



# Génération chimique d'engageurs de lymphocytes T inhibiteurs de points de contrôle pour le traitement du cancer

Reçu : 11 octobre 2022

Accepté : 21 juin 2023

Publié en ligne le 24 juillet 2023

Vérifier les mises à jour

 Peter A. Szijj <sup>1</sup>, Melissa A. Gray<sup>2,3</sup>, Mikaela K. Ribic<sup>2,3</sup>, Calise Bahou<sup>1</sup>, João CF Nogueira <sup>1</sup>, Carolyn R. Bertozzi <sup>1</sup>, Vijay Chudasama <sup>1</sup> ✉

Les engageurs de cellules T bispécifiques (BiTEs), un sous-ensemble d'anticorps bispécifiques (bsAbs), peuvent favoriser la mort d'une cellule cancéreuse ciblée en la rapprochant d'une cellule T cytotoxique. Les activateurs de lymphocytes T inhibiteurs de points de contrôle (CiTE) comprennent un noyau BiTE avec une protéine immunomodulatrice ajoutée, qui sert à inverser les stratégies d'amortissement immunitaire des cellules cancéreuses, améliorant ainsi l'efficacité. Jusqu'à présent, l'ingénierie des protéines a été la principale approche pour générer des bsAb et des CiTE, mais des méthodes chimiques améliorées pour leur génération ont récemment été développées. Des bsAb homogènes à base de fragments construits à partir de régions de liaison à l'antigène de fragment (Fabs) peuvent être générés à l'aide de la chimie du clic. Nous décrivons ici une méthode chimique pour générer des conjugués à trois protéines fonctionnalisées par la biotine, qui comprennent deux molécules CiTE, l'une contenant un Fab anti-PD-1 et l'autre contenant une enzyme immunomodulatrice, *Salmonella typhimurium* sialidase. L'efficacité des CiTE s'est avérée supérieure à celle de l'échafaudage BiTE plus simple, le CiTE contenant de la sialidase induisant une cytotoxicité médiée par les lymphocytes T sensiblement améliorée *in vitro*. La méthode chimique décrite ici, plus généralement, permet la génération de constructions multi-protéines avec d'autres applications biologiques.

Il existe maintenant cinq exemples d'anticorps bispécifiques (bsAbs) en tant que thérapeutiques anticancéreuses sur le marché, dont trois ont été approuvés par la Food and Drug Administration des États-Unis et l'Agence européenne des médicaments depuis 2011–3. Ces bsAb peuvent se lier simultanément à deux épitopes antigéniques distincts, ce qui peut faciliter la biologie en aval que les anticorps monospécifiques ne sont pas capables d'effectuer<sup>4</sup>. Grâce à la génération de conjugués multiprotéiques, en particulier avec la possibilité d'attacher des fonctionnalités de petites molécules, d'autres mécanismes d'action avancés sont accessibles. Une classe prometteuse de telles molécules combine la technologie bsAb de redirection des lymphocytes T avec des protéines immunomodulatrices pour un bénéfice thérapeutique supplémentaire<sup>5</sup>. Nous rapportons ici une méthode chimique pour générer des conjugués de trois protéines fonctionnalisées par la biotine.

Jusqu'à présent, l'ingénierie génétique et protéique pour générer des séquences d'acides aminés fusionnées, qui peuvent ensuite être exprimées, a été l'approche standard pour générer des bsAb. Cependant, le domaine de la bioconjugaison des protéines (c'est-à-dire comment attacher de petites molécules aux protéines) a fourni des méthodes chimiques pour la production de bsAb, qui peuvent offrir des avantages par rapport aux méthodes basées sur l'expression car elles offrent conceptuellement une plus grande modularité, vitesse et poignées potentiellement inhérentes pour une fonctionnalisation plus poussée, comme les conjugués bsAb-médicament ou bsAb-fluorophore. Pour un aperçu plus complet du sujet de la synthèse chimique des bsAb, les lecteurs sont renvoyés à deux revues récentes sur le sujet<sup>6,7</sup>. Le re-pontage des liaisons disulfure interchaînes accessibles aux régions de liaison à l'antigène (Fabs) permet

<sup>1</sup>Département de chimie, University College London, Londres, Royaume-Uni. <sup>2</sup>Département de chimie, Sarafan ChEM-H et Howard Hughes Medical Institute, Université de Stanford, Stanford, Californie, États-Unis. <sup>3</sup>Ces auteurs ont contribué à parts égales : Melissa A. Gray, Mikaela K. Ribic. ✉courriel : [bertozzi@stanford.edu](mailto:bertozzi@stanford.edu) ; Unis. [v.chudasama@ucl.ac.uk](mailto:v.chudasama@ucl.ac.uk)

formation de bsAb homogène sélective de site. La génération de bsAb homogènes et bien définis est possible grâce au pontage disulfure et à la plupart des anticorps parce que l'abondance naturelle de la cystéine est faible<sup>8</sup>, contiennent quatre disulfures facilement accessibles, les Fab n'en contenant qu'un. Les premiers outils chimiques comprennent un PEG avec deux bis-sulfones à chaque extrémité pour générer Fab-PEG-Fab<sup>9</sup>. Des molécules de maléimide avec des groupes partants sur chaque double liaison - appelées maléimides de nouvelle génération (NGM) - ont été utilisées pour synthétiser une gamme de constructions (Fab-ScFv, albumine-Fab et (ScFv)<sub>3</sub>)<sup>10,11</sup>, et la combinaison de la plate-forme NGM avec la chimie clic azide-alcyne promu par la contrainte (SPAAC) a été utilisée pour générer Fab-Fab12 et IgG2 pleine longueur - IgG213 (IgG, immunoglobuline G). Ces méthodes étaient utiles mais étaient limitées par de longs temps de réaction, de faibles rendements et l'impossibilité d'une fonctionnalisation ultérieure.

Récemment, une méthode basée sur la chimie de clic rapide et modulaire pour la construction de conjugués d'anticorps bispécifiques homogènes a été développée qui a la capacité d'ajouter une fonctionnalité supplémentaire au bsAb14. La méthode était basée sur le pli scaf dibromopyridazinedione (Br2PD) (Fig. 1a)<sup>15–19</sup>, dans lequel le disulfure interchaîne d'un Fab est réduit avec TCEP (tris (2-carboxyéthyl) phosphine) et mis à réagir avec une molécule Br2PD, conduisant à deux réactions séquentielles d'addition-élimination où chaque atome de Br est déplacé par l'atome S de l'un des résidus de cystéine. Cela conduit à une liaison covalente à 2 carbones entre les chaînes lourdes et légères du Fab, qui est stable dans le sérum sanguin<sup>17</sup>. Cette méthode a été utilisée pour re-ponter les liaisons disulfure des Fab et fonctionnaliser la protéine avec des poignées de clic bioorthogonales (alcyne contraint et tétra zine). Ces Fab activés par clic pourraient réagir les uns avec les autres par le biais de la réaction de cycloaddition Diels - Alder à demande d'électrons inverse (SPIEDAC) favorisée par la contrainte pour générer une construction bsAb où les deux protéines sont liées par une attache flexible contenant du PEG (Fig. 1b). Comme les edones de pyridazine contiennent deux atomes N dans le cycle, une deuxième poignée fonctionnelle pourrait être introduite. Cela a été démontré avec l'attachement de

deux colorants fluorescents distincts au bsAb via une cycloaddition azide-alcyne catalysée par Cu14. Comme Cu est difficile à éliminer et également toxique, le développement d'une méthode où les deux réactions de clic sont sans Cu serait souhaitable pour la production d'un conjugué à trois protéines.

Récemment, une approche à base de pyridazinedione sans Cu a été utilisée pour générer des bsAbs-SynAbs de type IgG (anticorps synthétiques). La modalité Fc d'un mAb anti-CD20 (rituximab) a été modifiée avec des poignées de clic d'alcyne contraint (BCN, bicyclo [6.1.0] non-4-yne) ou de tétrazine, et a réagi séquentiellement avec des espèces Fab, chacune abritant une poignée de clic complémentaire, pour former des SynAbs mono- ou bispécifiques<sup>20</sup>. Cette stratégie était une itération de la méthode à base de pyridazinedione décrite précédemment pour la génération de bsAb qui permettait en outre l'introduction d'une fonctionnalité médiée par Fc, telle que l'extension de la demi-vie ou la fonction effectrice. Ces SynAbs n'étaient cependant pas fonctionnalisés avec de petites molécules supplémentaires. Il est important de noter que la stratégie employée pour générer des SynAbs reposait sur l'utilisation d'un Fc comme noyau de la construction à trois protéines, limitant l'utilité aux espèces de type IgG. Ainsi, une nouvelle méthode devait être développée pour permettre la génération de constructions à trois protéines avec une sélection plus large de protéines constituantes, c'est-à-dire non limitée à deux Fab et un Fc. Nous avons ainsi établi une méthode chimique pour la synthèse de conjugués à trois protéines, adaptée à la fixation d'une modalité inhibitrice de point de contrôle supplémentaire à un noyau d'engagement des lymphocytes T.

La classe de molécules fonctionnelles que nous générons ici peut être appelée « engagement des lymphocytes T inhibiteurs de point de contrôle » (CiTE)<sup>21</sup>. Les CiTE combinent la capacité cytotoxique des engageurs de lymphocytes T bispécifiques (BiTEs; notez que dans cet article, nous utilisons le terme BiTE dans un sens plus large pour englober tous les formats d'engagement de lymphocytes T bispécifiques)<sup>22,23</sup> avec une modalité inhibitrice de point de contrôle pour améliorer encore l'activation des lymphocytes T et donc l'efficacité. Des exemples limités de ces conjugués à trois ou quatre protéines, générés par génie protéique, ont été rapportés dans le contexte de l'immunothérapie<sup>5</sup>.

Dans le domaine de la redirection des lymphocytes T, il a été démontré que le blocage de

Les cellules cibles n'exprimant pas constitutivement PD-1 peuvent réguler positivement cette protéine immunosuppressive suite à l'ajout de BiTE. Sur la base de ces observations, la génération de protéines de fusion avec un noyau anti-CD33 BiTE combiné à un fragment d'anticorps bloquant PD-L1 (ou la partie extracellulaire de faible affinité de la protéine PD-1) a été générée<sup>21</sup>.

Les auteurs des travaux ont surnommé ces molécules des activateurs de lymphocytes T inhibiteurs de points de contrôle (CiTE). Cette étude a fourni une nouvelle stratégie élégante et prometteuse pour combiner le blocage des points de contrôle avec la redirection des cellules immunitaires.

Cependant, ces plateformes de conjugués à trois protéines n'incorporent pas de fragment Fc ou de fonctionnalité similaire prolongeant la demi-vie, et pourraient nécessiter d'autres approches pour améliorer la pharmacocinétique<sup>21</sup>.

De nombreux paramètres doivent également être pris en compte pour leur construction (par exemple, la cible du cancer, les affinités de liaison, la voie du point de contrôle immunitaire à moduler, les effets secondaires potentiels causés par l'activation des cellules immunitaires, la demi-vie, la pénétration tumorale et la fonction effectrice médiée par Fc ou son absence), de sorte que l'ajout de petites molécules pour moduler la fonction, fournir des capacités théranostiques ou simplement comme outils permettant de surveiller la biodistribution de ces espèces pourrait s'avérer bénéfique. Par conséquent, une méthode chimique modulaire qui peut produire rapidement des conjugués à partir d'un pool de composants pour les tests initiaux serait avantageuse<sup>5</sup>. De plus, peu de CiTE ont été décrits dans la littérature et il existe donc de nombreuses combinaisons d'inhibiteur de point de contrôle et de BiTE qui doivent encore être explorées. Parmi ceux-ci se trouve l'enzyme inhibitrice du point de contrôle (ST) sialidase (Sia), qui a été étudiée récemment en combinaison avec un ciblage médié par des anticorps<sup>25</sup>.

Ainsi, nous avons entrepris de développer une méthode chimique pour la fixation d'une protéine supplémentaire (inhibant le point de contrôle) à un noyau BiTE (Fig. 1c). La méthode développée a permis l'introduction d'une fonctionnalité de petite molécule dans ces constructions à trois protéines (sous la forme d'une molécule de biotine pour aider l'imagerie, dans ce cas). Ce travail explore donc la construction chimique bioorthogonale sans Cu de bsAbs fonctionnalisés, suivie de la génération de conjugués bsAb-enzyme fonctionnalisés et d'anticorps trispécifiques. Jusqu'à présent, à notre connaissance, seuls des complexes de type IgG composés de trois protéines différentes ont été assemblés par des moyens chimiques<sup>20</sup>. Enfin, pour mettre en valeur la fonctionnalité de ces constructions et pour démontrer qu'une caractéristique clé de la méthode décrite ici est sa modularité, des molécules CiTE fonctionnelles ont été générées. En plus d'un noyau BiTE anti-HER2/anti-CD3, ces constructions incorporaient soit un Fab anti-PD-1, soit une enzyme inhibitrice de point de contrôle (sialidase)<sup>25</sup>. Les activités biologiques de ceux-ci ont ensuite été explorées in vitro dans un test de co-culture entre des cellules cancéreuses et des lymphocytes T (Fig. 1d).

## Résultats et discussion

### Génération de construction chimique CiTE

Plusieurs méthodes ont été testées pour générer les CiTE à trois protéines souhaitées, comme décrit dans cet article et dans les informations supplémentaires. La stratégie initiale, reposant sur la conversion d'un bsAb-N3 en un bsAb-PDBr2 par un clic SPAAC avec une molécule de pyridazinedione fonctionnalisée par un alcyne contraint par un bicyclonoyne (BCN), suivie de l'ajout de Fab réduit ou de sialidase ST (exprimée avec une séquence d'acides aminés SLCTPSRGS à l'extrémité C pour introduire une cystéine accessible au solvant)<sup>25</sup> pour réagir avec la molécule de pyridazinedione sur le bsAb, rencontré un certain succès. Il était cependant difficile à reproduire en raison de réactions secondaires concurrentes, ce qui rendait le processus moins fiable. Nous discutons en détail de ces premiers résultats dans les informations supplémentaires. La méthode développée par la suite, qui sera détaillée ici, reposait sur la réaction SPIEDAC entre la tétrazine et l'alcyne contraint BCN pour obtenir toutes les liaisons protéine-protéine. Comme il a été précédemment démontré que cette réaction fonctionnait bien pour la formation bispécifique<sup>14</sup>, il a été envisagé qu'elle serait optimale pour l'installation de la troisième protéine (sialidase 6 ou FabPD-17).

Le plan impliquait donc initialement de générer une construction Fab-Fab bispécifique portant une poignée d'azote. Cette construction FabX-FabY-N3 serait

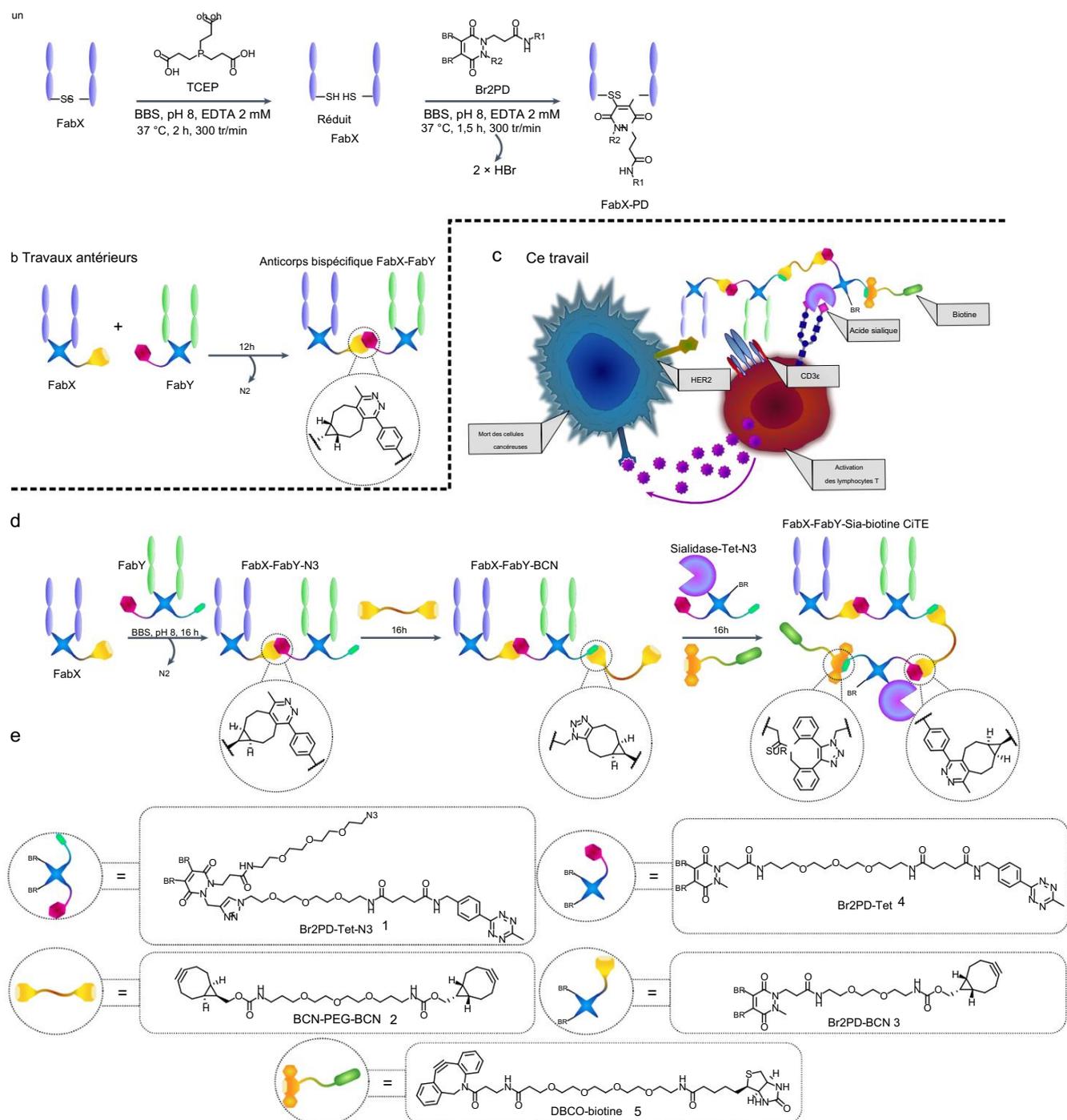


Fig. 1 | Génération de CITE et mécanisme biologique sous-jacent proposé.

a, La méthode à la pyridazinedione pour la génération de Fab fonctionnalisés. Le Fab est d'abord réduit avec du TCEP pour libérer les cystéines de la liaison disulfure interchaîne unique. Le Fab réduit est ensuite mis à réagir avec le Br2PD de choix, via un mécanisme d'addition-élimination par lequel les thiols déplacent séquentiellement chaque atome de Br pour générer une liaison covalente stable entre les chaînes lourdes et légères de la protéine. BBS, solution saline tamponnée au borate. b, La méthode précédemment développée pour la génération de bsAbs avec des pyridazinediones au moyen de la chimie de clic SPIEDAC. c, Mécanisme d'action proposé d'un CITE contenant une

La CITE se lie à une cellule cancéreuse cible via l'engagement HER2 et à une cellule T via le co-récepteur CD3, réticulant les deux cellules. L'enzyme sialidase élimine l'acide sialique des cellules cibles et effectrices (T) pour améliorer l'activation immunitaire, entraînant une cytotoxicité médiée par les cellules T plus puissante. La CITE est fonctionnalisée avec une molécule de biotine pour aider à l'imagerie et/ou à la purification. d, La méthode développée dans ce manuscrit pour la génération de trois constructions CITE de protéines fonctionnalisées. e, Les pyridazinediones et autres petites molécules utilisées dans ce travail (Br2PD-Tet-N3 1, BCN-PEG-BCN linker 2, Br2PD-BCN 3, Br2PD-Tet 4 et DBCO-biotine 5) pour la biotinylation des constructions.

puis être converti en FabX-FabY-BCN par réaction avec BCN-PEG-BCN 2 (en excès décuplé pour limiter la réticulation). Ce FabX – FabY – BCN pourrait ensuite être mis à réagir avec Sia – Tet – N38 ou FabPD-1 – Tet – N39 et DBCO – biotine 5 in situ, pour ajouter l'enzyme ou le troisième Fab (via tétrazine – clic BCN), et un

molécule de biotine (via un clic azide-DBCO) pour aider davantage à la purification ou à l'imagerie. La génération enzymatique des fragments Fab à partir des anticorps complets correspondants est discutée en détail dans les informations supplémentaires.

Initialement, FabHER2 – BCN 10 a été mis à réagir séquentiellement dans une réaction en un seul pot avec Sia – Tet – N3 8 et DBCO – biotine 5 (Fig. 2a) pour évaluer l'orthogonalité des clics tétrazine – BCN et DBCO – azide, ainsi que pour tester la stabilité de l'enzyme sialidase 6 dans les conditions de réaction. Comme l'enzyme s'est révélée précédemment sensible aux acides, la réaction de clic a été effectuée à pH 7 (PBS) au lieu de pH 5 (acétate). La réaction s'est bien déroulée, générant FabHER2–Sia–biotine 11 (Fig. 2b). Après la purification de l'agarose d'avidine monomère, nettoyez FabHER2–Sia–biotine 11 a été isolée (rendement de 21 %), la pureté étant confirmée par spectrométrie de masse par chromatographie liquide (LC-MS ; Fig. 2b) et électrophorèse sur gel de dodécylsulfate de sodium polyacrylamide (SDS–PAGE ; figure 2c). Les spectres LC-MS complets des constructions isolées discutées dans ce manuscrit sont fournis dans les informations supplémentaires. De plus, un bsAb FabHER2 – FabCD3 – biotine 12 BITE a été synthétisé (Fig. 2d). Initialement, FabHER2 – FabCD3 – N3 bsAb 13 (rendement de 24%) a été construit, puis, après purification par chromatographie d'exclusion de taille (SEC) (Fig. 2f), il a été mis à réagir avec DBCO – biotine pour donner la construction biotinylée FabHER2 – FabCD3 – biotine 12 (rendement de 100%). La pureté des constructions a été confirmée par SDS – PAGE (Fig. 2e) et LC-MS (Fig. 2g, h). Veuillez noter que les spectres MS pour toutes les constructions contenant FabCD3 contiennent un pic supplémentaire à ~ + 110 Da. Nous pensons que cela est dû à la papaine coupant mAbCD3 (OKT3) à chaque extrémité d'un résidu d'asparagine, conduisant à deux espèces de FabCD3. Ceci est expliqué plus en détail dans les informations supplémentaires. Comme cette variation se situe dans la région charnière, aucun impact sur l'affinité de liaison n'est attendu.

Comme le bsAb produit par cette méthode avait une poignée d'azide, il a dû être converti en tétrazine ou en BCN pour permettre à un clic tétrazine-BCN d'installer la protéine finale. De cette façon, nous pourrions nous assurer que toutes les étapes de fixation protéine-protéine seraient pilotées par le clic extrêmement rapide BCN-tétrazine IEDDA, qui s'est avéré être la meilleure réaction pour surmonter l'encombrement stérique qui rend difficile le couplage de si grosses molécules. À cette fin, la molécule 2 BCN – PEG – BCN a été synthétisée (des détails sont fournis dans les informations supplémentaires) pour permettre la conversion de bsAb – N3 en bsAb – BCN.

Pour tester la molécule BCN-PEG-BCN 2 et tenter la construction d'un bsAb doublement modifié avec une chimie du clic sans Cu, la synthèse de FabHER2-(biotine)-FabCD20-biotine 17 a été réalisée (Fig. 2i). FabHER2–Tet–N3 15 a été mis à réagir avec DBCO–biotine 5 suivi de BCN–PEG – BCN 2 séquentiellement, pour générer FabHER2 – (biotine) – BCN 18 (rendement de 63 %). Celui-ci a ensuite été mis à réagir avec FabCD20–Tet–N3 19 et DBCO– biotine 5 in situ pour donner FabHER2 – (biotine) – FabCD20 – biotine 17 (rendement de 14%) après purification SEC (Fig. 2j). La pureté de la construction a été évaluée par LC-MS (Fig. 2k). Environ 10 % FabHER2–(biotine)–FabHER2–biotine 20 a été observée, provenant d'une dimérisation indésirable lors de l'étape d'addition BCN – PEG – BCN 2 de la réaction. Cela pourrait être atténué en réduisant davantage la concentration de la réaction et en augmentant les équivalents de BCN-PEG-BCN 2. Malheureusement, la solubilité de BCN-PEG-BCN 2 dans l'eau était sous-optimale et nécessitait donc une surveillance attentive pour s'assurer que le composé ne précipitait pas hors de la solution. Ce n'est pas une limitation majeure lorsque de faibles équivalents sont

suffisants, mais dans ce cas où le contrôle d'une réaction secondaire concurrente dépend d'un large excès de la molécule, c'est un souci. Ici, deux molécules de biotine ont été installées dans la construction, mais comme elles ont été ajoutées à différentes étapes, deux molécules de cargaison distinctes auraient tout aussi bien pu être ajoutées. Ainsi, une méthode pour la double modification sans Cu d'un bsAb construit chimiquement a été développée.

Avec ces résultats préliminaires encourageants obtenus, la génération d'une espèce FabHER2–FabCD20–Sia–biotine 21 a été tentée (Fig. 3a). L'analyse SDS – PAGE a montré que la formation de bsAb s'était bien déroulée et, après la réaction de FabHER2 – FabCD20 – N3 22 avec BCN – PEG – BCN 2 (et l'excès de petite molécule retiré après 6 h), l'addition de Sia – Tet – N3 8 et de DBCO – biotine 5 a conduit à la consommation de FabHER2 – FabCD20 – BCN 23 et l'apparition d'une bande plus large (Fig. 3b). Fait intéressant, des conditions de dénaturation vigoureuses (95 °C, 5 min) ont été nécessaires pour augmenter la résolution du gel. La purification SEC a montré qu'une conversion > 80 % en la construction FabHER2 – FabCD20 – Sia – biotine 21 (rendement de 11 % à partir de FabHER2 – BCN 10) a été obtenue (Fig. 3c), ce qui était encourageant par rapport à la meilleure conversion précédente de < 50 % (comme détaillé dans les informations supplémentaires). Les analyses SDS – PAGE (Fig. 3d) et LC-MS (Fig. 3e) ont confirmé la pureté de l'échantillon.

Suite à ces résultats encourageants, la génération de FabHER2–FabCD3–Sia–biotine 24 a été tentée via la même stratégie. Malheureusement, dans ce cas, la formation bispécifique a également conduit à une quantité notable d'anticorps trispécifique FabHER2 – FabCD3 – FabHER2 indésirable 25, comme le montre SDS – PAGE (Fig. 3f). Bien que n'ayant pas d'impact sur les réactions ultérieures, car il est d'une taille similaire à FabHER2 – FabCD3 – Sia – biotine 24, la purification SEC ne serait pas en mesure de les séparer. Comme prévu, l'ajout de Sia – Tet – N3 8 et de DBCO – biotine 5 a entraîné une consommation substantielle de FabHER2 – FabCD3 – BCN 26 (Fig. 3f) et la purification SEC a confirmé une bonne conversion (~ 70%) de bsAb en produit 24 (Fig. 3g). L'analyse SDS – PAGE (Fig. 3h) et LC-MS (Fig. 3i) a confirmé la formation du produit, bien qu'avec environ 15% d'impureté FabHER2 – FabCD3 – FabHER2 25 résultant de l'étape de formation de bsAb de la réaction, comme discuté. Ce problème pourrait être atténué en contrôlant les équivalents de Fab pour minimiser la formation d'anticorps trispécifiques ou en augmentant la réaction et en purifiant le bsAb–N3 13 par SEC avant les réactions ultérieures. Alternativement, une approche de purification double avec la protéine A et la résine d'agarose d'avidine monomère pourrait être effectuée, ce qui ne devrait laisser que les espèces qui contiennent à la fois FabHER2 (se lie à la protéine A) et Sia-biotine (se lie à l'avidine).

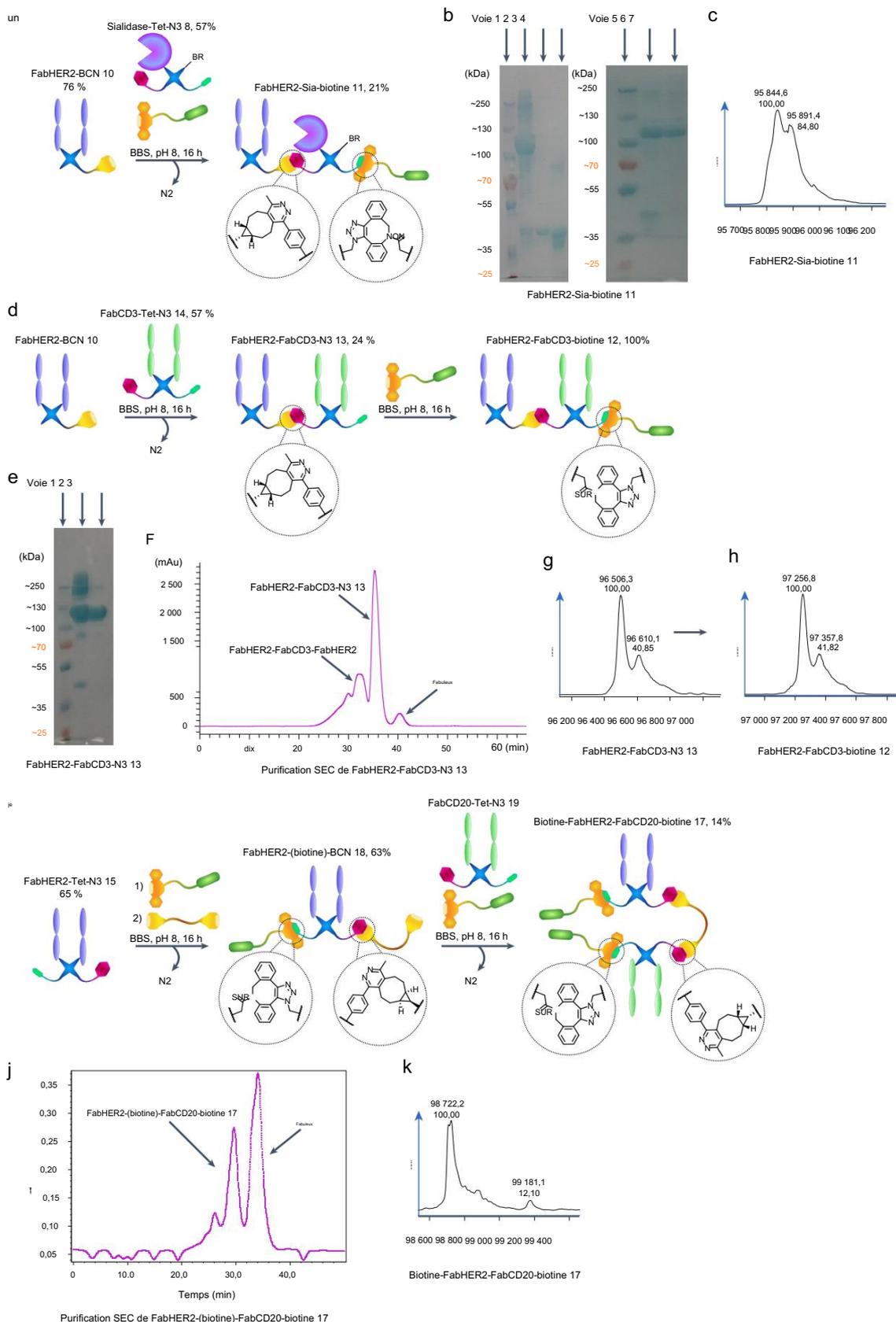
Pour résoudre les problèmes de pureté de la construction finale, la synthèse a été répétée, cette fois en utilisant FabHER2–FabCD3–N3 purifié par SEC 13 comme décrit ci-dessus (Fig. 2d – g). La portion de FabHER2–FabCD3–N3 13 qui n'était pas biotinylé auparavant était maintenant traité avec BCN–PEG–BCN 2 sur 6 h. Après élimination de la petite molécule en excès, la pureté de l'échantillon a été confirmée par LC-MS (Fig. 3l), puis Sia – Tet – N3 8 et DBCO – biotine 5 ont été ajoutés et le mélange a été incubé pendant 20 h à 22 ° C. Après ce temps, l'échantillon a été purifié par SEC (Fig. 3j) et ensuite la pureté a été confirmée par analyse LC-MS (Fig. 3m). Heureusement, un FabHER2–FabCD3–Sia–biotine 24 propre (rendement de 20 % à partir de bsAb–N3 13) a été obtenu.

Fig. 2 | Génération de bsAbs biotinylés et du conjugué FabHER2-sialidase 11 avec des pyridazinones. a, Génération de FabHER2–Sia–biotine 11. FabHER2–BCN 10 a été mis à réagir avec Sia–Tet–N3 8 et DBCO–biotine 5 pour générer FabHER2–Sia–biotine 11 après purification d'avidine agarose monomère. b, analyse SDS–PAGE de FabHER2–Sia–biotine 11. Pistes 1 et 5 : échelle. Piste 2 : FabHER2 brut – Sia – biotine 11. Piste 3 : FabHER2. Voie 4 : Sia–Tet–N3 8. Piste 6 : fraction non liée de purification d'avidine agarose monomère. Piste 7 : fraction liée de purification ; FabHER2–Sia–biotine 11. c, analyse LC-MS de FabHER2–Sia–biotine 11. Masse attendue : 95 873 Da. Masse observée : 95 845 Da et 95 891 Da ( $\Delta = 46$  Da, acide formique, adduit MS). d, Génération de FabHER2 – FabCD3 – biotine 12. FabHER2 – BCN 10 a été mis à réagir avec FabCD3 – Tet – N3 14 pour former FabHER2 – FabCD3 – N3 13. Cette construction a ensuite été mise à réagir avec DBCO – biotine 5 pour générer FabHER2 – FabCD3 – biotine 12 après purification SEC. e, analyse SDS-PAGE de FabHER2-FabCD3-N3 13. Piste 1 : échelle. Piste 2 : FabHER2 brut–FabCD3–N3 13. Piste 3 : FabHER2–FabCD3–N3 purifié 13. f, Ultraviolet

trace de purification SEC de FabHER2–FabCD3–N3 13. g, analyse LC-MS de FabHER2–FabCD3–N3 13. Masse attendue : 96 496 Da. Masse observée : 96 506 Da. h, analyse LC-MS de FabHER2–FabCD3–biotine 12. Masse attendue : 97 246 Da. Masse observée : 97 257 Da. i, Génération de FabHER2–(biotine)–FabCD20–biotine 17. FabHER2–Tet–N3 15 a été mis à réagir avec DBCO–biotine 5 pendant 1 h pour donner FabHER2–Tet–biotine 16, suivi de l'ajout in situ de BCN–PEG–BCN 2 pour générer FabHER2–(biotine)–BCN 18 pendant encore 15 h. Après élimination de la petite molécule en excès, celle-ci a été mise à réagir avec FabCD20–Tet–N3 19 et DBCO–biotine 5 in situ pour générer FabHER2–(biotine)–FabCD20–biotine 17 après purification SEC. j, trace UV de purification SEC de FabHER2–(biotine)–FabCD20–biotine 17. k, analyse LC-MS de FabHER2–(biotine)–FabCD20–biotine 17. Masse attendue : 98 734 Da. Masse observée : 98 722 Da et 99 181 Da (biotine–FabHER2–FabHER2–biotine 20, masse attendue : 99 193 Da). La génération de la plupart des conjugués Fab a été effectuée deux ou trois fois, donnant des résultats similaires. Sauf indication contraire, chaque construction protéine-protéine a été générée une seule fois.

Pour démontrer davantage la modularité de l'approche de conjugaison à trois protéines développée ici et pour générer une construction utile supplémentaire, la synthèse d'un FabCD3 – FabHER2 – FabPD-1 – biotine CITE 27 a été tentée (Fig. 4a). La synthèse d'un bsAb 28 FabCD3–FabHER2–N3

effectué comme avant, bien qu'avec les positions des bras FabCD3 et FabHER2 perméutées pour montrer la flexibilité de la stratégie et étudier l'effet du placement Fab dans la construction sur la fonction biologique. Après purification SEC (Fig. 4b), la pureté du



la construction a été déterminée au moyen d'une analyse SDS – PAGE (Fig. 4d) et LC-MS (Fig. 4e). Le bsAb – N328 a été converti en FabCD3 – FabHER2 – BCN 29 avec BCN – PEG – BCN 2, comme auparavant (Fig. 4f). Après élimination de la petite molécule, FabPD-1 – Tet – N3 9 (Fig. 4g) et DBCO – biotine 5 ont été ajoutés pour former FabCD3 – FabHER2 – FabPD-1 – biotine CITE 27 après purification SEC (rendement de 12% à partir de bsAb – N3 28, Fig. 4c). La pureté de la construction a été analysée via SDS – PAGE (Fig. 4d) et LC-MS (Fig. 4h). L'analyse SDS – PAGE a montré une bande supplémentaire plus faible sous la bande principale, et le spectre LC-MS (voir Informations supplémentaires pour le spectre complet) contenait des pics supplémentaires à des masses inférieures dans les données brutes, en plus de l'enveloppe de masse attendue. Cependant, le spectre déconvolué montrait principalement les masses attendues (avec les trois pics principaux résultant des variations d'un acide aminé dans les Fab précurseurs, comme indiqué dans les informations supplémentaires). Comme la LC-MS suggère qu'il n'y a pas d'autres espèces majeures dans la gamme 100-150 kDa, nous proposons provisoirement que la bande supplémentaire dans le SDS-PAGE pourrait être due à une dénaturation incomplète de la construction ou à un autre artefact dérivé de SDS-PAGE. Les données brutes LC-MS montrent certaines espèces de contaminants plus petites, bien que celles-ci puissent être surreprésentées car les protéines plus grosses (telles que CITE 27) ont tendance à s'ioniser plus mal que les protéines plus petites dans des conditions LC-MS. Ceci est en outre corroboré par le SDS – PAGE, qui ne montre que des bandes très mineures à un faible poids moléculaire (Fig. 4d). De plus, la trace UV SEC de la purification suggère également un produit relativement homogène en taille, car le pic correspondant est étroit, sans épaulements visibles (Fig. 4c). Cependant, il faut noter que nous ne pouvons pas affirmer avec confiance que CITE 27 est complètement pur. Nous avons cependant démontré que la méthode peut produire des produits complètement purs, comme on le voit dans le cas de CITE 24. Comme il s'agit d'un travail de preuve de concept, nous nous sommes concentrés sur une publication rapide même avec les mises en garde relatives à la pureté de CITE 27.

### Évaluation biologique des constructions CITE

Une fois les constructions CITE préparées, leur activité biologique a été évaluée. Initialement, la liaison de FabHER2 – FabCD3 – Sia – biotine CITE 24 (notez que pour tous les tests biologiques, du CITE 24 pur a été utilisé) aux cellules cancéreuses HER2 + (SKBR3, HCC1954, BT-20) a été mesurée par cytométrie en flux et s'est avérée non significativement différente de la liaison de FabHER2 – FabCD3 – bio étain BiTE 12 à ces cellules (Fig. 5b). Ensuite, le test de liaison a été répété sur les lymphocytes T, et il a été montré ici que la liaison CD3 de CITE 24 était significativement inférieure à celle de BiTE 12 (Fig. 5c). Nous postulons que cela peut être dû au placement du fragment FabCD3, car il est pris en sandwich entre les deux autres composants protéiques. Cette liaison réduite n'est cependant pas nécessairement un inconvénient. En fait, une liaison plus faible aux cellules T par rapport aux cellules cibles HER2+ pourrait conduire à une meilleure spécificité et localisation de la tumeur, et donc à une activation immunitaire systémique moindre, réduisant le risque d'effets secondaires associés tels que le syndrome de libération de cytokines<sup>27</sup>. Il a ainsi été établi que les deux composants Fab de CITE 24 conservaient

leur activité biologique (en ce qui concerne la liaison), donc ensuite l'activité du composant enzymatique sialidase a été étudiée. Les cellules T ou les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) ont été incubées avec CITE 24 et BiTE 12, et la teneur en acide sialique de la surface cellulaire a été mesurée. Bien que BiTE 12, comme prévu, n'ait montré aucune activité de sialidase (car il manque l'enzyme), CITE 24 a montré une désialylation significative, l'activité sur les lymphocytes T étant supérieure d'un ordre de grandeur à la désialylation hors cible sur d'autres PBMC (n'exprimant pas CD3; Fig. 5d, e). Il est à noter que la visualisation de la liaison de CITE 24 et BiTE 12 a été réalisée par incubation avec un conjugué streptavidine Alexa Fluor 647, confirmant ainsi également que la molécule de biotine attachée aux constructions a conservé sa liaison à la streptavidine, et montrant pourquoi la capacité de la méthode de fonctionnalisation de ces constructions protéine-protéine est bénéfique. La désialylation de lignées cellulaires de cancer du sein (HCC1954, BT-20, MDA-MB-468 et SKBR3) par CITE 24 a ensuite été étudiée (Fig. 5f). BiTE 12 ne présentait à nouveau aucune activité, alors que la désialylation par CITE 24 dépendait de l'expression de HER2, car les cellules HER2hi (HCC1954 et SKBR3) étaient désialylées à des concentrations plus faibles que les cellules HER2lo (BT-20, MDA-MB-468). Les composants de CITE 24 (FabHER2, FabCD3, ST sialidase) ont ainsi tous conservé leur activité biologique pertinente, malgré les nombreuses transformations enzymatiques et chimiques réalisées lors de l'assemblage de la construction.

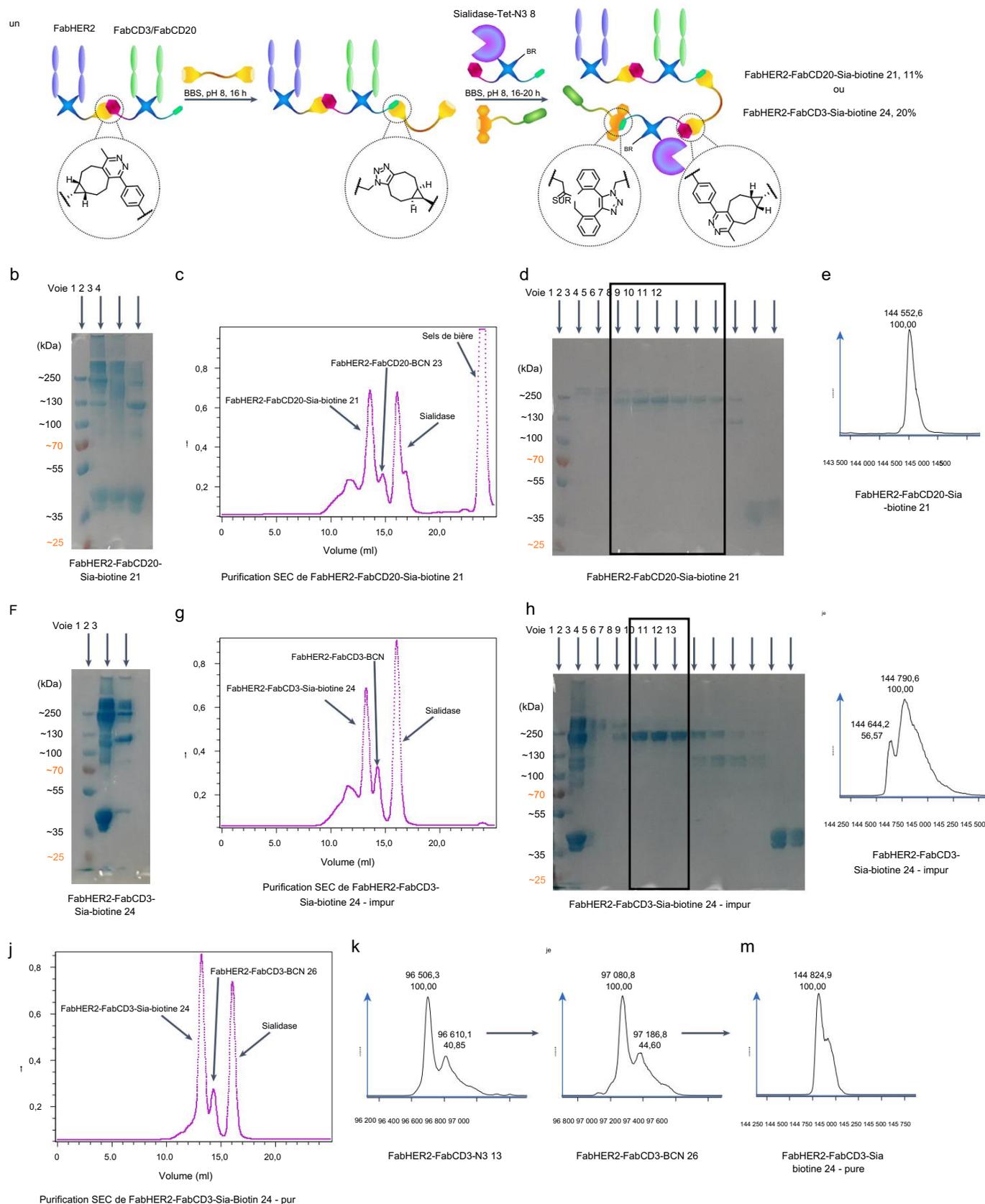
Ce test de composants a ensuite été réalisé sur FabCD3– FabHER2 – FabPD-1 – biotine CITE 27. Bien que CITE 27 ait montré une liaison aux cellules cibles HER2 + (SKBR3), elle était significativement plus faible que celle de FabHER2 – FabCD3 – biotine BiTE 12, corroborant la théorie selon laquelle le Fab pris en sandwich au milieu de la construction a une force de liaison plus faible, probablement en raison de l'encombrement stérique des deux autres protéines de chaque côté (Fig. 5g). Certes, une liaison cible plus faible n'est pas souhaitable dans ce cas, donc, à l'avenir, un CITE FabHER2 – FabCD3 – FabPD-1 – biotine serait un meilleur candidat, avec une liaison HER2 plus élevée mais la liaison CD3 inférieure (et bénéfique) mentionnée ci-dessus. De plus, un FabPD-L1 serait également un moyen plus approprié de cibler le point de contrôle PD-1/PD-L1, car PD-L1 est exprimé sur les cellules cibles et PD-1 sur les cellules effectrices; idéalement, la liaison des cellules effectrices ne se produirait que dans l'environnement tumoral. Malheureusement, nos efforts pour obtenir un Fab PD-L1 propre ont été infructueux, c'est pourquoi FabPD-1 était notre protéine de choix. La liaison de CITE 27 aux cellules T a également été comparée à celle de BiTE 12, et il a été constaté que CITE 27 liait les cellules T de manière significativement plus faible à des concentrations plus élevées que BiTE 12 (Fig. 5h). Cependant, cette diminution de la liaison aux lymphocytes T était nettement moins prononcée que dans le cas de CITE 24. Cette augmentation de la liaison aux lymphocytes T de CITE 27 par rapport à CITE 24 peut être due à la liaison de PD-1, ou au changement de connectivité (FabCD3 étant maintenant à l'extérieur de la construction plutôt qu'au milieu) ou une combinaison des deux. En effet, pour étudier la liaison PD-1 de CITE 27, les cellules T ont été pré-incubées avec des mAb anti-CD3, suivies d'une incubation avec des concentrations variables de CITE 27 ou de BiTE 12 (Fig. 5i). Le

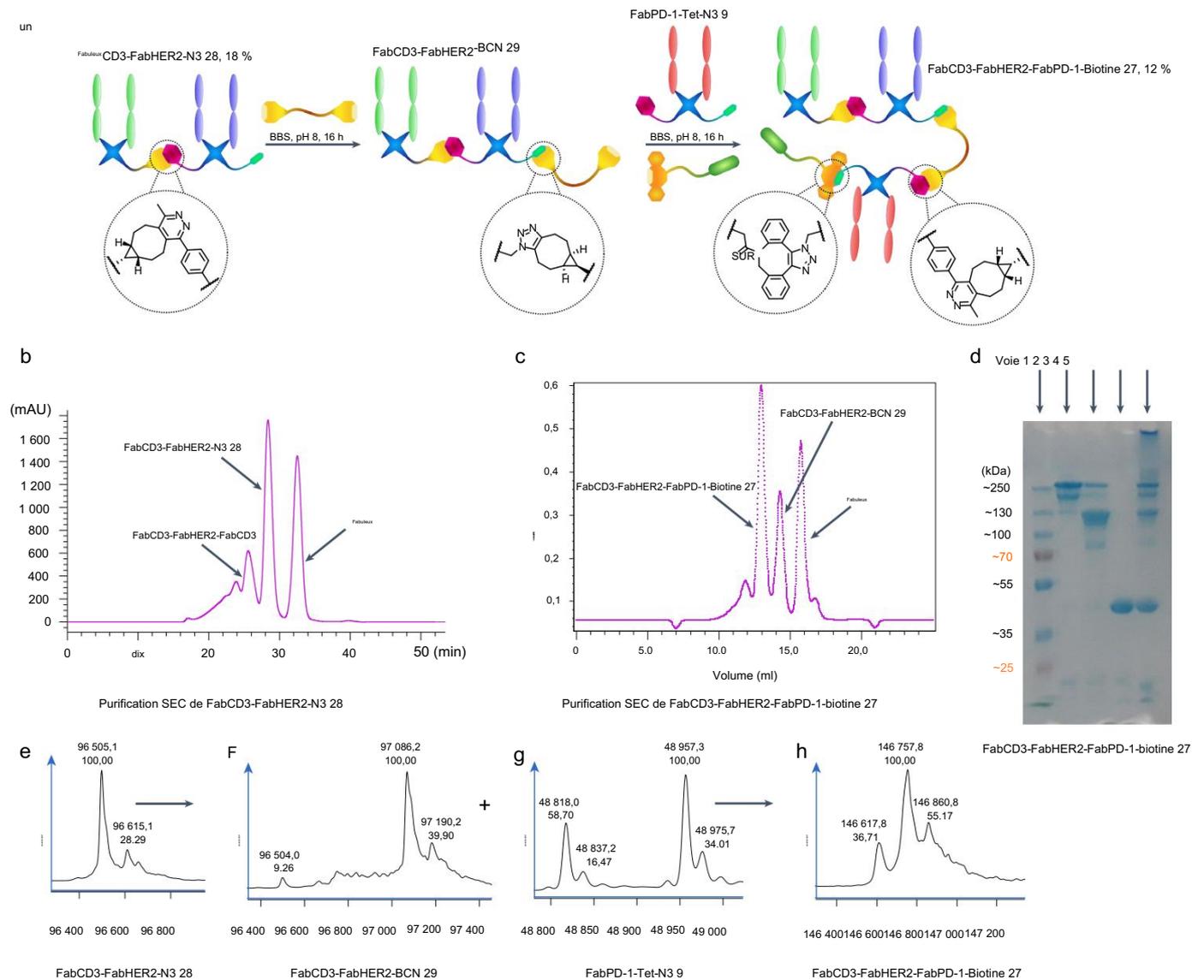
Fig. 3 | Synthèse de conjugués bsAb–Sia : FabHER2–FabCD20–Sia–biotine 21 et FabHER2–FabCD3–Sia–biotine CITE 24. a, Méthode de synthèse de conjugués bsAb–Sia. FabX–FabY–N3 est préparé comme indiqué précédemment. Celui-ci est ensuite soit purifié par SEC (pour une pureté finale maximale) soit avancé sans purification pour être mis à réagir avec BCN – PEG – BCN 2 pour générer FabX – FabY – BCN. Sia – Tet – N38 et DBCO – biotine 5 sont ensuite ajoutés et mis à réagir in situ pour former FabX – FabY – Sia – biotine, qui est ensuite isolé après purification SEC. b, SDS–PAGE de FabHER2–FabCD20–Formation de Sia–biotine 21. Couloir 1 : échelle. Piste 2 : FabHER2–FabCD20–Sia–biotine 21 chauffé à 95 °C pendant 5 min. Piste 3 : FabHER2–FabCD20–Sia–biotine 21 non chauffé. Piste 4 : FabHER2–FabCD20–N3 22 + Sia–Tet–N38 (aucun BCN–PEG–BCN 2 n'a été ajouté, donc aucune réaction n'a été possible). c, trace UV de purification SEC de FabHER2–FabCD20–Sia–biotine 21. d, SDS–PAGE de la purification SEC de FabHER2–FabCD20–Sia–biotine 21. Couloir 1 : échelle. Pistes 2–3 : agrégats. Pistes 4–9 : FabHER2–FabCD20–Sia–biotine 21. Piste 10 : FabHER2–FabCD20–BCN 23. Pistes 11–12 : Sia–Tet–N38. e, analyse LC-MS de FabHER2–FabCD20–Sia–biotine 21. Masse attendue : 144 532 Da. Masse observée : 144 553 Da. f, SDS–PAGE de la formation de FabHER2–FabCD3–Sia–biotine CITE 24. Couloir 1 : échelle. Piste 2 : FabHER2 brut – FabCD3–Sia–biotine CITE 24. Piste 3 : FabHER2 – brut

FabCD3 – N3 13. g, trace UV de la purification SEC de FabHER2 – FabCD3 – Sia – biotine CITE 24. h, SDS – PAGE de la purification SEC de FabHER2 – FabCD3 – Sia – biotine CITE 24. Piste 1 : échelle. Piste 2 : FabHER2 brut – FabCD3 – Sia – biotine 24. Pistes 3–4 : agrégats. Voies 5 à 7 : FabHER2 purifié – FabCD3–Sia–biotine CITE 24 (+ FabHER2–FabCD3–FabHER2 25 impureté). Pistes 8–11 : FabHER2–FabCD3–N3 13. Pistes 12–13 : Sia–Tet–N38. i, analyse LC-MS de FabHER2–FabCD3–Sia–biotine CITE 24 impur. Masse attendue : 144 799 Da. Masse observée : 144 791 et 144 644 Da (FabHER2–FabCD3–FabHER2 anticorps trispécifique 25 impureté, masse attendue : 144 632 Da). j, trace UV de la purification par SEC de FabHER2 – FabCD3 – Sia – biotine CITE 24 générée à partir de FabHER2 – FabCD3 – N3 purifié par SEC 13. k, analyse LC-MS de FabHER2 – FabCD3 – N3 13. Masse attendue : 96 493 Da. Masse observée : 96 506 Da. l, analyse LC-MS de FabHER2–FabCD3–BCN 26. Masse attendue : 97 065 Da. Masse observée : 97 081 Da. m, analyse LC-MS de FabHER2–FabCD3–Sia–biotine CITE 24 pure. Masse attendue : 144 799 Da. Masse observée : 144 825 Da. La génération de la plupart des conjugués Fab a été effectuée deux ou trois fois, donnant des résultats similaires. Sauf indication contraire, chaque construction protéine-protéine a été générée une seule fois.

la liaison de BiTE 12 a clairement diminué comparativement et s'est avérée significativement inférieure à celle de CITE 27 dans ces conditions, ce qui suggère que FabCD3 – FabHER2 – FabPD-1 – biotine CITE 27 était en effet capable de se lier à PD-1. Là encore, toutes les études de liaison ont été réalisées à l'aide d'une

streptavidine marquée par un colorant, montrant que la molécule de biotine attachée à CITE 27 offrait un avantage important pour la facilité d'analyse. Les composants de CITE 27 (FabHER2, FabCD3 et FabPD-1) ont donc également une activité de liaison, au moins dans une certaine mesure.



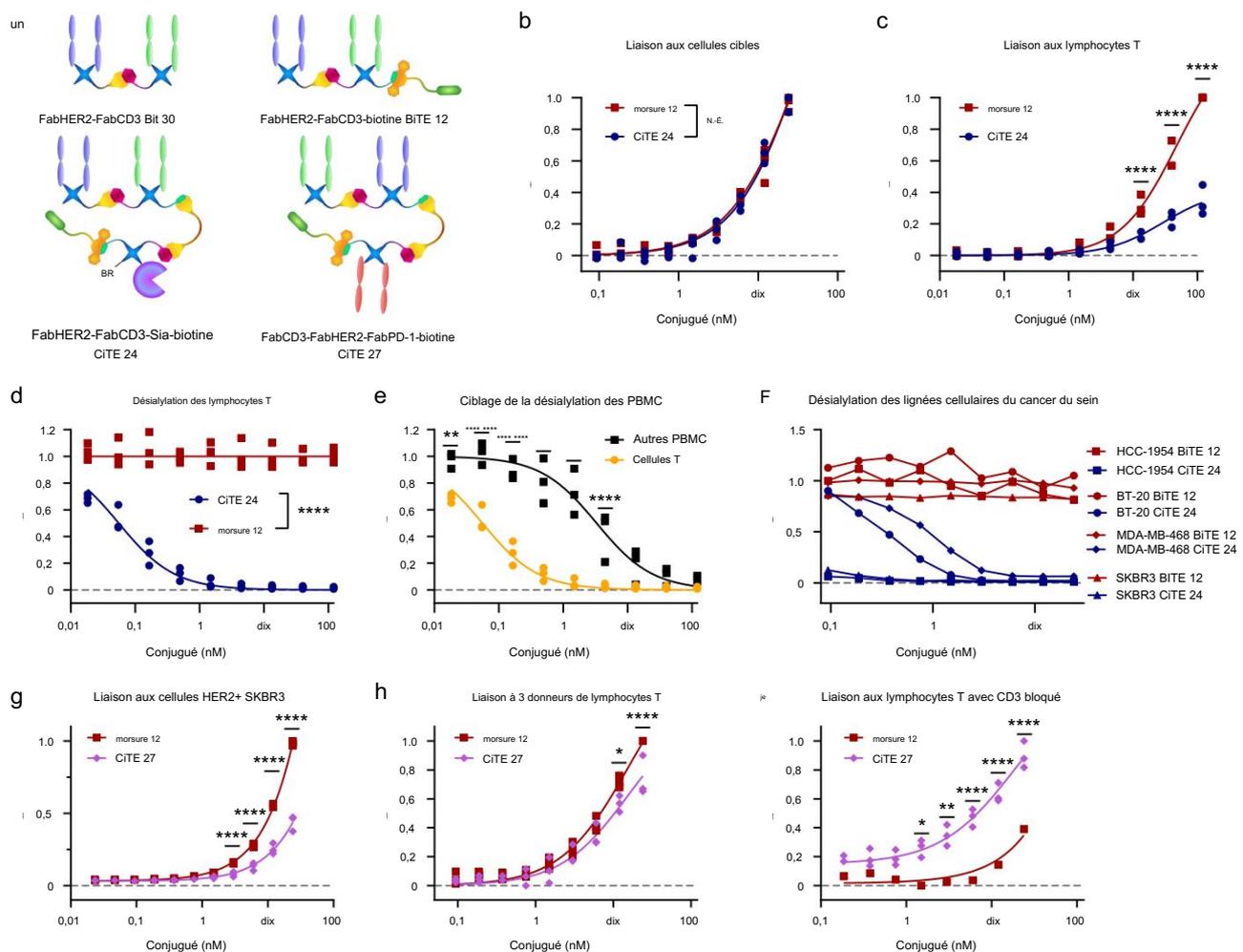


**Fig. 4 | Synthèse de FabCD3-FabHER2-FabPD-1-biotin CITE 27.** a, Méthode de synthèse de FabCD3-FabHER2-FabPD-1-biotin CITE 27. FabCD3-FabHER2-N3 28 a été préparé comme indiqué précédemment. Celui-ci a ensuite été purifié par SEC et mis à réagir avec BCN-PEG-BCN 2 pour générer FabCD3-FabHER2-BCN 29. FabPD-1-Tet-N39 et DBCO-biotin 5 ont ensuite été ajoutés et mis à réagir in situ pour former FabCD3-FabHER2-FabPD-1-biotin CITE 27, qui a ensuite été isolée après purification SEC. b, trace UV de purification SEC de FabCD3-FabHER2-N3 28. c, trace UV de purification SEC de FabCD3-FabHER2-FabPD-1-biotin CITE 27. d, analyse SDS-PAGE de FabCD3-FabHER2-FabPD-1-biotin CITE 27. Pistes 1 à 5 : échelle. Pistes 1 : FabCD3-FabHER2-FabPD-1-biotin CITE 27 purifié. Pistes 2 : bsAb restant (FabCD3-FabHER2-BCN 29) après SEC. Ligne 3 : Fab restant (FabPD-1-Tet-N39) après SEC. Ligne 4 : FabCD3-FabHER2-FabPD-1-biotin CITE 27 brut

réaction de formation. e, analyse LC-MS de FabCD3-FabHER2-N3 28. Masse attendue : 96 496 Da et 96 610 Da. Masse observée : 96 505 Da et 96 615 Da. f, analyse LC-MS de FabCD3-FabHER2-BCN 29. Masse attendue : 97 068 Da et 97 182 Da. Masse observée : 97 086 et 97 190 Da. g, analyse LC-MS de FabPD-1-Tet-N39. Masse attendue : 48 820 Da et 48 959 Da. Masse observée : 48 818 Da et 48 957 Da. h, analyse LC-MS de FabCD3-FabHER2-FabPD-1-biotin CITE 27. Masse attendue : 146 610 Da, 146 749 Da et 146 858 Da. Masse observée : 146 618 Da, 146 758 Da et 146 861 Da. La génération de la plupart des conjugués Fab a été effectuée deux ou trois fois, donnant des résultats similaires. Sauf indication contraire, chaque construction protéine-protéine a été générée une seule fois.

Enfin, un test de destruction cellulaire de co-culture de cellules T / HER2 + MDA-MB-231 a été effectué pour observer si une augmentation de l'efficacité peut être attribuée aux molécules CiTE par rapport à une BiTE conventionnelle. Les constructions devaient se lier au récepteur HER2 sur les cellules cibles et au récepteur CD3 sur les cellules T (comme indiqué ci-dessus), redirigeant les cellules immunitaires et entraînant une cytotoxicité médiée par les cellules T et la mort des cellules cibles. En outre, l'effet des modalités inhibitrices du point de contrôle des CiTE (enzyme sialidase et FabPD-1, respectivement) pourrait être étudié, c'est-à-dire si les CiTE présentent une cytotoxicité accrue en raison de l'activation accrue des lymphocytes T favorisée par l'inhibition du point de contrôle.

Ici, un FabHER2-FabCD3 BiTE 30 non biotinylé (les informations supplémentaires fournissent des détails sur la synthèse) a été utilisé pour conserver le FabHER2-FabCD3-biotin BiTE 12 biotinylé pour des études où la biotine serait importante pour la visualisation de la liaison. Les cellules HER2 + MDA-MB-231 ont été soit non traitées, soit incubées avec de l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) pour induire l'expression de PD-L1. Elles ont ensuite été co-cultivées avec des lymphocytes T (rapport effecteur:cible (E:T) de 2:1) et incubées avec une gamme de concentrations de FabHER2-FabCD3 BiTE 30, FabHER2-FabCD3-Sia-biotin CITE 24 ou FabCD3-FabHER2-FabPD-1-biotin CITE 27. tendance, a montré une plus grande cytotoxicité que BiTE 30 dans la plage de concentration de 0,01 à 1 nM (Fig. 6b, c). Ce



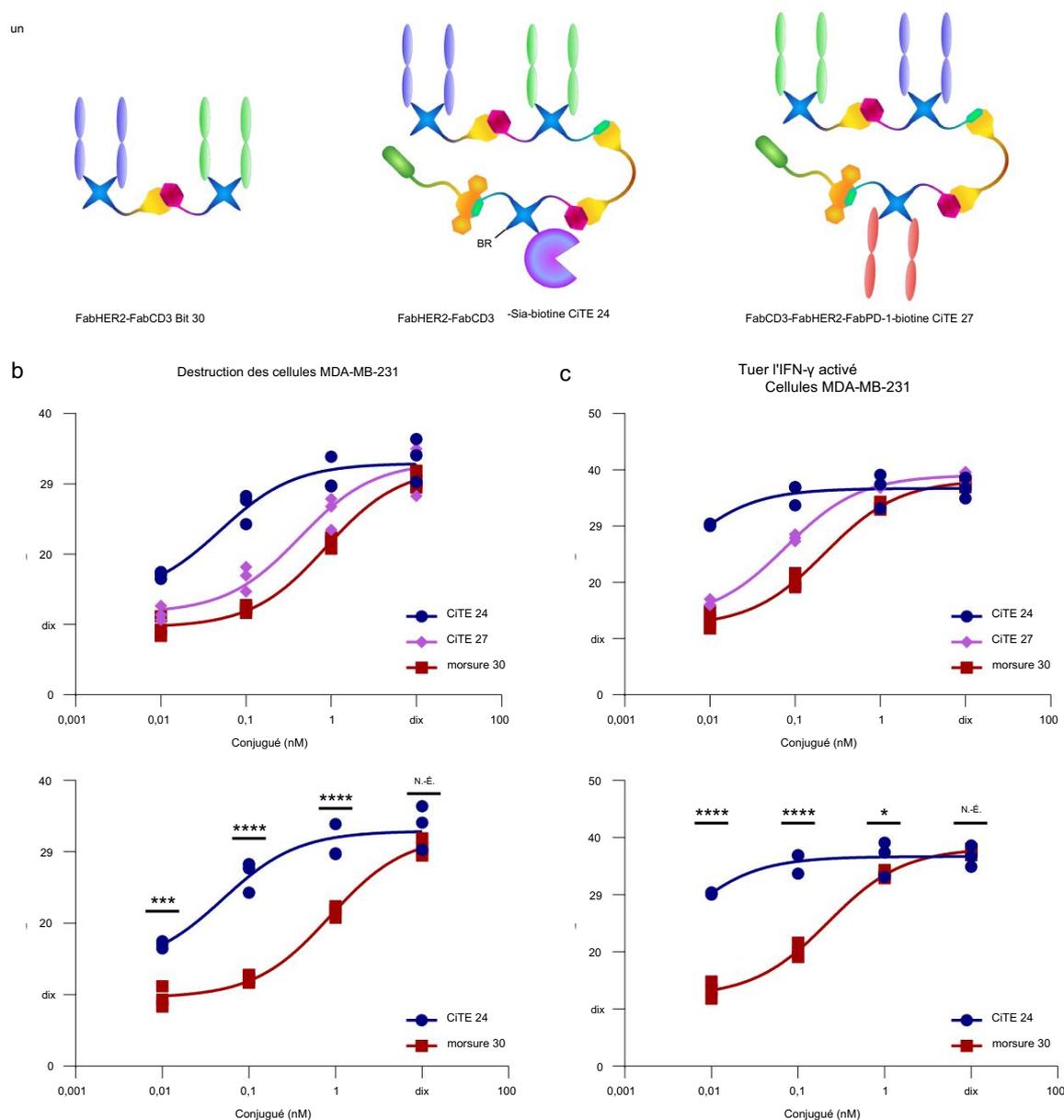
**Fig. 5 | Test biologique des constructions CITE 24 et 27.** a, Structures des constructions utilisées dans le test. b, Liaison de FabHER2–FabCD3–Sia–biotine CITE 24 et FabHER2 – FabCD3 – biotine BiTE 12 aux lignées cellulaires cancéreuses HER2 + (SKBR3, HCC1954, BT-20) détectées par cytométrie en flux, normalisées à la liaison maximale. NS, non significatif. c, Liaison de FabHER2–FabCD3–Sia–biotine CITE 24 et FabHER2–FabCD3–biotine BiTE 12 aux lymphocytes T de trois donneurs détectés par cytométrie en flux, normalisés à la liaison maximale pour chaque donneur. d, désialylation des cellules T de trois donneurs par FabHER2 – FabCD3 – Sia – biotine CITE 24 et FabHER2 – FabCD3 – biotine BiTE 12, normalisées à non traitées. e, Désialylation des lymphocytes T et des PBMC de trois donneurs par FabHER2 – FabCD3 – Sia – biotine CITE 24, normalisée à non traitée. f, désialylation des cellules cancéreuses par FabHER2 – FabCD3 – Sia – biotine CITE 24, normalisée à non traitée. g, Liaison de FabCD3–FabHER2–FabPD-1–biotine CITE 27 et FabHER2–FabCD3–biotine BiTE 12 à la lignée cellulaire cancéreuse HER2+ SKBR3 détectée par cytométrie en flux, normalisée à la liaison maximale. h, Liaison de FabCD3–FabHER2–FabPD-1–biotine CITE 27 et FabHER2–FabCD3–biotine BiTE 12 aux lymphocytes T de trois donneurs détectés par cytométrie en flux, normalisés à la liaison maximale pour chaque donneur. i, Liaison de FabCD3–FabHER2–FabPD-1–biotine CITE 27 et FabHER2–FabCD3–biotine BiTE 12 aux lymphocytes T d'un donneur, après blocage de CD3, détecté par cytométrie en flux, normalisé à la liaison maximale. Les données sont représentées sous forme de points de données individuels à partir de trois répétitions (sauf dans f et pour la liaison BiTE 12 dans i, qui sont des points de données uniques sans répétitions). L'analyse statistique a été réalisée avec une analyse de variance à deux voies (ANOVA) suivie d'un test de comparaisons multiples de Šidák post hoc avec des valeurs P ajustées en fonction de la multiplicité avec  $\alpha = 0,05$ . \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ . Pour a et c, les différences étaient non significatives et significatives (\*\*\*\*) à toutes les concentrations, respectivement. Les courbes sont

équipées d'une régression non linéaire avec les modèles suivants : un site – liaison spécifique (b,c,h) ; [Inhibiteur] versus réponse (trois paramètres) (d,e) ; [Agoniste] versus réponse (trois paramètres) (g, i). Liste des valeurs P pour CITE 24 versus BiTE 12 en b : 0,9985 (à 0,094 nM), >0,9999 (à 0,188 nM), 0,9860 (à 0,375 nM), >0,9999 (à 0,75 nM), 0,9316 (à 1,5 nM), >0,9999 (à 3 nM), 0,9303 (à 6 nM), 0,6189 (à 12 nM) et >0,9999 (à 24 nM). Liste des valeurs P pour CITE 24 versus BiTE 12 en c : >0,9999 (à 0,018 nM), >0,9999 (à 0,055 nM), >0,9999 (à 0,165 nM), >0,9999 (à 0,494 nM), 0,9936 (à 1,48 nM), >0,2870 (à 4,44 nM), <0,0001 (à 13,3 nM), <0,0001 (à 40 nM) et <0,0001 (à 120 nM). Liste des valeurs P pour CITE 24 versus BiTE 12 en d : <0,0001 (à 0,018 nM), <0,0001 (à 0,055 nM), <0,0001 (à 0,165 nM), <0,0001 (à 0,494 nM), <0,0001 (à 1,48 nM), <0,0001 (à 4,44 nM), <0,0001 (à 13,3 nM), <0,0001 (à 40 nM) et <0,0001 (à 120 nM). Liste de P

valeurs pour la cellule T par rapport aux PBMC dans e : 0,0044 (à 0,018 nM), <0,0001 (à 0,055 nM), <0,0001 (à 0,165 nM), <0,0001 (à 0,494 nM), <0,0001 (à 1,48 nM), <0,0001 (à 4,44 nM), 0,2744 (à 13,3 nM), 0,9392 (à 40 nM) et 0,9959 (à 120 nM). Liste des valeurs P pour CITE 27 versus BiTE 12 en g : >0,9999 (à 0,023 nM), >0,9999 (à 0,047 nM), >0,9999 (à 0,094 nM), >0,9999 (à 0,188 nM), 0,9982 (à 0,375 nM), 0,7945 (à 0,75 nM), 0,1950 (à 1,5 nM), <0,0001 (à 3 nM), <0,0001 (à 6 nM), <0,0001 (à 12 nM) et <0,0001 (à 24 nM). Liste des valeurs P pour CITE 27 versus BiTE 12 en h : >0,9999 (à 0 nM), >0,9999 (à 0,094 nM), 0,9991 (à 0,188 nM), 0,9998 (à 0,375 nM), 0,9987 (à 0,75 nM), 0,9756 (à 1,5 nM), 0,9834 (à 3 nM), 0,5546 (à 6 nM), 0,0116 (à 12 nM) et <0,0001 (à 24 nM). Liste des valeurs P pour CITE 27 versus BiTE 12 en i : 0,9123 (à 0 nM), 0,6874 (à 0,188 nM), 0,8176 (à 0,375 nM), 0,3741 (à 0,75 nM), 0,0169 (à 1,5 nM), 0,0028 (à 3 nM), <0,0001 (à 6 nM), <0,0001 (à 12 nM) et <0,0001 (à 24 nM).

l'augmentation de l'efficacité est conforme aux résultats de l'anti-CD33/anti-CD3/PD-1ex CITE21 d'ingénierie rapporté précédemment. Une autre tendance générale était la cytotoxicité plus élevée observée dans le cas des cellules MDA-MB-231 traitées à l'IFN- $\gamma$ .

Le CITE 27 bloquant PD-1 était légèrement plus puissant à des concentrations plus faibles que le BiTE 30, en particulier lorsque les cellules MDA-MB-231 étaient traitées avec de l'IFN- $\gamma$  pour induire l'expression de PD-L1 (informations supplémentaires). Cependant, CITE 24 contenant de la sialidase était significativement



**Fig. 6 |** Test de cytotoxicité de FabHER2–FabCD3–Sia–biotine CiTE 24 et FabCD3–FabHER2–FabPD-1–biotine CITE 27. **a**, Structures des constructions utilisées dans le test. **b**, Test de cytotoxicité de FabHER2–FabCD3–Sia–biotine CiTE 24 et FabCD3–FabHER2–FabPD-1–biotine CITE 27. Des cellules MDA-MB-231 ont été co-cultivées avec des cellules T d'un seul donneur (rapport E:T de 2:1) et traitées avec 0,01–10 nM CITE 24, CITE 27 ou BITE 30. La viabilité de MDA-MB-231 a été évaluée 24 h après le traitement par dosage de la lactate déshydrogénase (LDH). **c**, Test de cytotoxicité de FabHER2–FabCD3–Sia–biotine CITE 24 et FabCD3–FabHER2–FabPD-1–biotine CITE 27. Des cellules MDA-MB-231, pré-incubées avec de l'IFN- $\gamma$  pour induire l'expression de PD-L1, ont été co-cultivées avec des cellules T d'un seul donneur (rapport E:T de 2:1) et traitées avec 0,01–10 nM de CITE 24, CITE 27 ou BITE 30. La viabilité du MDA-MB-231 a été évaluée 24 h après le traitement via

Dosage LDH. L'analyse statistique a été réalisée avec une ANOVA à deux voies suivie d'un test de comparaisons multiples de Tukey post hoc avec des valeurs P ajustées en multiplicité avec  $\alpha = 0,05$ . \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ . Liste des valeurs P pour CITE 24 versus BITE 30 en **b** : 0,0004 (à 0,01 nM), <0,0001 (à 0,1 nM), <0,0001 (à 1 nM) et 0,1791 (à 10 nM). Liste des valeurs P pour CITE 24 versus BITE 30 en **c** : <0,0001 (à 0,01 nM), <0,0001 (à 0,1 nM), 0,0333 (à 1 nM) et 0,7435 (à 10 nM). Les données sont représentées sous forme de points de données individuels, à partir de trois répétitions. Les courbes sont ajustées par régression non linéaire avec le modèle suivant : [Agoniste] versus réponse (trois paramètres). Voir les informations supplémentaires pour le tableau ANOVA et les comparaisons entre CITE 27 et BITE 30, et CITE 24 et CITE 27.

plus actif à des concentrations plus faibles que CITE 27 ou BITE 30, ce qui suggère que, dans ces conditions, la désialylation est synergique avec l'engagement des lymphocytes T, et plus que le blocage du point de contrôle PD-1 / PD-L1 (Fig. 6b, c; les informations supplémentaires fournissent des comparaisons supplémentaires). L'activité catalytique de l'enzyme sialidase contrastée avec la nature stoechiométrique du blocage de PD-1 pourrait peut-être jouer un rôle dans l'activité de CiTE 24 à de faibles concentrations par rapport à CITE 27. En effet, les données de désialylation des cellules cancéreuses et des cellules T discutées précédemment (Fig. 5d, f) suggèrent que

l'acide est éliminé par entre 0,1 nM et 1 nM de CiTE 24, facilitant la cytotoxicité médiée par les lymphocytes T.

### Conclusions et perspectives

En résumé, une méthode a été développée pour la génération chimique de constructions fonctionnalisées à trois protéines. Des molécules CiTE avec une enzyme ST sialidase pour l'élimination des glycanes d'acide sialique immunosuppresseurs des cellules cibles et effectrices<sup>25</sup> ou avec un inhibiteur de point de contrôle Fab anti-PD-121 attaché ont été synthétisées avec d

contrôles. Les synthèses ont été réalisées via la chimie clic tétrazine – BCN SPIEDAC pour la conjugaison protéine-protéine, et chaque CiTE avait une petite molécule de biotine également conjuguée via SPAAC pour l'imagerie et / ou la purification. Ces molécules CiTE ont ensuite été testées pour leur activité biologique. En raison de sa modularité, cette méthode pourrait être appliquée à la génération d'une variété de constructions à trois protéines. Les BiTE pourraient être conjugués à différents inhibiteurs de points de contrôle (par exemple, CTLA-4 ou ICOS) ou à des cytokines (par exemple, l'interleukine-2)28, la sélectivité de la construction pourrait être améliorée en ciblant deux récepteurs distincts associés aux tumeurs en plus du CD3, ou des activateurs immunitaires indépendants de la cible pourraient être développés pour réactiver les cellules T épuisées, quelle que soit l'indication du cancer29. La méthode a la flexibilité supplémentaire d'une poignée inhérente pour la fixation de petites molécules, telles que la biotine, les fluorophores, les cytotoxines, les prolongateurs de demi-vie ou les fractions masquant l'activité30,31. Cependant, les constructions décrites ici ne possèdent pas de fragment Fc et devraient avoir une demi-vie plus courte in vivo en raison d'un manque de recyclage médié par FcRn32. Si cette demi-vie réduite s'avère préjudiciable in vivo, la stratégie devra être adaptée pour incorporer un Fc (par exemple, via un conjugué SynAb-checkpoint-inhibiteur20) ou un autre prolongateur de demi-vie, comme l'albumine33 ou un motif de liaison à l'albumine34. La stratégie permet également, dans une certaine mesure, de contrôler le profil de liaison des constructions, car il semble que le fragment Fab pris en sandwich au milieu de l'espèce à trois protéines a une capacité réduite à se lier à sa cible, probablement en tant que conséquence de la présence de la deuxième protéine. Cela pourrait être exploité pour minimiser les liaisons indésirables, et donc potentiellement réduire les effets secondaires. La méthode est également rapide (les conjugués peuvent être préparés à partir de mAbs dans un délai de 5 à 7 jours) et modulaire (fonctionne avec la plupart des mAbs et des protéines mutantes de cystéine). Il pourrait ainsi être très utile dans l'identification des hits, où un grand nombre de constructions avec diverses combinaisons de protéines sont générées à partir d'un pool de biomacromolécules, par exemple, dans une plaque à 96 puits. Ces constructions brutes pourraient ensuite être criblées pour l'activité biologique et les résultats les plus prometteurs mis à l'échelle pour des tests supplémentaires. L'évolutivité et la capacité de développement de cette stratégie devraient cependant être étudiées, car, sur la base des informations actuelles, il est difficile de juger s'il serait possible de passer à une production industrielle à grande échelle. Cela étant dit, nous ne voyons aucune raison intrinsèque pour laquelle cela ne pourrait pas être le cas, à condition que le processus puisse être rationalisé pour minimiser la perte de protéines pendant les étapes de purification, car les réactions chimiques elles-mêmes se déroulent toutes avec d'excellentes conversions.

Les constructions générées, FabHER2–FabCD3–Sia–biotine CiTE 24 et FabCD3–FabHER2–FabPD-1–biotine CiTE 27, ainsi que des constructions BiTE plus simples à deux protéines, ont vu leurs activités biologiques étudiées. Il a été démontré que les parties constitutives conservaient leur fonction biologique (bien que la liaison ait été altérée dans certains cas). Les CiTE se sont ensuite révélés significativement plus efficaces que les BiTE 30 correspondants pour favoriser la mort des cellules HER2+ médiée par les lymphocytes T. Bien que l'augmentation de l'efficacité de CiTE 27 bloquant PD-1 n'ait peut-être pas été étonnante dans son ampleur, il y avait un avantage significatif à ajouter la modalité inhibitrice de point de contrôle à un échafaudage BiTE, même dans ces conditions relativement non optimisées. Le CiTE 24 contenant de la sialidase, cependant, avait une activité cytotoxique fortement accrue (d'environ un ordre de grandeur) à des concentrations plus faibles que le BiTE 30. La réalisation d'essais biologiques plus approfondis (y compris des essais in vivo et le test de différents HER2+ des lignées cellulaires cancéreuses) sortait du cadre de ce projet axé sur la chimie. Cependant, comme d'autres groupes ont démontré la synergie entre l'inhibition des points de contrôle et l'engagement des lymphocytes T21, nous pensons que cet angle passionnant de l'immunomodulation devrait être exploré plus avant, d'autant plus que ce travail se poursuit pour montrer que l'élimination de l'acide sialique est synergique avec le traitement BiTE in vitro. L'étude d'un tel CiTE à trois protéines in vivo sera importante pour comprendre s'il est bénéfique par rapport à l'administration séparée de l'inhibiteur de point de contrôle et du BiTE, car l'activation immunitaire indésirable induite par l'inhibiteur de point de contrôle hors site peut être minimisée. En outre, nous espérons avoir fourni une méthode qui peut être appliquée pour générer d'autres constructions à trois protéines fonctionnelles.

Nous espérons également avoir démontré la puissance des stratégies chimiques bioorthogonales pour la conjugaison protéine-protéine. Ce domaine de recherche a récemment pris de l'ampleur6,7, mais il existe un potentiel inexploité qui attend toujours d'être découvert.

## Contenu en ligne

Toutes les méthodes, références supplémentaires, résumés des rapports du portefeuille Nature, données sources, données étendues, informations supplémentaires, remerciements, informations d'examen par les pairs; les détails des contributions des auteurs et des intérêts concurrents; et les déclarations de disponibilité des données et des codes sont disponibles sur <https://doi.org/10.1038/s41557-023-01280-4>

## Les références

- Gera, N. L'évolution des anticorps bispécifiques. *Avis d'expert. Biol. La.* 22, 945–949 (2022).
- Budde, LE et al. Innocuité et efficacité du mosunetuzumab, un anticorps bispécifique, chez les patients atteints d'un lymphome folliculaire récidivant ou réfractaire : étude de phase 2 multicentrique à un seul bras. *Lancette Oncol.* 23, 1055–1065 (2022).
- Hong, Y., Nam, SM & Moon, A. Conjugués anticorps-médicament et anticorps bispécifiques ciblant les cancers : applications de la chimie du clic. *Cambre. Pharm. Rés.* 46, 131–148 (2023).
- Husain, B. & Ellerman, D. Étendre les limites de la chimie de la bioconjugaison : des bispécifiques à des multispécifiques. *Biomater.* 234, 464 (2018).
- Thoreau, F. & Chudasama, V. Permettre les prochaines étapes de immunothérapie du cancer : des bispécifiques à base d'anticorps aux multispécifiques, avec un rôle évolutif pour la chimie de la bioconjugaison. *RSC Chem. Biol.* 3, 140–169 (2022).
- Sziji, P. & Chudasama, V. La renaissance des anticorps bispécifiques générés chimiquement. *Nat. Rév. Chem.* 5, 78–92 (2021).
- Taylor, RJ, Geeson, MB, Journeaux, T. & Bernardes, GJ L. Méthodes chimiques et enzymatiques pour la conjugaison protéine-protéine post-traductionnelle. *Confiture. Chim. Soc.* 144, 14404–14419 (2022).
- Moura, A., Savageau, MA & Alves, R. Acide aminé relatif signatures de composition des organismes et des environnements. *PLoS ONE* 8, e77319 (2013).
- Khalili, H. et al. Fab-PEG-Fab en tant que mimétique d'anticorps potentiel. *Bioconjug. Chim.* 24, 1870–1882 (2013).
- Hull, EA et al. Bispécifiques homogènes par pontage disulfure. *Bioconjug. Chim.* 25, 1395–1401 (2014).
- Forte, N. et al. Le réglage de la stabilité hydrolytique des agents de réticulation maléimide de nouvelle génération permet d'accéder aux conjugués de fragment d'albumine-anticorps et aux tri-scFv. *Bioconjug. Chim.* 29, 486–492 (2018).
- Patterson, JT et al. Conjugués Fab bispécifiques ciblés par PSMA qui engagent les cellules T. *Bioorg. Méd. Chim. Lett.* 27, 5490–5495 (2017).
- Patterson, JT et al. IgG2 bispécifique générée chimiquement anticorps par pontage disulfure. *Bioorg. Méd. Chim. Lett.* 27, 3647–3652 (2017).
- Maruani, A. et al. Une approche plug-and-play pour le de novo génération de bispécifiques doublement fonctionnalisés. *Bioconjug. Chim.* 31, 520–529 (2020).
- Lee, MTW, Maruani, A. & Chudasama, V. L'utilisation de 3,6-pyridazinediones en synthèse organique et biologie chimique. *J. Chim. Rés.* 40, 1–9 (2016).
- Bahou, C. et al. Modification hautement homogène d'anticorps par optimisation de la synthèse et de la conjugaison de dibromopyridazinediones fonctionnalisées. *Org. Biomol. Chim.* 16, 1359–1366 (2018).
- Robinson, E. et al. Les pyridazinediones délivrent des conjugués anticorps-médicament (ADC) puissants, stables, ciblés et efficaces avec une charge contrôlée de 4 médicaments par anticorps. *RSC Adv.* 7, 10115–10127 (2017).

18. Lee, MTW, Maruani, A., Baker, JR, Caddick, S. & Chudasama, V. Agrafage disulfure de nouvelle génération : réduction et re-pontage fonctionnel tout en un. *Chim. Sci.* 7, 799–802 (2016).
19. Maruani, A. et al. Une stratégie de clivage para-azidobenzyle doux à base de TCEP pour transformer des réactifs de marquage thiol de cystéine réversibles en conjugués irréversibles. *Chim. Commun.* 51, 5279–5282 (2015).
20. Thoreau, F. et al. Construction chimique modulaire de type IgG anticorps synthétiques mono- et bispécifiques (SynAbs). *ACS Cent. Sci.* 9, 476–487 (2023).
21. Herrmann, M. et al. La protéine de fusion bifonctionnelle PD-1 ×  $\alpha$ CD3 ×  $\alpha$ CD33 inverse l'évasion immunitaire adaptative dans la leucémie myéloïde aiguë. *Sang* 132, 2484–2494 (2018).
22. Rader, C. Anticorps bispécifiques dans l'immunothérapie du cancer. *Courant. Avis. Biotechnol.* 65, 9–16 (2020).
23. Bukhari, A. & Lee, ST Blinatumomab : une nouvelle thérapie pour le traitement des lymphomes non hodgkiniens. *Expert Rev. Hematol.* 12, 909–918 (2019).
24. Krupka, C. et al. Le blocage de l'axe PD-1/PD-L1 augmente la lyse des cellules AML par la construction d'anticorps CD33/CD3 BITE AMG 330 : inversion d'un mécanisme d'échappement immunitaire induit par les lymphocytes T. *Leucémie* 30, 484–491 (2016).
25. Gray, MA et al. La dégradation ciblée des glycanes potentialise la réponse immunitaire anticancéreuse in vivo. *Nat. Chim. Biol.* 16, 1376–1384 (2020).
26. Baalman, M. et al. Une boîte à outils de chimie du clic bioorthogonale pour synthèse ciblée de conjugués protéine-protéine ramifiés et bien définis. *Angew. Chim. Int. Éd.* 59, 12885–12893 (2020).
27. Strohl, WR & Naso, M. Redirection des lymphocytes T bispécifiques contre Cellules T-récepteurs d'antigène chimériques (CAR) comme approches pour tuer les cellules cancéreuses. *Anticorps* 8, 41 (2019).
28. Neri, D. Fusions anticorps-cytokines : produits polyvalents pour la modulation de l'immunité anticancéreuse. *Cancer Immunol. Rés.* 7, 348–354 (2019).
29. Edgar, LJ et al. Les ligands d'acide sialique de CD28 suppriment co-stimulation des lymphocytes T. *ACS Cent. Sci.* 7, 1508–1515 (2021).
30. Autio, KA, Boni, V., Humphrey, RW & Naing, A. Thérapeutique des procorps : une classe émergente de thérapies conçues pour améliorer les effets ciblés avec une toxicité tumorale réduite pour une utilisation en immuno-oncologie. *Clin. Cancer Rés.* 26, 984–989 (2020).
31. Lucchi, R., Bentanachs, J. & Oller-Salvia, B. Le jeu de masquage : conception d'anticorps et de mimétiques activables pour la thérapie sélective et le contrôle cellulaire. *ACS Cent. Sci.* 7, 724–738 (2021).
32. Ward, ES & Ober, RJ Cibler le FcRn pour générer des thérapies à base d'anticorps. *Tendances Pharmacol. Sci.* 39, 892–904 (2018).
33. Mandrup, OA et al. Demi-vie programmable et anti-tumorale effets des fusions bispécifiques d'engagement des lymphocytes T-albumine avec une affinité FcRn ajustée. *Commun. Biol.* 4, 310 (2021).
34. Liu, L. et al. Domaine de liaison à l'albumine fusionnant la séquence R/KXXR/K pour améliorer l'administration tumorale de la doxorubicine. *Mol. Pharm.* 14, 3739–3749 (2017).

Note de l'éditeur Springer Nature reste neutre en ce qui concerne les revendications juridictionnelles dans les cartes publiées et les affiliations institutionnelles.

Libre accès Cet article est sous licence Creative Commons Attribution 4.0 International License, qui permet l'utilisation, le partage, l'adaptation, la distribution et la reproduction sur n'importe quel support ou format, tant que vous donnez le crédit approprié à l'auteur ou aux auteurs originaux et à la source, fournissez un lien vers la licence Creative Commons et indiquez si des modifications ont été apportées. Les images ou tout autre matériel tiers dans cet article sont inclus dans la licence Creative Commons de l'article, sauf indication contraire dans une ligne de crédit au matériel. Si le matériel n'est pas inclus dans la licence Creative Commons de l'article et que votre utilisation prévue n'est pas autorisée par la réglementation légale ou dépasse l'utilisation autorisée, vous devrez obtenir l'autorisation directement du détenteur des droits d'auteur. Pour voir une copie de cette licence, visitez <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© Les auteurs 2023

## Article

### Résumé des rapports

De plus amples informations sur la conception de la recherche sont disponibles dans le résumé des rapports du portefeuille nature lié à cet article.

### Disponibilité des données

Les procédures détaillées requises pour dupliquer ce travail sont disponibles dans les informations supplémentaires avec les spectres LC-MS et RMN complets, le cas échéant. Les données numériques des essais cellulaires in vitro sont disponibles sous forme de fichiers .csv et Prism. Toute donnée supplémentaire ou matériel unique (par le biais d'un accord de transfert de matériel) est disponible auprès des auteurs correspondants sur demande raisonnable.

Les données sources sont fournies avec ce document.

### Remerciements

Nous remercions le Wellcome Trust pour le financement du PAS, une subvention des National Institutes of Health (NIH R01 CA227942 à CRB), le Leverhulme Trust (RPG-2020-010) pour le financement du CB et le programme Horizon 2020 de l'UE dans le cadre de l'accord de subvention Marie-Curie 675007 pour le financement du JCFN. Nous reconnaissons également le soutien de K.

Karu de l'installation de spectrométrie de masse (MS) de chimie de l'UCL, A. Aliev du service RMN de l'UCL, ainsi que N. Pinotsis du Centre de biophysique de l'ISMB. Comme MAG et MKR ont contribué à parts égales à ce travail, ils sont autorisés à inscrire leur nom en deuxième sur la liste des auteurs sur tout CV, demande de subvention et de bourse, etc. Leurs noms étaient simplement énumérés dans cet ordre alphabétique. Cette recherche a été financée en partie par le Wellcome Trust (subventions nos 175282 et 214941/Z/18/Z). Aux fins du libre accès, les auteurs ont demandé une licence de droit d'auteur public CC BY pour toute version manuscrite acceptée par l'auteur résultant de cette soumission. Les bailleurs de fonds n'ont joué aucun rôle dans la conception de l'étude, la collecte et l'analyse des données, la décision de publier ou la préparation du manuscrit.

### Contributions d'auteur

Le PAS a préparé les fragments d'anticorps. PAS, CB et JCFN ont synthétisé les petites molécules. Le PAS a généré les constructions protéiques. PAS a effectué les purifications SEC. PAS analysé

les constructions protéiques par LC-MS et SDS-PAGE. MAG et MKR ont réalisé les expériences de biologie. PAS et MAG ont réalisé les analyses statistiques. PAS, MAG, CRB et VC ont conçu l'étude. Tous les auteurs ont contribué à la rédaction de ce manuscrit. Tous les auteurs ont lu et approuvé le manuscrit final.

### Intérêts concurrents

MAG et CRB sont les inventeurs d'un brevet déposé par l'Université de Stanford (numéro de publication internationale WO2018006034A1) intitulé « Conjugates for Targeted Cell-Surface Editing » publié le 4 janvier 2018 et licencié par Palleon Pharmaceuticals le 27 juin 2017. CRB est cofondateur et membre du conseil scientifique de Palleon Pharmaceuticals, Enable Bioscience, Redwood Biosciences (une filiale de Catalent), InterVenn Biosciences, Lycia Therapeutics, Grace Science LLC et OilLux Biosciences. VC est administrateur de la spin-out ThioLogics et est l'inventeur du brevet déposé par UCL Business PLC (brevet européen EP-2464654-B1) intitulé « Thiol protector group » publié le 8 octobre 2014, et d'autres brevets dérivés de celui-ci, ainsi que des brevets directement liés dans d'autres juridictions qui relèvent de la famille des brevets. Les autres auteurs ne déclarent aucun intérêt concurrent.

### Informations Complémentaires

Informations supplémentaires La version en ligne contient des informations supplémentaires disponibles sur <https://doi.org/10.1038/s41557-023-01280-4>.

La correspondance et les demandes de matériel doivent être adressées à Carolyn R. Bertozzi ou Vijay Chudasama.

Informations sur l'évaluation par les pairs Nature Chemistry remercie David Spring et les autres évaluateurs anonymes pour leur contribution à l'évaluation par les pairs de ce travail.

Les informations sur les réimpressions et les autorisations sont disponibles sur [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

## Reporting Summary

Nature Portfolio wishes to improve the reproducibility of the work that we publish. This form provides structure for consistency and transparency in reporting. For further information on Nature Portfolio policies, see our [Editorial Policies](#) and the [Editorial Policy Checklist](#).

### Statistics

For all statistical analyses, confirm that the following items are present in the figure legend, table legend, main text, or Methods section.

- | n/a                                 | Confirmed  |
|-------------------------------------|--|
| <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> The exact sample size ( $n$ ) for each experimental group/condition, given as a discrete number and unit of measurement  |
| <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> A statement on whether measurements were taken from distinct samples or whether the same sample was measured repeatedly  |
| <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> The statistical test(s) used AND whether they are one- or two-sided<br><i>Only common tests should be described solely by name; describe more complex techniques in the Methods section.</i>   |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> A description of all covariates tested  |
| <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> A description of any assumptions or corrections, such as tests of normality and adjustment for multiple comparisons  |
| <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> A full description of the statistical parameters including central tendency (e.g. means) or other basic estimates (e.g. regression coefficient) AND variation (e.g. standard deviation) or associated estimates of uncertainty (e.g. confidence intervals) |
| <input type="checkbox"/>            | <input checked="" type="checkbox"/> For null hypothesis testing, the test statistic (e.g. $F$ , $t$ , $r$ ) with confidence intervals, effect sizes, degrees of freedom and $P$ value noted<br><i>Give <math>P</math> values as exact values whenever suitable.</i>                            |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> For Bayesian analysis, information on the choice of priors and Markov chain Monte Carlo settings  |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> For hierarchical and complex designs, identification of the appropriate level for tests and full reporting of outcomes  |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> Estimates of effect sizes (e.g. Cohen's $d$ , Pearson's $r$ ), indicating how they were calculated  |

*Our web collection on [statistics for biologists](#) contains articles on many of the points above.*

### Software and code

Policy information about [availability of computer code](#)

**Data collection** Flow cytometry data acquisition was carried out with a MACSQuant® Analyzer 10 Flow Cytometer (Miltenyi Biotec). For LC-MS an Agilent 6510 QTOF LC-MS system (Agilent, UK) was used. UV-vis spectroscopy was carried out with a NanoDrop™ One microvolume UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific™). All NMR results were obtained using Bruker NMR instruments, the models are as follows: Avance Neo 700, Avance III 600, Avance 500, Avance III 400. Purification by size exclusion chromatography (SEC) was carried out on an Agilent 1100 HPLC system (column: Superdex 200 increase, 10/300 GL) with a MALS system attached (Optilab T-REX, Dawn8+ Heleos, Wyatt Technology). A SpectraMax i3x Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices) was used to acquire the results for the cytotoxicity assay.

**Data analysis** GraphPad Prism version 9 was used for statistical analysis. FlowJo, version 10.8.1 was used for flow cytometry analysis. MassHunter, version B.07.00 was used for LC-MS analysis. NMR analysis was carried out with MestReNova, version 6. The results of the cytotoxicity assay were analysed with SoftMax Pro 6.4.2. ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) was used to calculate extinction coefficients from known protein sequences where possible.

For manuscripts utilizing custom algorithms or software that are central to the research but not yet described in published literature, software must be made available to editors and reviewers. We strongly encourage code deposition in a community repository (e.g. GitHub). See the Nature Portfolio [guidelines for submitting code & software](#) for further information.

## Data

Policy information about [availability of data](#)

All manuscripts must include a [data availability statement](#). This statement should provide the following information, where applicable:

- Accession codes, unique identifiers, or web links for publicly available datasets
- A description of any restrictions on data availability
- For clinical datasets or third party data, please ensure that the statement adheres to our [policy](#)

The cell assay datasets along with the statistical analysis thereof has been made available in Prism format (.pzfx).

## Human research participants

Policy information about [studies involving human research participants and Sex and Gender in Research](#).

Reporting on sex and gender	No information available.
Population characteristics	No information available.
Recruitment	Leukoreduction system (LRS) chambers were obtained from healthy anonymous human donors who gave informed consent at the Stanford Blood Center. Tier 1 characteristics of human biospecimens reported according to BRISQ guidelines as follows. Biospecimen type: white blood cell concentrate of TrimaAccel® LRS chamber recovered after Plateletpheresis procedure. Product contains PBMCs, red blood cells, plasma, and negligible amount of anticoagulant (ACD-A). Anatomical or collection site: vein (venipuncture). Biospecimen disease status and clinical characteristics of patients: healthy donors, not routinely tested for infectious disease markers. Vital state: alive. Collection mechanism and parameters: blood draw and LRS filtration for platelet donation. RBCs were returned to the donor. Mechanism of stabilization: none. Type of long-term preservation: peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated from the LRS chambers using density gradient separation with Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences), biospecimens were frozen in FBS + 10% DMSO in liquid nitrogen. Constitution and concentration of fixative/preservation solution: heat inactivated foetal bovine serum (FBS) with 10% DMSO solution and frozen at -80 °C in an insulated cooler before being transferred to liquid nitrogen for long-term storage. Storage and shipping temperatures: LRS chambers were held at 20-24 °C. Isolated PBMCs were stored in liquid nitrogen vapor (-196 °C). Storage duration: <1 day in LRS chamber. <2 years for frozen isolated PBMCs. Composition assessment and selection: none.
Ethics oversight	Leukoreduction system (LRS) chambers were obtained from healthy anonymous human donors who gave informed consent at the Stanford Blood Center.

Note that full information on the approval of the study protocol must also be provided in the manuscript.

## Field-specific reporting

Please select the one below that is the best fit for your research. If you are not sure, read the appropriate sections before making your selection.

- Life sciences     Behavioural & social sciences     Ecological, evolutionary & environmental sciences

For a reference copy of the document with all sections, see [nature.com/documents/nr-reporting-summary-flat.pdf](https://www.nature.com/documents/nr-reporting-summary-flat.pdf)

## Life sciences study design

All studies must disclose on these points even when the disclosure is negative.

Sample size	No sample size calculations were performed. In most cases three replicates were performed in in vitro cell experiment. Three replicates per experiment were considered sufficient in line with accepted practice in the field. More replication (i.e., biological plus technical, for 9 total experiments) was not performed to conserve the conjugates. Exceptions: Figure 4/F where tumour cell lines were measured with single data points. As in this experiment multiple tumour cell lines were used and furthermore no statistical analysis was performed on this dataset, this was considered sufficient to show the trends in desialylation. Figure 4/I where the binding of BiTE 8 control to T cells was only measured with single data points due to there not being enough BiTE 8 left for three replicates by this point. Since the difference in binding between BiTE 8 and CiTE 27 was clearly marked, and this experiment was not essential for our main conclusions we considered this sufficient. These exceptions are clearly stated in the appropriate figure legends.
Data exclusions	There were no data exclusions.
Replication	In most cases three replicates were performed in in vitro cell experiment as described above. Most Fab and sialidase conjugates were generated multiple times and found to have consistent masses corresponding to calculations via LC-MS analysis. The final three-protein conjugation strategy was carried out to generate three distinct conjugates (FabHER2-FabCD20-Sia-Biotin 20, CiTE 26 and CiTE 27), each of them once, and all three constructs showed the expected masses by LC-MS analysis. Synthetic organic chemistry reactions were performed 1-2 times and products were characterized by NMR, IR and MS as is accepted in the field.

Randomization

Blinding

## Reporting for specific materials, systems and methods

We require information from authors about some types of materials, experimental systems and methods used in many studies. Here, indicate whether each material, system or method listed is relevant to your study. If you are not sure if a list item applies to your research, read the appropriate section before selecting a response.

### Materials & experimental systems

- |     |                                     |                               |
|-----|-------------------------------------|-------------------------------|
| n/a | <input type="checkbox"/>            | Involved in the study         |
|     | <input checked="" type="checkbox"/> | Antibodies                    |
|     | <input checked="" type="checkbox"/> | Eukaryotic cell lines         |
|     | <input checked="" type="checkbox"/> | Palaeontology and archaeology |
|     | <input checked="" type="checkbox"/> | Animals and other organisms   |
|     | <input checked="" type="checkbox"/> | Clinical data                 |
|     | <input checked="" type="checkbox"/> | Dual use research of concern  |

### Methods

- |     |                                     |                        |
|-----|-------------------------------------|------------------------|
| n/a | <input type="checkbox"/>            | Involved in the study  |
|     | <input checked="" type="checkbox"/> | ChIP-seq               |
|     | <input checked="" type="checkbox"/> | Flow cytometry         |
|     | <input checked="" type="checkbox"/> | MRI-based neuroimaging |

## Antibodies

### Antibodies used

Cetuximab (anti-EGFR, approved for use in humans, University College London Hospital), <https://www.erbitux.com/>

Rituximab (anti-CD20, approved for use in humans, University College London Hospital), <https://www.rituxan.com/>

Ontruzant (anti-HER2, approved for use in humans, University College London Hospital), <https://www.ontruzant.com/>

Herceptin (anti-HER2, approved for use in humans, University College London Hospital), <https://www.herceptin.com/>

Anti-PD-1 (J116, BioXCell #BE0188), <https://bioxcell.com/invivomab-anti-human-pd-1-cd279-be0188>

Anti-ICOS (C398.4A, BioLegend #31350), <https://www.biolegend.com/fr-ch/products/purified-anti-human-mouse-rat-cd278-icos-antibody-2477>

Anti-CTLA4 (BN13, BioXCell #BE0190), <https://bioxcell.com/invivomab-anti-human-ctla-4-cd152-be0190>

Anti-CD3 (OKT3, BioLegend #317347 or BioXCell #BE0001-2), <https://www.biolegend.com/en-us/products/ultra-leaf-purified-anti-human-cd3-antibody-7745?GroupID=BLG4203>, <https://bioxcell.com/invivomab-anti-human-cd3-be0001-2>

Streptavidin Alexa Fluor™ 647 conjugate (ThermoFisher S21374, 1:2000 dilution), <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S21374>

Human Siglec-9 Fc (R&D Systems 1139-SL-050, 2 µg/mL), [https://www.rndsystems.com/products/recombinant-human-siglec-9-fc-chimera-protein-cf\\_1139-sl](https://www.rndsystems.com/products/recombinant-human-siglec-9-fc-chimera-protein-cf_1139-sl)

Rabbit IgG Alexa Fluor 488-conjugated antibody (R&D Systems IC1051G, 1:375 dilution), [https://www.rndsystems.com/products/rabbit-igg-alexa-fluor-488-conjugated-antibody\\_ic1051g](https://www.rndsystems.com/products/rabbit-igg-alexa-fluor-488-conjugated-antibody_ic1051g)

### Validation

Validation data is available from the suppliers' websites. No further validation of antibodies was performed in this study. Cetuximab, Rituximab, Ontruzant and Herceptin are approved for use in humans, and have as such been extensively validated.

Anti-PD-1 (J116, BioXCell #BE0188), <https://bioxcell.com/invivomab-anti-human-pd-1-cd279-be0188>  
 Production: Purified from tissue culture supernatant in an animal free facility, Purification: Protein G, Purity >95% Determined by SDS-PAGE, Endotoxin <2EU/mg (<0.002EU/µg) Determined by LAL gel clotting assay

Anti-ICOS (C398.4A, BioLegend #313502), <https://www.biolegend.com/fr-ch/products/purified-anti-human-mouse-rat-cd278-icos-antibody-2477>  
 The antibody was purified by affinity chromatography.

Anti-CTLA4 (BN13, BioXCell #BE0190), <https://bioxcell.com/invivomab-anti-human-ctla-4-cd152-be0190>  
 Production: Purified from tissue culture supernatant in an animal free facility, Purification: Protein G, Purity >95% Determined by SDS-PAGE, Endotoxin <2EU/mg (<0.002EU/µg) Determined by LAL gel clotting assay.

Anti-CD3 (OKT3, BioLegend #317347), <https://www.biolegend.com/en-us/products/ultra-leaf-purified-anti-human-cd3-antibody-7745?GroupID=BLG4203>  
 The Ultra-LEAF™ (Low Endotoxin, Azide-Free) antibody was purified by affinity chromatography. Endotoxin level is <0.01 EU/µg of the protein (<0.001 ng/µg of the protein) as determined by the LAL test.

Anti-CD3 (OKT3, BioXCell #BE0001-2), <https://bioxcell.com/invivomab-anti-human-cd3-be0001-2>

Production: Purified from tissue culture supernatant in an animal free facility, Purification: Protein G, Purity >95% Determined by SDS-PAGE, Endotoxin <2EU/mg (<0.002EU/μg) Determined by LAL gel clotting assay.

Streptavidin Alexa Fluor™ 647 conjugate (ThermoFisher S21374), <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S21374>  
Validated by absorption at 652 nm. Emission maximum at 670 nm. Microscopy: Staining of HEp2 cells by human anti-nuclear antibody, DSB-X biotin goat anti-human and this product: good nuclear staining, negligible background. TLC: negligible or no free dye detected.

Human Siglec-9 Fc (R&D Systems 1139-SL-050), [https://www.rndsystems.com/products/recombinant-human-siglec-9-fc-chimera-protein-cf\\_1139-sl](https://www.rndsystems.com/products/recombinant-human-siglec-9-fc-chimera-protein-cf_1139-sl)

Purity >97%, by SDS-PAGE visualized with Silver Staining and quantitative densitometry by Coomassie® Blue Staining.

Endotoxin Level <0.10 EU per 1 μg of the protein by the LAL method.

Activity Measured by the ability of the immobilized protein to support the adhesion of human red blood cells. Kelm, S. et al. (1994) Current Biology 4:965. The ED50 for this effect is 10.0-100 ng/mL.

Rabbit IgG Alexa Flour 488-conjugated antibody (R&D Systems IC1051G), [https://www.rndsystems.com/products/rabbit-igg-alexa-fluor-488-conjugated-antibody\\_ic1051g](https://www.rndsystems.com/products/rabbit-igg-alexa-fluor-488-conjugated-antibody_ic1051g)

Protein A or G purified from cell culture supernatant

## Eukaryotic cell lines

Policy information about [cell lines and Sex and Gender in Research](#)

Cell line source(s)	SKBR3, HCC-1954, BT-20, MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cell lines were purchased from American Type Culture Collection.
Authentication	Cell lines have not been subjected to additional authentication.
Mycoplasma contamination	All cell lines regularly tested negative for mycoplasma infection by the Lonza Mycoplasma Detection Assay.
Commonly misidentified lines (See <a href="#">ICLAC</a> register)	No commonly misidentified cell lines were used in this study.

## Flow Cytometry

### Plots

Confirm that:

- The axis labels state the marker and fluorochrome used (e.g. CD4-FITC).
- The axis scales are clearly visible. Include numbers along axes only for bottom left plot of group (a 'group' is an analysis of identical markers).
- All plots are contour plots with outliers or pseudocolor plots.
- A numerical value for number of cells or percentage (with statistics) is provided.

### Methodology

Sample preparation	SKBR3, HCC-1954, BT-20, MDA-MB-468 and MDA-MB-231 cell lines were purchased from American Type Culture Collection and cultured in filtered Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham media with 10% heat-inactivated FBS and no added antibiotics or cultured as suggested. Cultures were grown in T25 and T75 flasks and maintained at 37 °C with 5% CO <sub>2</sub> . Where required, cells were induced for the expression of human PD-L1 by incubation with interferon gamma (IFN-γ) (PeproTech 300-02) at 100 ng/mL for 48 h and lifted with Enzyme Free Cell Dissociation Solution PBS Based (MilliporeSigma S-014-M) before flow cytometry and cytotoxicity assays. Cells were stained with either Zombie NIR (Biolegend 423106) or Zombie Violet (Biolegend 423113) Fixable Viability Kits according to manufacturer protocols and fixed with 4% Paraformaldehyde (Ted Pella 18505) prior to analysis. Washing and staining were performed in PBS with 0.5% BSA. Binding was determined by incubating the constructs with 100,000 cells for 30 min at 4 °C, followed by incubating with Streptavidin Alexa Fluor™ 647 conjugate (ThermoFisher S21374) for 30 min at 4 °C. Desialylation activity was determined by incubating cells for 30 min at 37 °C with the constructs, then detecting binding with a 1:1 molar mixture of recombinant Human Siglec-9 Fc (R&D Systems 1139-SL-050) and rabbit IgG Alexa Flour 488-conjugated antibody (R&D Systems IC1051G). Data points were normalized to the maximum mean fluorescence intensity. LRS chambers were obtained from healthy human donors from the Stanford Blood Bank. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated from the chambers using density gradient separation with Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences). T cells were isolated using immunomagnetic negative selection EasySep™ Human T Cell Isolation Kit StemCell (STEMCELL Technologies, 17951) followed by activation for 5 days with human T-Activator CD3/CD28 Dynabeads™ (ThermoFisher, 11131D) and 30 IU/mL recombinant human Interleukin-2 (IL-2) (PeproTech, 200-02).
Instrument	MACSQuant® Analyzer 10 Flow Cytometer (Miltenyi Biotec)
Software	FlowJo, version 10.8.1
Cell population abundance	No sorting was performed, the entirety of the cell samples were analyzed.

Gating strategy

Gating was performed using FlowJo software to eliminate debris (forward versus side scatter (FSC/SSC)) to analyze single cells (FSC-A/FSC-H), and to analyze live cells with either Zombie NIR (Biolegend 423106) or Zombie Violet (Biolegend 423113) Fixable Viability Kits.

Tick this box to confirm that a figure exemplifying the gating strategy is provided in the Supplementary Information.