

# DEVELOPPEMENT D'UN ANTICORPS THERAPEUTIQUE ANTI-NECTINE-4 DANS LE TRAITEMENT DU CANCER DU SEIN TRIPLE NEGATIF

CABAUD Olivier <sup>1</sup>, BERGER Ludovic <sup>1</sup>, CROMPOT Emerence <sup>1</sup>,  
ADÉLAIDE José <sup>1</sup>, FINETTI Pascal <sup>1</sup>, GUILLE Arnaud <sup>1</sup>, FARINA Anne <sup>2</sup>,  
CHARAFE-JAUFFRET Emmanuelle <sup>2</sup>, CASTELLANO Rémy <sup>3</sup>, COLLETTE Yves <sup>3</sup>,  
OLIVE Daniel <sup>4</sup>, MAMESSIER Emilie <sup>1</sup>, BIRNBAUM Daniel <sup>1</sup>,  
BERTUCCI François <sup>1,5</sup>, LOPEZ Marc <sup>1</sup>

1. *Laboratoire d'Oncologie Prédictive, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, CRCM, Inserm UMR1068, CNRS UMR7258, Aix-Marseille Université U105, Institut Paoli-Calmettes, 27, Boulevard Leï Roure - CS30059 - 13273 Marseille Cedex 09, France*
2. *ICEP Platform, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, CRCM, Inserm UMR1068, CNRS UMR7258, Aix Marseille Université U105, Institut Paoli-Calmettes, 27, Boulevard Leï Roure - CS30059 - 13273 Marseille Cedex 09, France*
3. *TrGET platform, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, CRCM, Inserm UMR1068, CNRS UMR7258, Aix Marseille Université U105, Institut Paoli-Calmettes, 27, Boulevard Leï Roure - CS30059 - 13273 Marseille Cedex 09, France*
4. *Laboratoire d'Immunologie des tumeurs. Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, CRCM, Inserm UMR1068, CNRS UMR7258, Aix-Marseille Université U105, Institut Paoli-Calmettes, 27, Boulevard Leï Roure - CS30059 - 13273 Marseille Cedex 09, France*
5. *Département d'Oncologie Médicale, Institut Paoli-Calmettes, 232 Bd Sainte-Marguerite, 13009 Marseille, France*

auteur correspondant : marc.lopez@inserm.fr

[doi.org/10.25830/afh.rfh.2023.35.1.87](https://doi.org/10.25830/afh.rfh.2023.35.1.87)

# DEVELOPMENT OF AN ANTI-NECTIN-4 THERAPEUTIC ANTIBODY FOR BREAST CANCER TREATMENT

## ABSTRACT

We identified nectin-4 as a new prognostic cell surface biomarker expressed in the poor prognosis triple negative breast cancer (TNBC) subtype. Immunohistochemistry data showed high expression in 62% of TNBC and reduced expression in healthy tissues. A nectin-4 directed Antibody-Drug Conjugate (ADC) has been developed and showed marked efficacy in preclinical primary and metastatic TNBC models. We have studied the consequences of long-term treatment with our ADC *in vivo* and identified a resistance mechanism involving the multidrug resistance protein MDR-1/P-glycoprotein (P-gp). Combination treatment with a P-gp inhibitor allows recovery of ADC sensitivity without toxicity. A new generation of ADC targeting nectin-4 is under development for clinics.

## KEY WORDS

**Immunotherapy, ADC targeting, biomarker, breast cancer, immunohistochemistry, nectin-4, resistance**

## RESUME

Nous avons identifié au laboratoire un nouveau biomarqueur pronostic de surface appelé nectine-4 exprimé dans le sous-type de cancer du sein triple négatif (TNBC) de mauvais pronostic. Les données d'immunohistochimie montrent une forte expression dans 62% des TNBC et une expression réduite dans les tissus sains. Un conjugué anticorps-médicament anti-nectine-4 (ADC) a été développé et montre une efficacité marquée dans des modèles précliniques TNBC primaires et métastatiques. Nous avons étudié *in vivo* les conséquences d'un traitement à long-terme avec notre ADC et identifié un mécanisme de résistance impliquant la protéine de multirésistance MDR-1/P-glycoprotéine (P-gp). Le traitement combiné avec un inhibiteur de P-gp permet de retrouver la sensibilité à l'ADC. Un médicament de type ADC de nouvelle génération ciblant nectine-4 est en cours de développement clinique.

## MOTS CLES

**Immunothérapie, ciblage par ADC, biomarqueur, cancer du sein, immunohistochimie, nectine-4, résistance**

## INTRODUCTION

Le cancer du sein triple négatif (TNBC) représente environ 15 à 20 % des cancers du sein et se caractérise par l'absence d'expression des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone, et l'absence de surexpression ou d'amplification du gène HER2. Les patientes atteintes de TNBC ont un risque plus élevé de rechute précoce que les patientes atteintes d'un cancer du sein non TNBC [1]. Cependant, malgré les efforts récents pour trouver des traitements alternatifs tels que l'hormonothérapie et les médicaments anti-HER2 pour les cancers du sein respectivement hormono-positifs et HER2-positifs, il n'existe pas de thérapies ciblées efficaces dans le traitement du TNBC. A ce jour, la chimiothérapie reste le seul traitement systémique disponible [2]. Ainsi, une protéine de surface cellulaire spécifiquement exprimée par les cellules tumorales de TNBC représenterait un biomarqueur de surface moléculaire idéal ainsi qu'une cible thérapeutique potentielle pour les conjugués anticorps-médicament appelés ADC (Antibody-Drug Conjugate). Les ADC sont des anticorps monoclonaux conjugués à des agents cytotoxiques via un agent de liaison chimique. L'anticorps, en reconnaissant un biomarqueur tumoral de surface, s'internalise dans la cellule pour induire la mort des cellules tumorales [3]. Ce type de médicament permet d'améliorer l'efficacité et de réduire la toxicité classiquement observée avec la chimiothérapie. La conception d'un ADC efficace pour le traitement du cancer nécessite l'identification d'une cible appropriée. Quatorze ADC sont actuellement approuvés par la Food and Drug Administration (FDA), dont historiquement le KADCYLA® (ado-trastuzumab emtansine (T-DM1)) dans le cancer du sein métastatique HER2+ réfractaire (BC), et maintenant le ENHERTU® dans les cancers HER2<sup>low</sup>. Le PADCEV® (enfortumab vedotin) est indiqué dans le cancer urothélial métastatique nectine-4+.

La nectine-4, produit du gène *PVRL4*, est impliquée dans la formation et le maintien des jonctions adhérentes en coopération avec les cadhérines. La nectine-4 est une molécule d'adhésion cellulaire transmembranaire de type I composée de trois domaines de type Ig (type V-C-C) dans sa région extracellulaire [4, 5]. C'est également un récepteur du virus de la rougeole, qui permet l'endocytose [6]. La nectine-4 est exprimée au cours du développement fœtal, son expression diminuant à l'âge adulte, contrairement aux autres nectines. Nous avons montré, avec d'autres, que la nectine-4 est un antigène exprimé dans différents cancers, et qu'elle présente des propriétés pro-oncogéniques [7-9]. Ces caractéristiques, associées à son expression limitée dans les tissus normaux respectifs, suggèrent que la nectine-4 pourrait être une cible ADC pour ces cancers.

Nous avons analysé l'expression transcriptionnelle et protéique de la nectine-4 et montré que la nectine-4 était un biomarqueur de surface cellulaire plus fréquemment surexprimé dans les TNBC et les cancers du sein de sous-type basal par rapport aux autres sous-types. Nous avons montré qu'une expression élevée de l'ARNm était un facteur indépendant de mauvais pronostic. Ensuite, nous avons développé un ADC anti-nectine-4 et montré son efficacité thérapeutique sur les TNBC localisés et métastatiques à la fois *in vitro* et *in vivo*, induisant une réponse avec une régression rapide, complète et durable. Afin d'étudier les conséquences d'un traitement à long terme avec cet ADC, nous avons développé un modèle préclinique de cancer du sein chez la souris, et mis en évidence un mécanisme de résistance après 9 mois de traitement puis montrer sa réversibilité. Fort de ces expériences, nous développons un ADC thérapeutique de nouvelle génération dont l'objectif est d'être moins toxique et plus efficace que l'ADC anti-nectine-4 appelé enfortumab vedotin utilisé dans le traitement du cancer urothélial métastatique.

## MATERIELS ET METHODES

### Patients et échantillons

Les échantillons cliniques ont été profilés à l'aide de puces à ADN pour l'analyse d'expression génique. Notre collection de tumeurs est de 353 cas représentant des carcinomes invasifs avant traitement chez des patients non métastatiques au moment du diagnostic. L'étude a été approuvée par notre comité d'examen institutionnel (accord IRB n° 15-002). Chaque patient a donné un consentement éclairé écrit pour l'utilisation de la recherche. Pour l'expression de la protéine, nous avons analysé une série consécutive de 61 échantillons de TNBC au diagnostic de notre Institut. Le profil moléculaire sur puces à ADN a été réalisé sur 12 de ces échantillons. Le consentement éclairé a été obtenu pour chaque patient et l'étude a été approuvée par notre IRB.

### Analyse des données d'expression génique

Nos données d'expression génique ont été générées à l'aide de puces spécifiques de l'ADN humain Affymetrix U133 Plus 2.0 (Affymetrix®, Santa Clara, CA, USA). L'expression de *PVRL4* a été mesurée en analysant différents jeux de sondes dont l'identité et la spécificité ont été vérifiées à l'aide du programme BLASTN 2.2.31+ du NCBI.

## Production d'anticorps, immunohistochimie (IHC)

Différents anticorps monoclonaux dirigés contre le domaine distal de type IgV de la nectine-4 ont été produits et analysés. La protéine V-Fc chimérique soluble recombinante de la nectine-4 a été utilisée pour immuniser des souris. La sélection des anticorps dérivés d'hybridomes contre la nectine-4 a été effectuée par cytométrie de flux en utilisant des cellules MDA-MB-231 transfectées.

L'IHC a été réalisée sur des sections de 5 µm de tissu congelé. Les sections ont été fixées dans de l'acétone pendant 10 minutes, séchées à l'air pendant 10 minutes et réhydratées dans du TBST. La coloration a été faite avec 0.5 µg/ml de N41mab pendant 3h à 37°C. L'anticorps secondaire OmnipMap anti-Ms HRP (Multimer HRP, Roche) a été incubé pendant 15 minutes. Une contre-coloration a ensuite été réalisée avec l'hématoxyline II et le réactif de bleuissement (Roche). Les résultats ont été quantifiés par Quick score (QS) en multipliant le pourcentage de cellules positives (P (de 0% à 100%)) par l'intensité (I (de 0 à 3)). Formule :  $QS = P \times I$ . Le score maximum étant de 300.

## Production de l'ADC

L'ADC a été produit par Concartis (San Diego, CA, USA). Les conjugués ont été produits à partir de l'anticorps monoclonal N41mab purifié. Le linker utilisé est le MC-Val-Cit-PAB-PNP (Maleimidocaproyl-L-valine-L-citrulline-p-aminobenzyl alcohol p-nitrophenyl carbonate) conjugué de manière covalente à la monométhyl auristatine-E (MMAE). Le Drug to Antibody Ratio (DAR) est de 4,73.

## Modèles animaux

Toutes les expériences ont été réalisées en accord avec la législation française pour la manipulation des animaux et approuvées par le comité d'éthique local (Accord n° 01152-01). Les souris NOD/SCID/γc null (NSG) ont été obtenues auprès de Charles River. Les souris sont hébergées dans des conditions stériles avec de la nourriture et de l'eau stérilisées fournies *ad libitum* et maintenues sur un cycle de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les cellules ont été inoculées sur les deux flancs dans la glande mammaire avec  $0,5 \times 10^6$  cellules en suspension dans du Matrigel à 50 % sans rouge de phénol (Becton-Dickinson Bioscience). Les souris ont été traitées comme indiqué sur les figures. La croissance tumorale a été mesurée avec un pied à coulisse numérique en calculant le volume tumoral (longueur ×

largeur  $2 \times \pi/6$ ). Tous les animaux ont été répartis au hasard dans les groupes de traitement, de telle sorte que le volume tumoral moyen de chaque groupe soit de 100 à 200 mm<sup>3</sup>. La douleur et la détresse ont été évaluées pour chaque animal. Le poids des animaux a été contrôlé tous les 3 jours afin d'évaluer la toxicité des différents traitements.

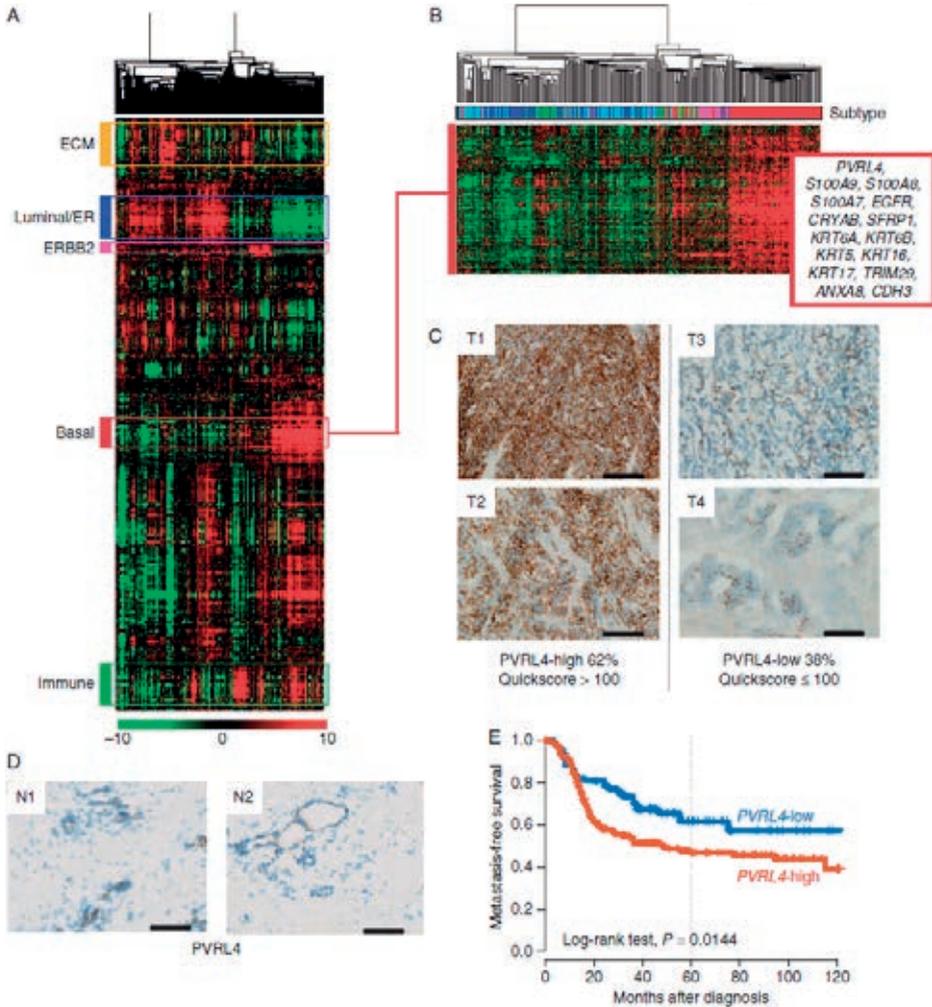
## RESULTATS

### **Nectine-4 est exprimée dans le TNBC avec une expression associée à un mauvais pronostic**

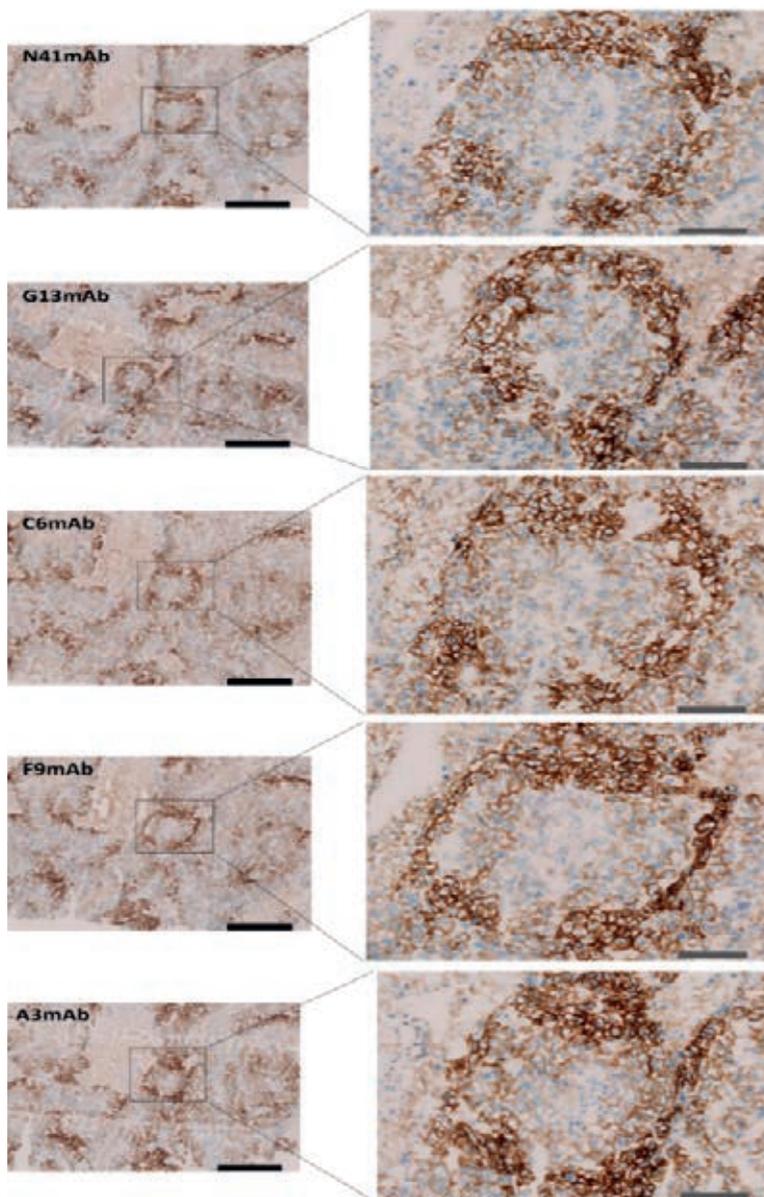
Nous avons examiné l'expression de nectine-4 dans le cancer du sein. L'analyse de 353 échantillons de cancer du sein a montré que l'expression ARNm de nectine-4 se trouvait dans le groupe de gènes "basal" (**Figure 1A,B**). Nous avons analysé l'expression de la protéine nectine-4 par immunohistochimie dans 61 TNBCs. L'anticorps monoclonal sélectionné pour cette analyse (N41mab) reconnaît le domaine distal de type IgV de la nectine-4 humaine. Plusieurs anticorps développés au laboratoire ont été comparés et montrent des marquages similaires en immunohistochimie permettant de valider le choix de cet anticorps (**Figure 2**). L'expression de la nectine-4 est détectée au niveau de la membrane plasmique. Sur la base de l'évaluation semi-quantitative QuickScore (QS), nous avons distingué un " groupe nectine-4-high " (QS>100) et un " groupe nectine-4-low " (QS<100), représentant respectivement 62% et 38% des TNBC (**Figure 1C**). La nectine-4 n'est pas détectée dans l'épithélium normal de la glande mammaire (**Figure 1D**), ni dans 30 tissus normaux adultes différents, à l'exception de la peau où elle est retrouvée au niveau de la couche granuleuse de l'épiderme (**Figure 3**). L'analyse pronostique univariée a montré que l'expression élevée de *PVRL4* était associée à la survie sans événement métastatique dans les TNBC (**Figure 1E**). L'ensemble de ces données montrent l'intérêt de nectine-4 comme nouveau marqueur pronostic et comme cible thérapeutique potentielle dans le TNBC.

### **Ciblage de la nectine-4 par un ADC anti-nectine-4 dans le TNBC**

Nous avons ensuite orienté notre étude pour montrer que la nectine-4 pouvait être une cible thérapeutique dans le TNBC. Après sélection d'un anticorps monoclonal présentant une affinité apparente élevée et une capacité à internaliser

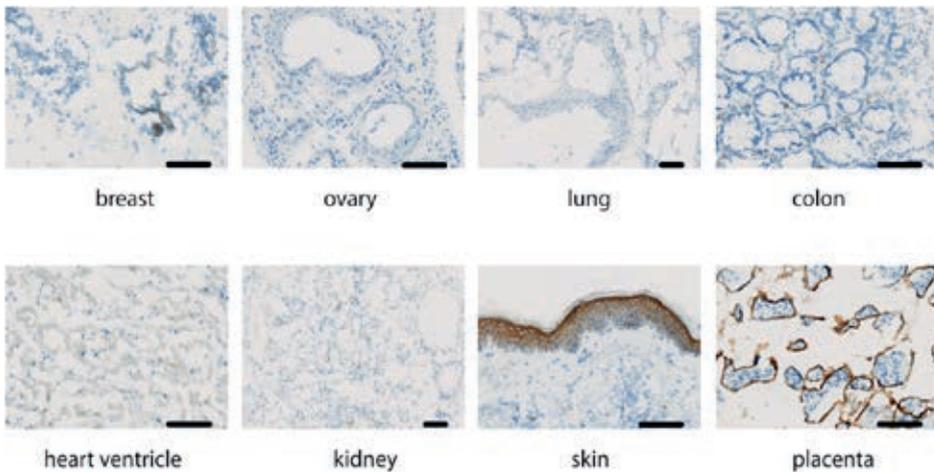


**Figure 1** : Expression de PVRL4/nectine-4 dans les échantillons cliniques de cancer du sein. (A) Clustering hiérarchique de 353 échantillons de cancer du sein primaire et de 12304 gènes sur la base des niveaux d'expression de l'ARNm. (B) Vue élargie du groupe de gènes "basal", qui comprend le gène *PVRL4*. (C) Expression de nectine-4 dans les TNBCs par IHC sur coupes congelées en utilisant 0,5 mg/ml de N41mab. Le marquage est de type membranaire. T1 et T2 sont deux TNBCs avec QS>100. T3 et T4 sont deux TNBCs avec QS<100. Echelle : 100 µm. (D) Absence d'expression dans le tissu épithélial normal de la glande mammaire humaine. Echelle : 100 µm. (E) Courbes de survie en fonction de l'expression de l'ARNm *PVRL4* dans les TNBC (N=290).



**Figure 2 : Validation de l'anticorps N41mab par IHC.**

La validation est réalisée à la concentration de 0,5 µg/µl sur coupe congelée d'un échantillon TNBC. Cinq anticorps monoclonaux produits au laboratoire sont testés et présentent des profils IHC similaires. Barre d'échelle = 100µm.



**Figure 3** : Analyse de l'expression de nectine-4 sur tissus sains. Cette expérience est réalisée par IHC avec l'anticorps N41mab à 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , sur un « Tissue MicroArray » congelé comprenant 30 tissus sains en triplicate (Biochain, CA, USA). Barre d'échelle = 100 $\mu\text{m}$ .

importante, nous avons développé un ADC avec l'anticorps N41mab couplé à la monométhyl auristatine-E (MMAE) via un linker chimique clivable de type Citrulline-Valine (**Figure 4**). L'auristatine-E est un puissant inhibiteur de la polymérisation des microtubules et bloque les cellules tumorales en phase M du cycle cellulaire. L'activité de notre ADC a été testée *in vitro* et *in vivo* sur la lignée de cancer du sein SUM190 (exprimant nectine-4) puis sur quatre modèles PDX (Patient Derived Xenograft) de TNBC primaires de sous-type basal, xénotransplantés dans la glande mammaire de souris NOD/SCID/ $\gamma\text{c}$  null (NSG) immunodéficientes. Ces modèles précliniques reproduisent la physiopathologie de ce type de cancer. Ces modèles ont été sélectionnés par IHC, à partir de notre collection, pour avoir une expression (Quickscore (QS)) forte, intermédiaire, faible et négative sur la base de l'expression de nectine-4 (**Figure 5**). Ces souris ont été traitées par voie intra-veineuse (i.v.) avec deux doses successives d'ADC à 10mg/kg. Le niveau de réponse clinique corrèle bien avec le niveau d'expression de la nectine-4 : une régression rapide et complète de la masse tumorale est observée pour la PDX400 (QS=300) et la PDX 317 (QS=140) (**Figure 6A et B**), et dans une moindre mesure pour la PDX348 (QS=100) (**Figure 6C**), et pas pour la PDX434 (QS=10) (**Figure 6D**). En revanche, la PDX 348 reste insensible au docétaxel (3 fois 10 mg/kg i.p.) (**Figure 6E**). Dans tous les cas, la réponse est transitoire suggérant qu'un seul traitement n'est pas suffisant pour obtenir une rémission. Pour évaluer l'efficacité du traitement par

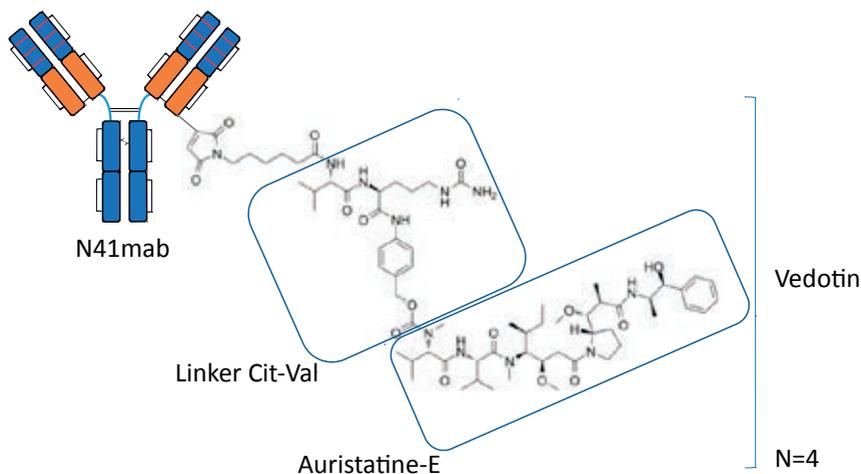


Figure 4 : Production de l'ADC anti-nectine-4.

L'ADC anti-nectine-4 est couplé à l'auristatine-E (N41mab-vcMMAE) via un peptide clivable par les cathépsines lysosomales. Le Drug to Antibody Ratio (DAR) est de 4, soit 4 molécules d'auristatine-E par anticorps.

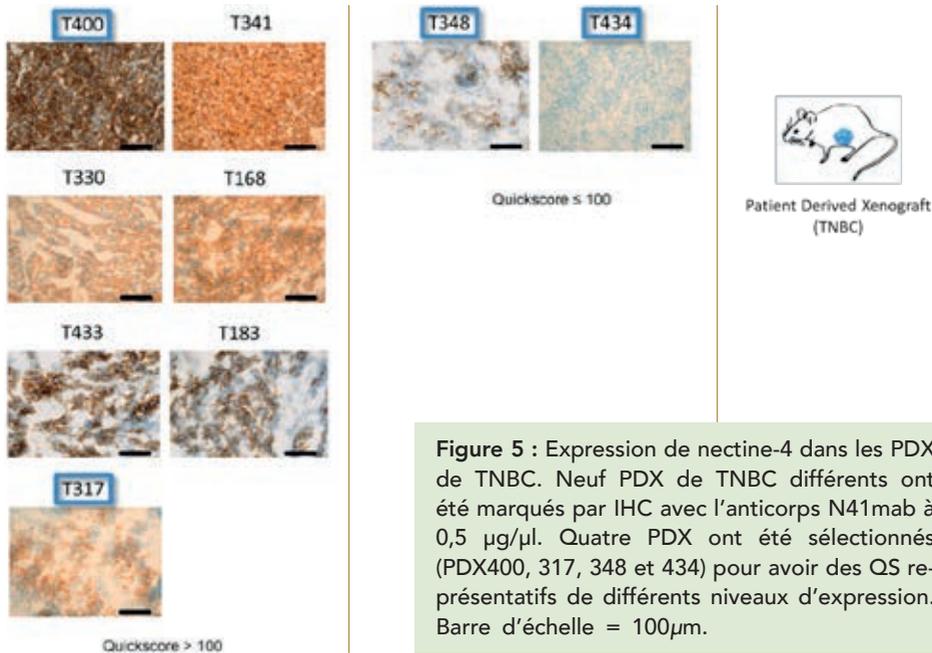
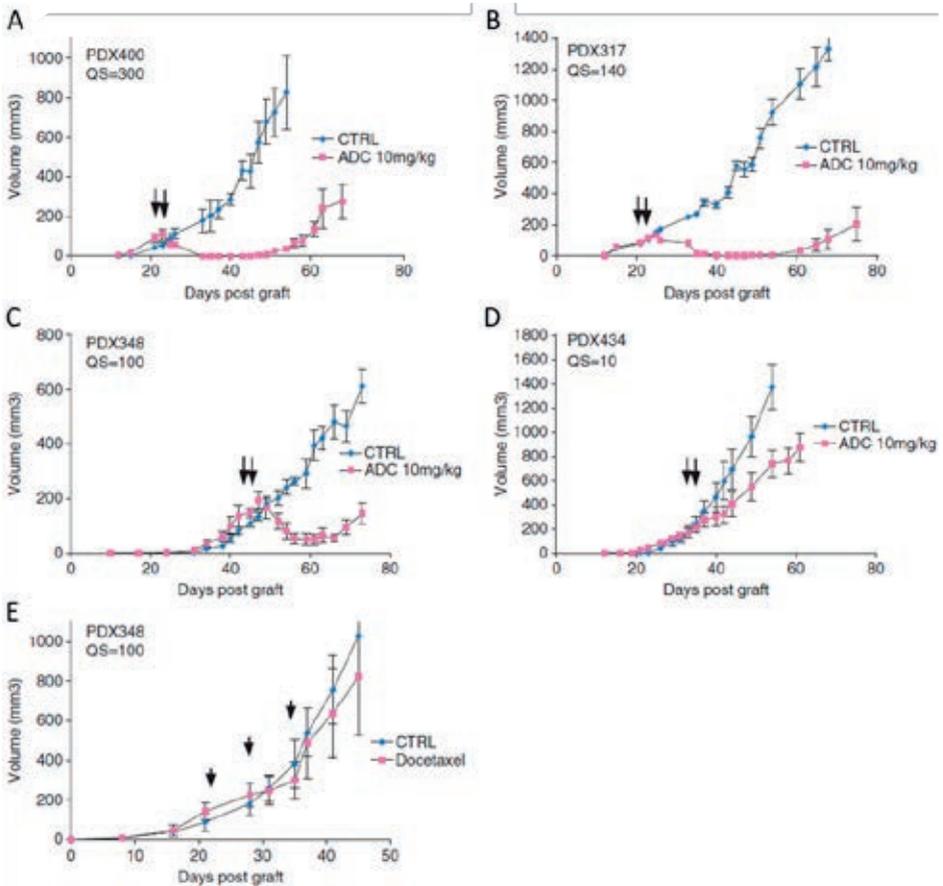


Figure 5 : Expression de nectine-4 dans les PDX de TNBC. Neuf PDX de TNBC différents ont été marqués par IHC avec l'anticorps N41mab à 0,5 µg/µl. Quatre PDX ont été sélectionnés (PDX400, 317, 348 et 434) pour avoir des QS représentatifs de différents niveaux d'expression. Barre d'échelle = 100µm.



**Figure 6 :** Efficacité de l'ADC anti-nectine-4 *in vivo*.

Les 4 modèles de PDX TNBC sont traités par 2 injections i.v. caudale de l'ADC N41mab-vc-MMAE à 10 mg/kg (Flèche noir). A : PDX400, B : PDX317, C : PDX348, D : PDX 434, E : PDX 348 traitées par le docétaxel.

ADC dans la maladie métastatique, nous avons ensuite traité la PDX317 développant des lésions métastatiques spontanées à partir de tumeurs primaires. Le traitement avec deux doses i.v. successives d'ADC entraîne une réduction rapide et une disparition de toutes les lésions métastatiques observées par analyse de luminescence (**Figure 7**). Ces résultats ont montré que N41mab-vcMMAE a une activité antitumorale marquée dans les TNBCs primaires et métastatiques exprimant la nectine-4 [10].

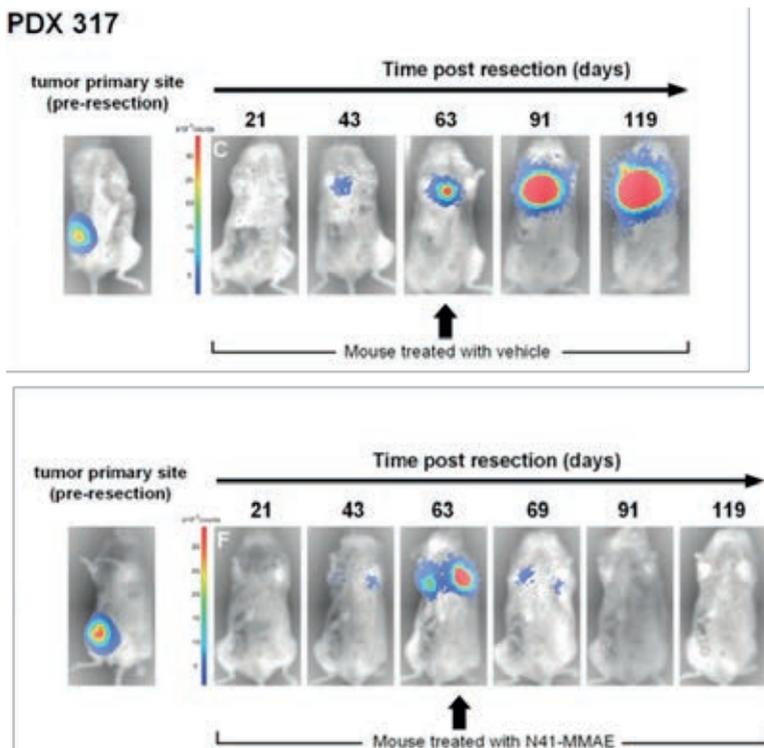
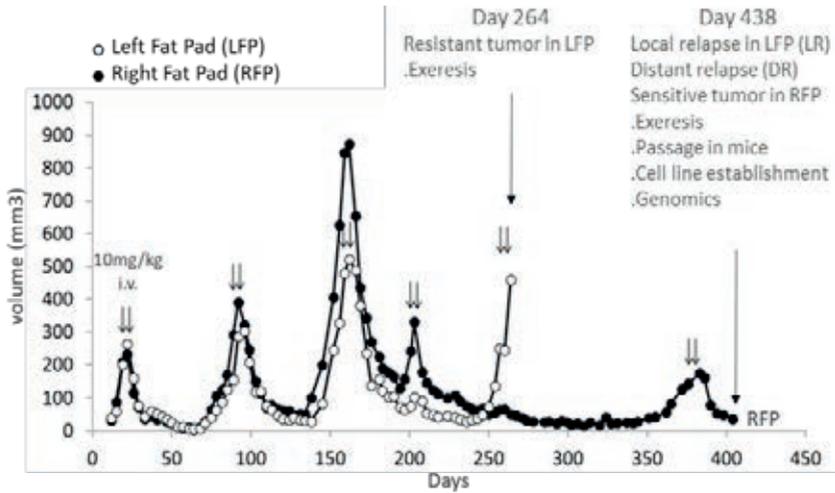


Figure 7 : Efficacité de l'ADC anti-nectine-4 sur les métastases.

Après résection chirurgicale des tumeurs mammaires primaires, l'apparition spontanée de métastases a été suivie par imagerie par bioluminescence. Les souris métastatiques issues de la PDX317 ont été traitées par le diluant (haut) ou par l'ADC N41mab-vcMMAE (bas) par injection i.v. caudale.

## Traitement à long terme avec l'ADC anti-nectine-4 et induction de résistance

Pour étudier les conséquences d'un traitement à long terme avec cet ADC, nous avons utilisé le modèle SUM190 et nous avons mis en évidence un mécanisme de résistance au N41mab-vcMMAE après un traitement de 9 mois (**Figure 8**). Après récurrences, les tumeurs droite et gauche restent sensibles aux nouvelles injections. Au jour 438, une rechute locale (LR) et une métastase dans un ganglion lymphatique inguinal (rechute à distance (DR)) ont été observées. Nous avons caractérisé ce modèle de résistance et mis en évidence une augmentation, dans les tumeurs résistantes, de l'expression du gène ABCB1, codant pour la protéine de



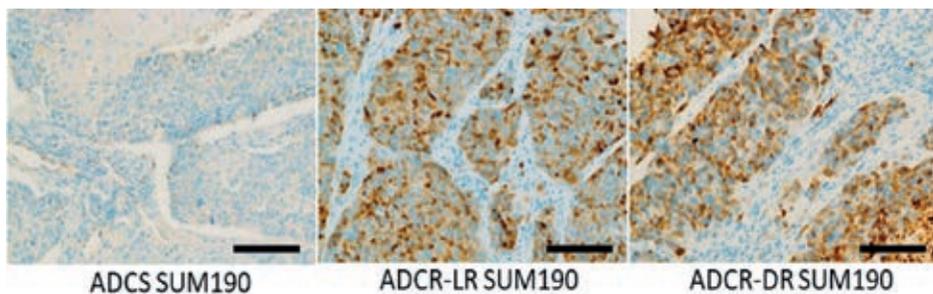
**Figure 8 :** Résistance au traitement ADC.

Des souris NSG ont été xéno greffées dans la glande mammaire (côtés droit et gauche) avec des cellules SUM190 exprimant nectine-4. Des traitements répétés avec deux injections i.v. de 10 mg/kg de N41mab-MMAE (flèches) ont été effectués au moment des reprises tumorales. La mesure du volume tumoral a été effectuée dans le coussinet adipeux gauche (point blanc) et droit (point noir). Des rechutes locales et à distance (LR et DR) ont été observées sous traitement

multirésistance MDR-1/P-glycoprotéine (P-gp) associée à une amplification focale et à une expression protéique élevée. Les deux tumeurs résistantes (ADCR-LR et ADCR-DR) expriment des niveaux élevés de P-gp, comparées à la lignée sensible (ADCS) (Figure 9).

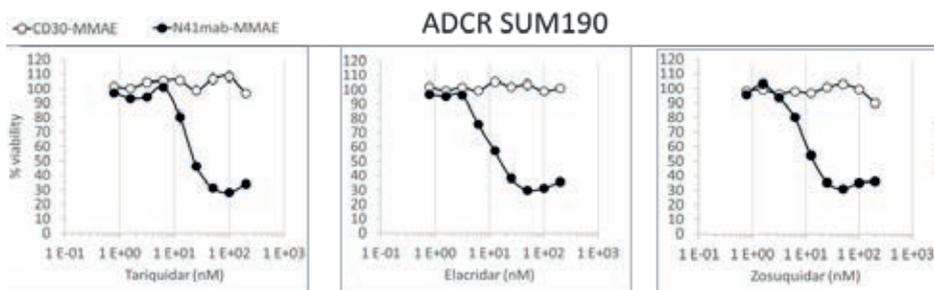
## Réversion de la résistance

L'efflux d'agents cytotoxiques comme la chimiothérapie par les transporteurs ABC est un mécanisme bien connu de résistance en clinique [11]. Des inhibiteurs pharmacologiques des transporteurs ABC ont montré une activité dans les études précliniques mais se sont révélés toxiques et peu efficaces en clinique [12]. P-gp est exprimé dans de nombreux tissus sains de l'organisme, assurant un rôle de détoxifiant notamment des xénobiotiques. Dans le cadre d'essais cliniques combinant la chimiothérapie et les inhibiteurs P-gp, de fortes toxicités ont été décrites, liées à la séquestration de la chimiothérapie dans les tissus sains. Nous avons postulé que la combinaison ADC et inhibiteurs de P-gp pouvait être efficace et

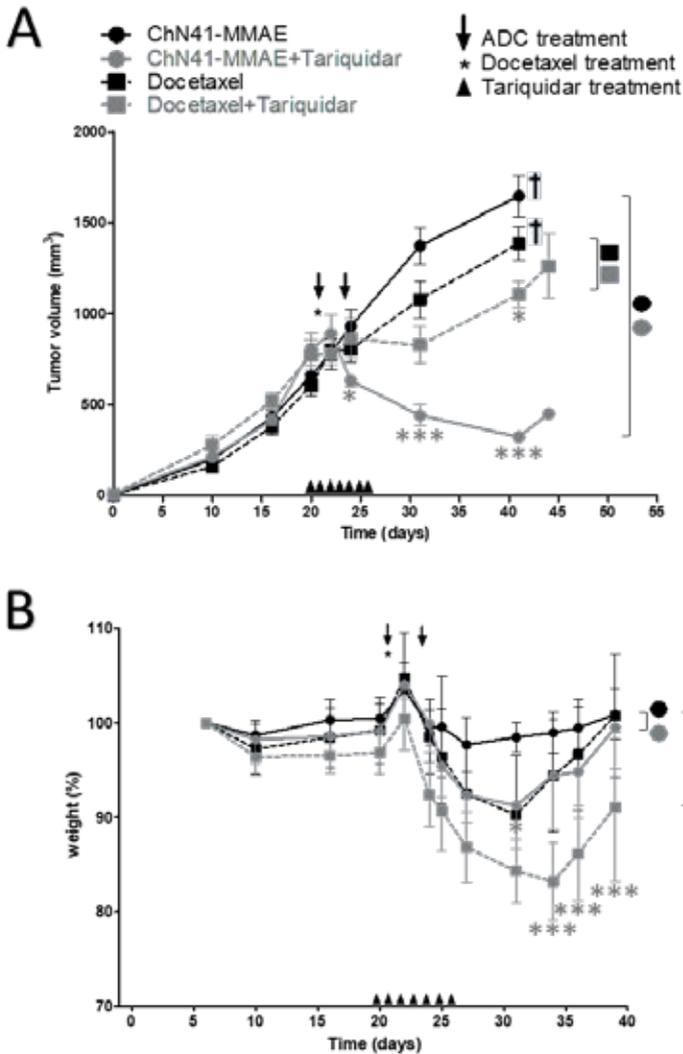


**Figure 9** : Expression de P-gp dans les tumeurs sensibles et résistantes. L'expression mesurée par IHC dans les tumeurs sensibles ADCS vs résistantes (ADCR-LR et ADCR-DR) en utilisant l'anticorps JSB-1 anti P-gp au 1/40 (Biologend Inc., CA, USA). Barre d'échelle = 100µm.

peu toxique puisque dans ce cas l'agent cytotoxique est délivré spécifiquement à la tumeur. Nous avons d'abord testé si l'inhibition pharmacologique de P-gp pouvait rétablir la sensibilité à notre ADC. Les cellules ADCR ont été traitées avec des inhibiteurs de troisième génération (tariquidar, elacridar, zosuquidar) combinés avec soit du brentuximab vedotin (BV) (ADC CD30-MMAE comme contrôle négatif) soit du N41mab-vcMMAE. Les trois inhibiteurs de P-gp utilisés jusqu'à 200 nM ne sont pas toxiques comme le montrent les courbes CD30-MMAE. Ils restaurent la sensibilité des cellules ADCR à N41mab-vcMMAE, avec une IC50 similaire pour les trois inhibiteurs (20, 10 et 10 nM respectivement) (**Figure 10**). Les cellules ADCR ont été xéno greffées dans des souris NSG. Le tariquidar est connu pour



**Figure 10** : Réversion de la résistance à l'ADC *in vitro* à l'aide d'inhibiteurs de P-gp. La lignée SUM190 ADCR a été traitée avec 1µg/mL de N41mab-vcMMAE (cercle noir) ou de contrôle négatif CD30-MMAE (cercle blanc) en présence des concentrations indiquées de tariquidar, elacridar ou zosuquidar. Les trois inhibiteurs de P-gp ne sont pas toxiques (courbes CD30-MMAE), et rétablissent la sensibilité au N41mab-vcMMAE.



**Figure 11** : Réversion de la résistance à l'ADC *in vivo* à l'aide d'inhibiteurs de P-gp.

(A) Les cellules SUM190 ADCR-DR ont été xéno greffées de façon orthotopique dans des souris NSG. Les souris ont été traitées lorsque la tumeur a atteint un volume moyen de 700 mm<sup>3</sup>. Les souris ont été traitées soit par N41mab-MMAE (cercles noirs), soit par docétaxel (carrés noirs), soit en association avec tariquidar (gris). Les "groupes tariquidar" ont été traités une fois par jour pendant 7 jours avec du tariquidar (15 mg/kg i.v.). Les traitements par ADC (2 x 10 mg/kg i.v.) et docétaxel (10 mg/kg i.v.) ont débuté après le premier traitement par tariquidar. (B) La mesure du poids des souris a été effectuée dans les différents groupes. La légende est similaire à celle de A.

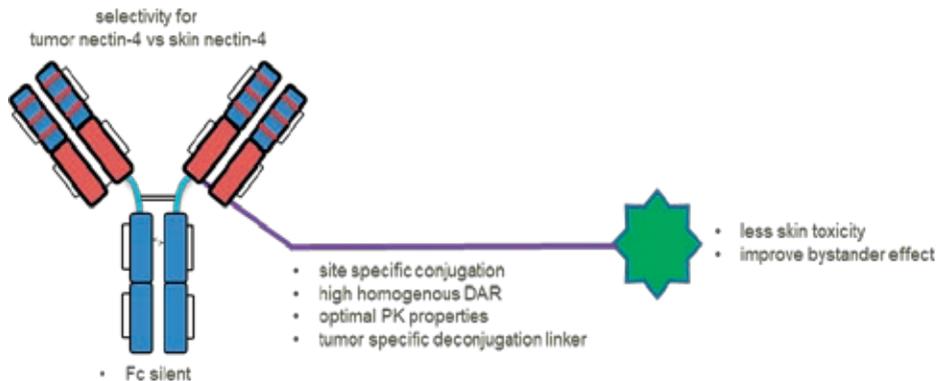
inhiber la P-gp murine *in vitro* et *in vivo*. Nous avons comparé l'efficacité et la toxicité du traitement par docétaxel versus ADC anti-nectine-4 en association ou non avec des doses répétitives de tariquidar dans ce modèle résistant (**Figure 11**). Comme attendu, le N41mab-MMAE seul n'a eu aucun effet sur la croissance tumorale. Le docétaxel seul a entraîné une légère réduction de la croissance tumorale. L'association de tariquidar avec le docétaxel a entraîné une réduction de la croissance légèrement plus durable que le docétaxel seul, probablement attribuable à tariquidar. En revanche, l'association de tariquidar avec le N41mab-MMAE entraîne une réduction beaucoup plus marquée de la croissance tumorale que N41mab-MMAE seul, ce qui indique que le tariquidar a re-sensibilisé la tumeur résistante à l'ADC *in vivo* (**Figure 11A**). La toxicité des différents traitements a été évaluée par mesure du poids des animaux au cours du temps. L'association de tariquidar avec le docétaxel a induit une diminution de poids marquée par rapport au docétaxel seul, proche du point limite éthique (20%), suggérant une toxicité élevée (**Figure 11B**). En revanche, l'association de tariquidar avec N41mab-MMAE n'induit qu'une légère diminution de poids par rapport à N41mab-MMAE seul (**Figure 11B**). Ces données précliniques démontrent que l'inhibiteur de P-gp associé à notre ADC est efficace tout en étant sûr et beaucoup moins toxique que lorsqu'il est associé à la chimiothérapie [13].

## DISCUSSION

Nous montrons que la nectine-4 est une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement du TNBC. Il s'agit d'un biomarqueur de surface fréquemment exprimé dans les TNBC, avec une valeur pronostique négative indépendante, et une absence d'expression dans le tissu mammaire normal. L'ADC anti-nectine-4 que nous avons développé (N41mab-vcMMAE) induit des réponses complètes et durables *in vitro* et *in vivo* sur des échantillons positifs pour la nectine-4, y compris des tumeurs primaires, des lésions métastatiques et des rechutes locales ; l'efficacité est dose-dépendante et expression-dépendante. L'enfortumab vedotin (Seattle Genetics) a été développé en clinique dans le traitement du cancer urothélial métastatique. Le taux de réponse global (ORR) chez les patients atteints de cancer urothélial réfractaire aux traitements est de 44% [14]. Cet ADC anti-nectine-4 est du même type que celui développé au laboratoire puisque composé du même linker et de la même toxine (MMAE). Ces résultats restent prometteurs mais limités par l'induction d'une toxicité cutanée et une neuropathie périphérique. Ces effets indésirables sont liés à des effets « on-target » sur la peau, la nectine-4 y étant exprimée (Cf **Figure 3**).

D'autre part l'échappement des patients à l'enfortumab vedotin est fréquent et potentiellement lié à des mécanismes impliquant les pompes d'efflux tels que nous les avons décrits. L'utilisation d'inhibiteurs de P-gp en association avec l'enfortumab vedotin est d'ailleurs maintenant proposé dans le cas de récurrence. L'ensemble de ces données nous ont amenés à développer un ADC de nouvelle génération permettant d'améliorer l'index thérapeutique. Cet ADC présente de nombreuses caractéristiques résumées dans la **Figure 12** et les données précliniques restent très encourageantes pour aborder la phase clinique.

La nectine-4 est exprimée dans différents carcinomes. Elle est en passe de devenir un biomarqueur théranostique, permettant d'associer sa détection à l'éligibilité du patient au traitement.



**Figure 12** : Développement d'un ADC anti-nectine-4 de nouvelle génération.

Le design moléculaire de cet ADC prend en compte l'ensemble des données connues sur la cible, les données *in vivo* ainsi que les données cliniques de l'essai avec l'enfortumab vedotin. L'anticorps sélectionné présente une reconnaissance différentielle entre la nectine-4 tumorale et la nectine-4 exprimée dans la peau afin de minimiser l'effet de toxicité on-target observé dans les essais cliniques. La libération de la drogue est ici tumeur spécifique. La drogue sélectionnée n'est pas un substrat de P-gp et cet ADC reste actif dans le cas de résistance liée à P-gp (Brevets déposés).

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. SORLIE T., et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001,**98** (19): 10869-10874 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11553815>
2. BERTUCCI F., FINETTI P. & BIRNBAUM D. Basal breast cancer: a complex and deadly molecular subtype. *Curr Mol Med*, 2012,**12** (1): 96-110 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22082486>
3. JOUBERT N., et al. Antibody-Drug Conjugates: The Last Decade. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2020,**13** (9): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32937862>
4. FABRE S., et al. Prominent role of the Ig-like V domain in trans-interactions of nectins. Nectin3 and nectin 4 bind to the predicted C-C'-C"-D beta-strands of the nectin1 V domain. *J Biol Chem*, 2002,**277** (30): 27006-27013 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12011057>
5. REYMOND N., et al. Nectin4/PRR4, a new afadin-associated member of the nectin family that trans-interacts with nectin1/PRR1 through V domain interaction. *J Biol Chem*, 2001,**276** (46): 43205-43215 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11544254>
6. MUHLEBACH M.D., et al. Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature*, 2011,**480** (7378): 530-533 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22048310>
7. DERYCKE M.S., et al. Nectin 4 overexpression in ovarian cancer tissues and serum: potential role as a serum biomarker. *Am J Clin Pathol*, 2010,**134** (5): 835-845 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20959669>
8. FABRE-LAFAY S., et al. Nectin-4 is a new histological and serological tumor associated marker for breast cancer. *BMC Cancer*, 2007,**7** 73 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17474988>
9. PAVLOVA N.N., et al. A role for PVRL4-driven cell-cell interactions in tumorigenesis. *Elife*, 2013,**2** e00358 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23682311>
10. M-RABET M., et al. Nectin-4: a new prognostic biomarker for efficient therapeutic targeting of primary and metastatic triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*, 2017,**28** (4): 769-776 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27998973>
11. BUKOWSKI K., KCIUK M. & KONTEK R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Int J Mol Sci*, 2020,**21** (9): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32370233>

12. BINKHATHLAN Z. & LAVASANIFAR A. P-glycoprotein inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer: current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013,**13** (3): 326-346 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23369096>
13. CABAUD O., et al. Overcoming Resistance to Anti-Nectin-4 Antibody-Drug Conjugate. *Mol Cancer Ther*, 2022,**21** (7): 1227-1235 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35534238>
14. ROSENBERG J.E., et al. Pivotal Trial of Enfortumab Vedotin in Urothelial Carcinoma After Platinum and Anti-Programmed Death 1/Programmed Death Ligand 1 Therapy. *J Clin Oncol*, 2019,JCO1901140 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31356140>