne déclenche pas d'effets neurotoxiques. Par ailleurs, nous avons développé une démarche d'ingénierie moléculaire innovante afin d'augmenter les capacités pro-apoptotiques de cet anticorps. Nous montrons que les différents anticorps anti-GD2-Oac ainsi générés sont capables d'inhiber la croissance tumorale indépendamment des effecteurs immunitaires *in vitro*.

Mots-clés: Cancer, Ganglioside, Anticorps thérapeutique, Neuroblastome

Biological properties of antibodies to O-acetyl GD2 : application to therapeutic targeting of neuroectodermic tumors

Gangliosides are an important family of glycosphingolipids with sialic acid. They are predominantly expressed at the plasma membrane and are involved in cell adhesion and proliferation. Expression of GD2 disialoganglioside and its O-acetylated derivative (GD2-Oac) is restricted to the tumor tissue and in particular of neuroectodermic tumor. They are therefore of interest for cancer immunotherapy targets. The ch14.18, an anti-GD2 chimeric antibody showed therapeutic efficacy in a Phase III clinical trial developed against neuroblastoma. However, significant side effects are observed and in particular the appearance of neuropathic pain in the expression of GD2 on peripheral nerves. However, we previously demonstrated that the GD2-Oac is not expressed on nerve fibers. We have developed a chimeric antibody targeting GD2-Oac the c.8B6. We show that this antibody has the same anti-tumor efficiency as the ch14.18 in a neuroblastoma mice model. Furthermore, we demonstrate a model for measuring pain (allodynia) in rat that this antibody does not induced neurotoxic effects. Moreover, we have developed an innovative molecular engineering approach to increase the pro-apoptotic activity of this antibody. We show that the antibody anti-GD2-Oac generated are able to inhibited tumor growth cells independently of immune effectors *in vitro*.

Keywords: Cancer, Ganglioside, Therapeutic antibody, Neuroblastoma