



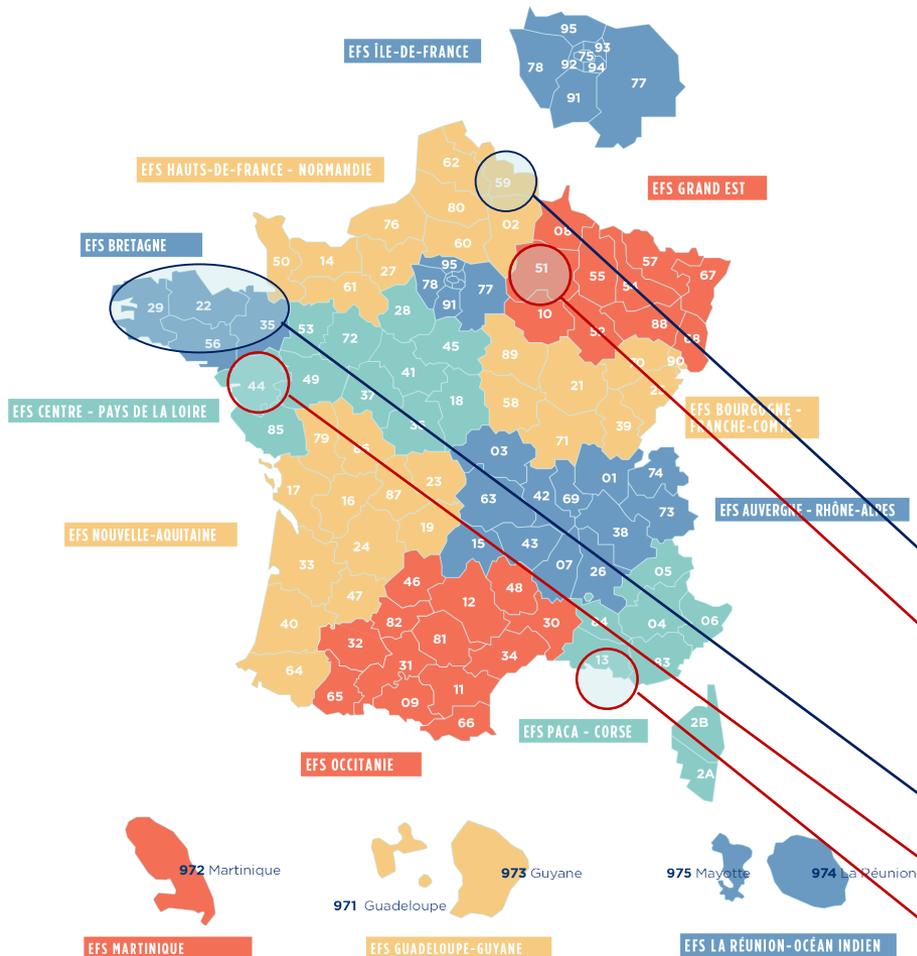
**Donnons  
au sang**  
*Le pouvoir  
de soigner*

# JOURNÉES TACT 2023

Les anticorps monoclonaux, une source de réactifs

# La PlateForme de Biotechnologies Innovantes, Laboratoire de Conception et Développement de l'UPR

## Une Unité de Production de Réactifs au sein de l'EFS



**1 cellule nationale** Siège définit la stratégie, identifie les pistes d'efficience pour garantir le dynamisme de l'activité, gère la planification, les affaires réglementaires et la relation Client.

**6 sites de production** assurent la production dans le respect des exigences réglementaires et normatives liées à la spécificité des produits fabriqués, du budget alloué, des coûts de production et des délais.

- Lille – Sérologie
- Reims – Immuno-hématologie
- Brest – Virologie
- Rennes – Anticorps Monoclonaux, Produits NGS
- Nantes – Immuno-hématologie
- Marseille – Immuno-hématologie

# La PlateForme de Biotechnologies Innovantes

## La PFBI - En quelques mots



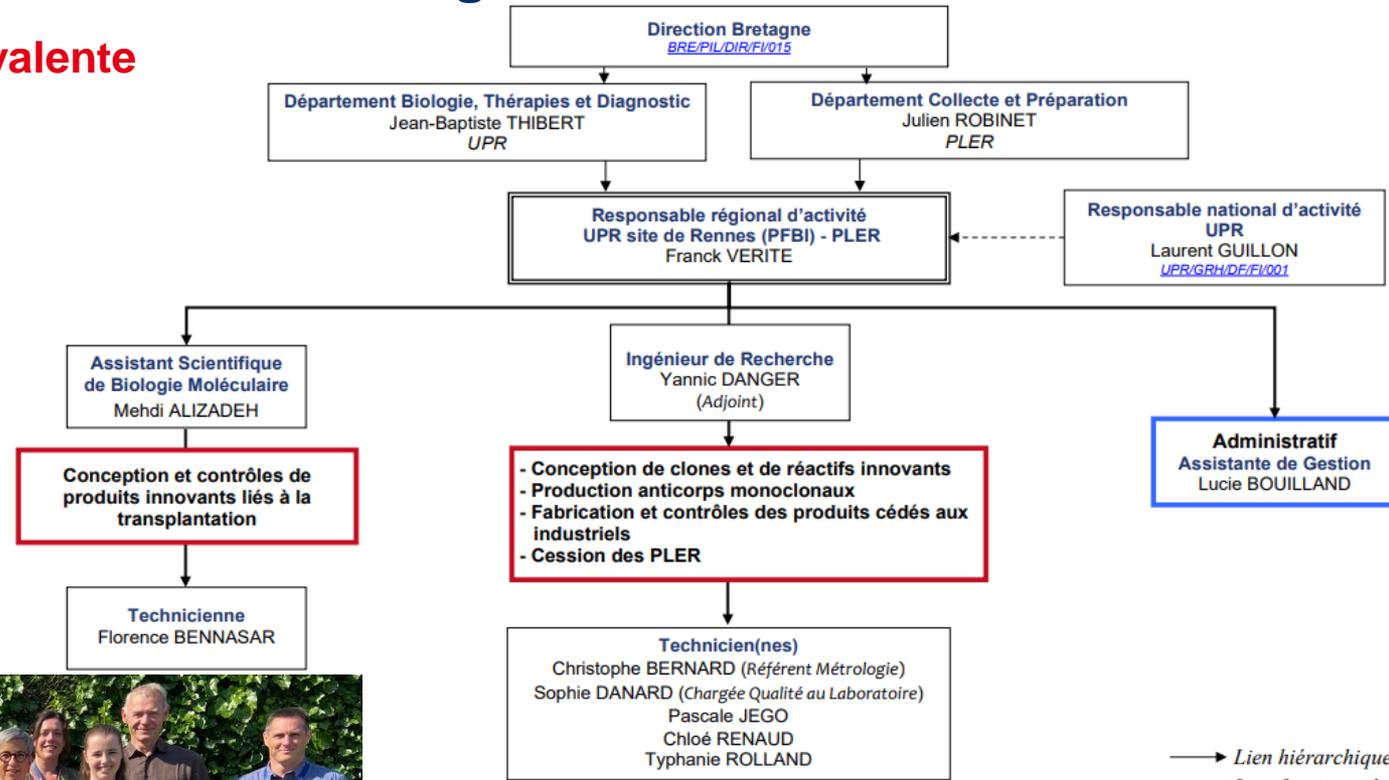
**Expertise reconnue dans le développement d'AcM depuis plus de 35 ans, principalement pour les réactifs IH**

### Ses points forts:

- **Savoir-faire unique pour la génération d'AcM murins et humains**
- **Certifié ISO 13485: pour la production et la conception**
- **Outils de production**
- **Partenariats industriels**
- **Plateforme intégrée à l'UMS BIOSIT (Univ Rennes)**

# La PlateForme de Biotechnologies Innovantes

Une équipe polyvalente

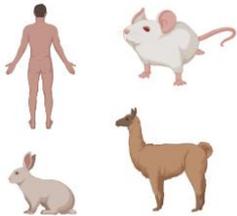


# Les anticorps

Pour faire quoi ?

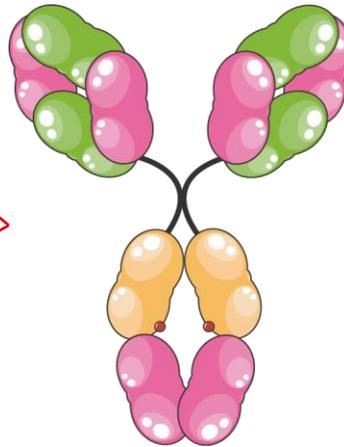
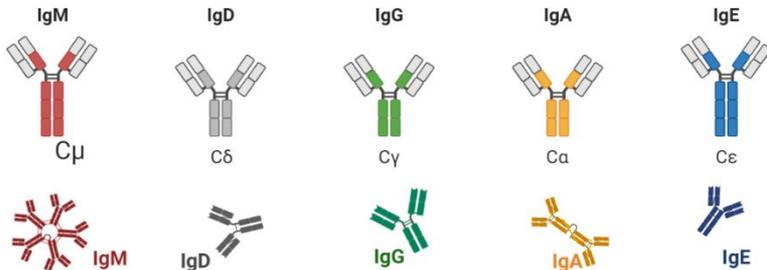
## Origine

- Murin
- Humain
- Recombinant



## Isotype

- IgM
- IgG
- Fragments Fab



Réactifs gamme manuelle

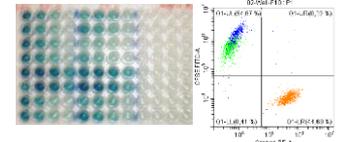


Réactifs gamme automate



Outils de recherche

- ELISA
- Western Blot
- Cytométrie

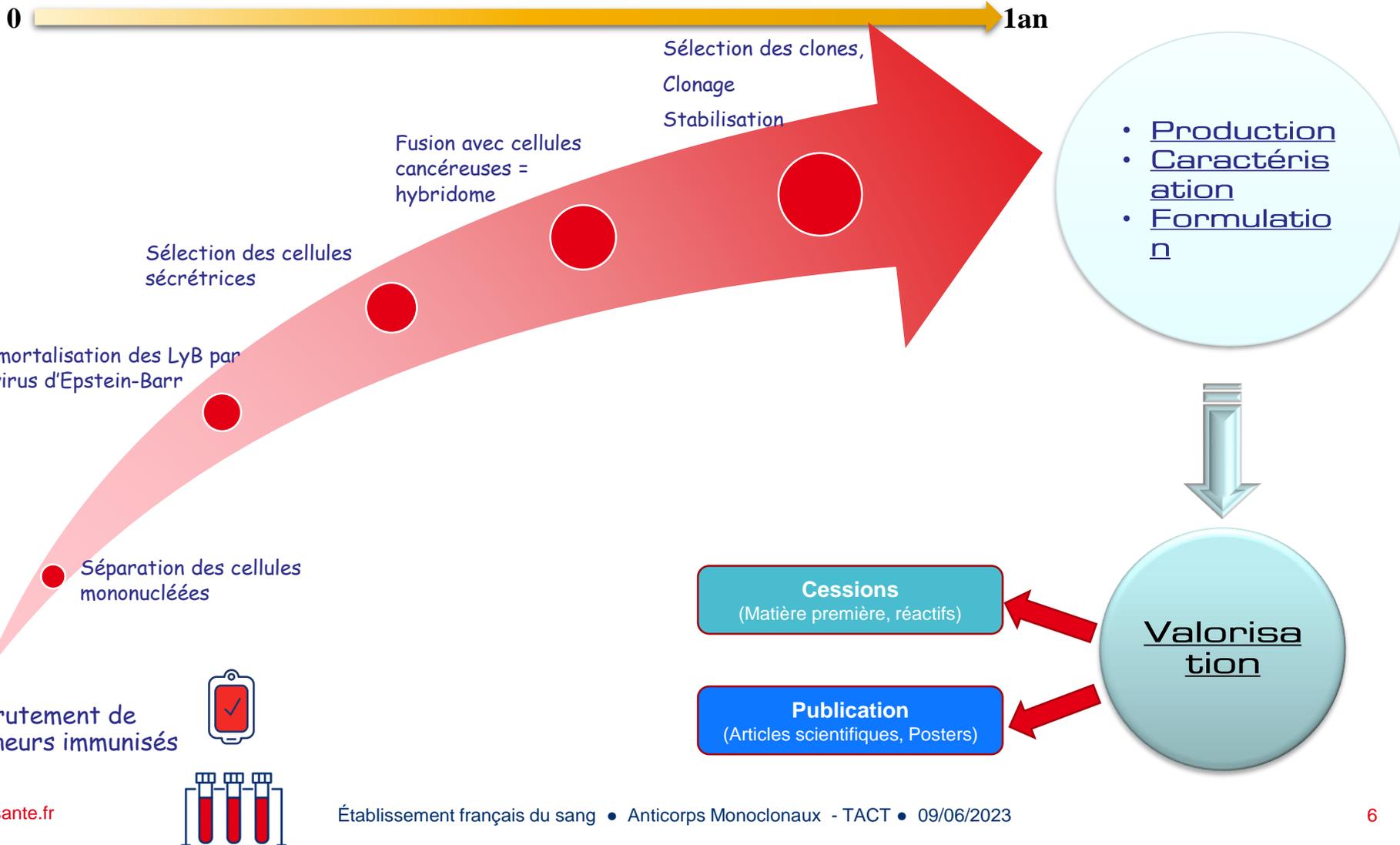


Outils thérapeutique



# Obtention d'un anticorps monoclonal humain

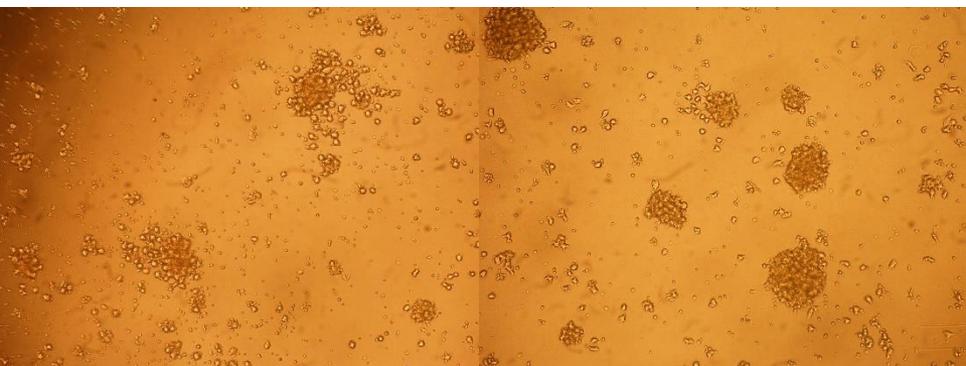
Un procédé qui prend du temps...



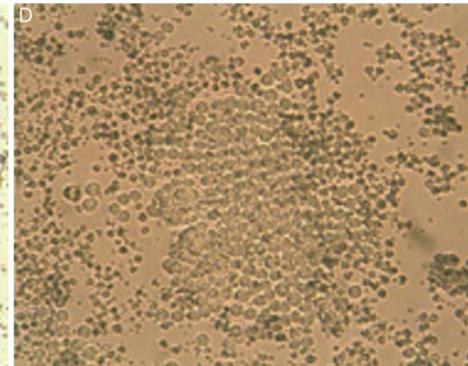
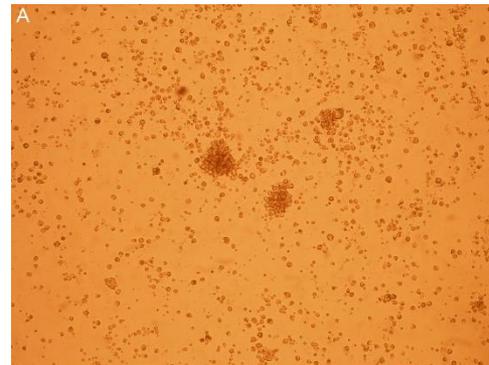
# LCL / Hybridomes

## Quelques images

Lymphoblastoid Cell Lines  
(Lymphocytes B immortalisées par l'EBv)



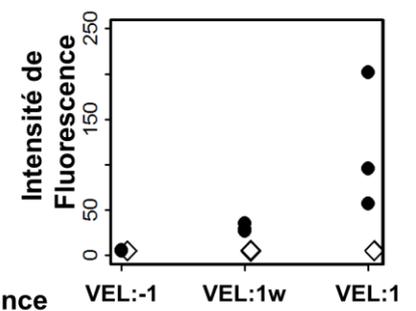
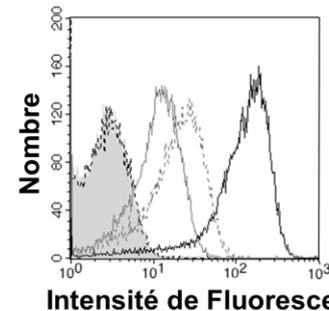
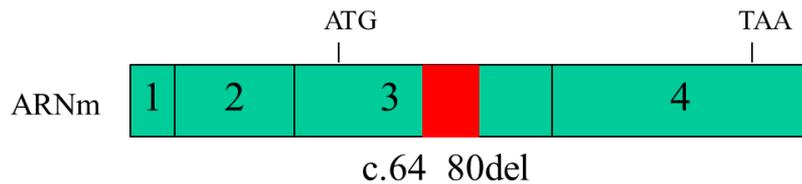
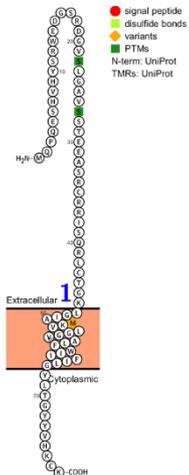
Hybridomes



# Un exemple de réalisation emblématique

## Anticorps monoclonal humain anti-VEL

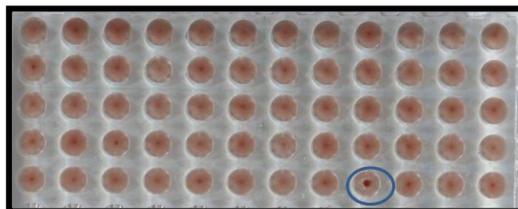
- Antigène décrit en 1953, mais identification de la protéine responsable en 2013
- Antigène publique (1/4000)
- Une délétion de 17 nucléotides dans l'exon 3 définit le phénotype VEL:-1.
- Responsable d'allo-immunisation avec des allo-anticorps hémolysant : intérêt +++ du dépistage.
- Obtention d'un anticorps monoclonal à partir d'un patient immunisé (SpG213Dc)



## un exemple emblématique (2)

### Valorisation de l'anticorps anti-VEL

- Publication scientifique : AcM unique au monde
- Mise au point de réactifs utilisables dans différentes techniques d'agglutination (tube, gel-filtration, automate PK)
- D'octobre 2015 à fin avril 2017, 981 650 dons ont été testés en provenance d'Ile de France, Nord de France, Normandie, permettant de dépister **339 donneurs VEL:-1**, confirmés par le CNRGS au niveau phénotypique (deux sources de réactifs) et moléculaire (génotype *VEL\*-01/VEL\*-01*).



VoxSanguinis

The International Journal of Transfusion Medicine

ISBT International Society of Blood Transfusion

Vox Sanguinis [2015]

© 2015 International Society of Blood Transfusion  
DOI: 10.1111/vox.12321

ORIGINAL PAPER

#### Characterization of a new human monoclonal antibody directed against the Vel antigen

Y. Danger,<sup>1,2</sup> S. Danard,<sup>1</sup> V. Gringoire,<sup>1</sup> T. Peyrard,<sup>3,4,5</sup> P. Riou,<sup>1</sup> G. Semana<sup>1</sup> & F. Vêrite<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>EFS Bretagne, Rennes, France

<sup>2</sup>Structure fédérative BioSit UMS 3480 CNRS-US18 Inserm, Rennes, France

<sup>3</sup>Institut National de la Transfusion Sanguine, Département Centre National de Référence pour les Groupes Sanguins, Paris, France

<sup>4</sup>INSERM UMR\_S1134, Paris, France

<sup>5</sup>Laboratoire d'Excellence LABEX GR-Ex, Paris, France

# Réactifs UPR pour automate PK

## Tous gagnants !

Renforcer la sécurité transfusionnelle en comblant l'indisponibilité de réactifs sur le marché.

Enrichir des panels avec une meilleure couverture des antigènes érythrocytaires.

Maitrise des coûts avec des réactifs internes

**EFS** Evaluation d'un réactif monoclonal anti-Vel pour automate Olympus

F. LAFITE, E.F. BERTHOUD, B. BENOIT, J. BENOIT, S. BENOIT, J. BENOIT, S. BENOIT

bioSift

L'antigène Vel est un antigène public immunogène de haute fréquence. De ce fait, la présence d'anticorps anti-Vel chez des patients à transfuser peut conduire à des réactions transfusionnelles. Jusqu'à présent, seule l'utilisation de sérum humain permet de déterminer le phénotype Vel. Cependant, la table de compatibilité de ce sérum ne permet pas d'évaluer un réactif à haut débit.

L'anticorps monoclonal humain Sp6213Dc est spécifiquement dirigé contre l'antigène Vel. Un réactif a été élaboré à partir du sérum de culture pour permettre son utilisation sur automate Olympus et pour la technique en gel filtration Colton.

Les premiers résultats obtenus ont démontré la nécessité de sensibiliser les hématies à la broméline. Conformément aux données de la littérature, le traitement enzymatique des globules rouges permet un effet d'agglutination intense et durable. Toutefois, le réactif a été étudié sur une cohorte de 600 prélevés avec la technique microscopique Olympus. Pour toute précision d'agglutination inférieure ou égale à 1+, les schémas ont été analysés dans un second temps en technique gel filtration avec le sérum témoin. Sur les 6 schémas étudiés, aucune discordance entre les deux techniques n'a été observée avec le phénotype Vel. Pour un seul schéma, la réactivité a été constatée dans les deux techniques. Une analyse en cytométrie en flux a permis de confirmer la variabilité d'expression de l'antigène Vel.

**1. Formulation des anticorps Sp6213Dc pour la technique gel et l'automate Olympus**

A. Le traitement des hématies à la broméline améliore l'agglutination.

B. Différentes macromolécules sont testées afin de améliorer l'agglutination spécifique des hématies Vel positives.

C. Détermination des performances des formulations sélectionnées.

**2. Evaluation de la formulation sélectionnée**

A. L'identification d'hématies KEL-1, KEL-2 et KEL-3 phénotypées (DNFS, T. Feyraud) est confirmée avec l'utilisation de l'anticorps formulé en technique microscopique Olympus et en gel filtration.

B. L'évaluation du réactif formulé a été testée sur une cohorte de 600 prélevés en technique microscopique Olympus. Des intensités faibles d'agglutination ont été observées sur 6 schémas.

Nombre d'échantillons testés	600
Nombre d'agglutinations >= 1+	594
Nombre d'agglutinations < 1+	6

**3. Analyses des échantillons Vel négatifs ou Vel faiblement identifiés en technique microscopique Olympus**

ID	Résultat d'agglutination	
	Olympus	Gel filtration
1 (K23)	Nég	Nég
2 (P69)	1+	1+ K0*
3 (C5)	1+	1+ 3.5.1
4 (E47)	1+	1+ 2.5.3
5 (E32)	1+	1+ 2.5.4
6 (P97)	1+	1.3 + 4+

A. Tableau de synthèse des résultats obtenus dans 6 échantillons testés à partir de prélevés identifiés en technique microscopique Olympus.

B. Exemple de résultats obtenus en technique gel filtration.

C. Exemples de profils de cytométrie en flux à partir des échantillons sélectionnés (test 1) à partir d'hématies phénotypées (test).

**CONCLUSION**

A partir de sérum de culture de l'anticorps Sp6213Dc, un réactif monoclonal à direction d'hématies Vel négatives et Vel faible a été formulé pour la technique microscopique Olympus et gel filtration. Une première étude menée sur 600 prélevés a été en faveur d'hématies Vel faibles. Une seconde étude est actuellement en cours pour évaluer la présence de l'antigène Vel en France.

**EFS** Evaluation de réactifs anti-RH8 et anti-KEL3 pour automate PK7300

Christophe Bernard<sup>1</sup>, Lucie Bouillard<sup>1</sup>, Pascale Jégo<sup>1</sup>, Vanessa Gringairel<sup>1</sup>, Sophie Danard<sup>1</sup>, Stéphanie Fréchaud<sup>1</sup>, Gilbert Semard<sup>2</sup>, Franck Vérité<sup>1</sup> et Yannic Danger<sup>2</sup>

<sup>1</sup> UPRM, EFS Bretagne, Rennes ; <sup>2</sup> EFS Bretagne, Rennes ; <sup>3</sup> BioSift, Rennes

L'automate PK7300 permet la réalisation du phénotypage en masse des antigènes des groupes sanguins les plus courants. Cependant, il n'existe pas de réactifs compatibles avec cet équipement permettant l'identification de certains sous-types tels que les antigènes RH8 et KEL3. La présence de ces antigènes est en effet requise pour la construction des trousseaux de dépistage et d'identification des anticorps anti-érythrocytes.

Le LAFM a développé des anticorps monoclonaux humains contre ces antigènes de groupe sanguin pour compléter des réactifs destinés au phénotypage automatisé. Des formulations adaptées à l'automate PK7300 ont été mises au point à partir des anticorps monoclonaux de classe IgM issus des clones P3276R3 anti-RH8 et Sp4294FJ4 anti-KEL3. Ces clones ont été sélectionnés pour obtenir une direction en un temps des antigènes érythrocytaires, rapide et simple d'utilisation.

**1. Formulation des réactifs à partir des matières premières**

A. Processus de formulation

I. Analyse de la matière première

II. Tests de macromolécules

III. Contrôle de performance de la formulation retenue

B. Validation de la formulation du réactif RH8

C. Validation de la formulation du réactif KEL3

A. La formulation des réactifs est réalisée en trois étapes. Tout d'abord, les anticorps sont testés avec des hématies préparées dans différents temps, aux titres. Après cette phase préliminaire, des macromolécules sont ajoutées pour améliorer la sensibilité du réactif. Plusieurs matrices peuvent constituer une formulation satisfaisante.

B. La validation de la formulation anti-RH8 obtenue à partir du clone P3276R3 IgM sur 30 prélevés phénotypés. Aucune discordance n'a été identifiée.

C. Pré-évaluation de la formulation anti-KEL3 obtenue à partir du clone Sp4294FJ4 IgM sur 40 prélevés phénotypés. Les images des 40 schémas sont correctes et conformes aux résultats attendus vis-à-vis des phénotypes KEL-3 A, G, KEL-3 A, G.

**2. Evaluation clinique des formulations retenues**

Antigène	Nombre de prélevés analysés	Nombre de prélevés positifs	Fréquence	Taux de phénotype confirmé manuellement
RH-8	1000	20	2,0%	100%
KEL-3 A	1000	23	2,3%	100%

L'évaluation clinique a été réalisée en collaboration avec le plateau de QBS (Service Urgent) sur la cohorte étudiée, aucune discordance n'a été observée entre les résultats obtenus par l'automate PK7300 et les résultats de référence obtenus en CE.

- Pour l'antigène RH8, la fréquence observée (2%) est en parfaite adéquation avec celle décrite dans la population caennaise.
- Concernant l'antigène KEL3, aucun prélevé homozygote n'a pu être identifié. Cependant, les populations hétérozygotes KEL3 A et KEL3 G ont parfaitement été détectées avec l'anticorps Sp4294FJ4. Ceci illustre, après agglutination des échantillons phénotypés, comment une fois que ceux réactifs pour la construction de panel, un échantillon qui a une fréquence de l'antigène KEL3 observée (2,3%) lors de cette étude correspond aux données de la littérature.

**CONCLUSION**

En conclusion, les réactifs formulés sur la base des anticorps monoclonaux humains de classe IgM P3276R3 (anti-RH8) et Sp4294FJ4 (anti-KEL3) permettant l'identification à moyen débit des phénotypes RH8 et KEL3 des donneurs. D'autres réactifs utilisables avec cet automate sont en cours de développement dans les systèmes Duffy, MNDS et Kidd pour compléter l'offre.



Mise au point d'un réactif de phénotypage anti-Colton 1 pour automate PK et technique gel filtration.

Yannic Danger, Sophie Danard, Pascale Jégo, Christophe Bernard, et Franck Vérité

# Nouvelles méthodes de génération d'anticorps monoclonaux

**Toujours se renouveler**

## 1) Anticorps recombinants

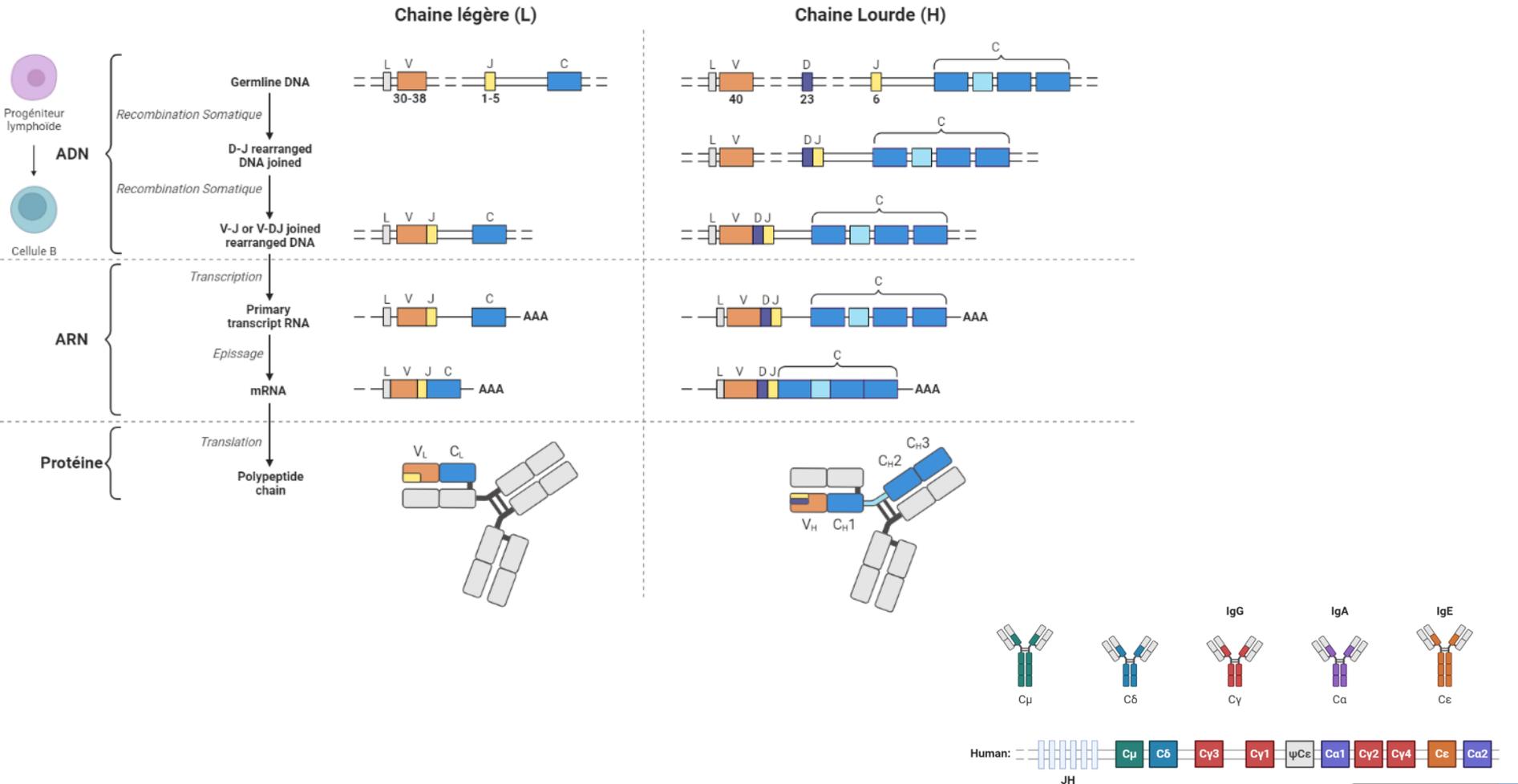
Diversification du patrimoine par clonage des régions variables des AcM à disposition dans des cellules hôtes permettant une modification d'isotype (IgG → IgM) et une forte capacité de sécrétion

## 2) Edition du génome

Intégrer dans le génome de cellules productrices des séquences spécifiques pour des Ac d'intérêt (diagnostic ou thérapeutique)

# Les anticorps recombinants

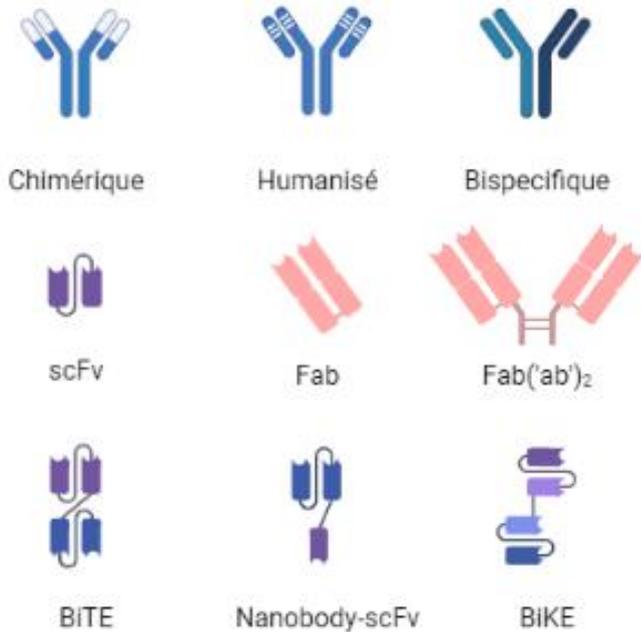
## Quelques rappels



Created in BioRender.com bbo

# Les anticorps recombinants

## Une multitude de possibilités



platform	DEEK	ART-Ig	CrossMab	DuoBody	Ortho-Fab
structure					
BsAb	MCLA-128	ERY974	RG7716	JNJ-63709178	LY3164530
platform	SEED	Knobes-into-holes	DAF	Wuxibody	DVD-Ig
structure					
BsAb	C225-GA/AG	M802	MEHD7945A	WBP3248	ABT-165
platform	FIT-Ig	TcBsgG	Triomab	XmAb	DART
structure					
BsAb	EMB01	FGFR1×KLB	Catumaxomab	Plamotamab	Flotetuzumab
platform	TandAbs	Bi-Nanobody	BiTE	HLE-BiTE	
structure					
BsAb	AFM13	TS-152	Blinatumomab	AMG 673	

Ma J et al., Front Immunol. 12 - 2021

# Exemple : Anticorps anti-FY1 IgM

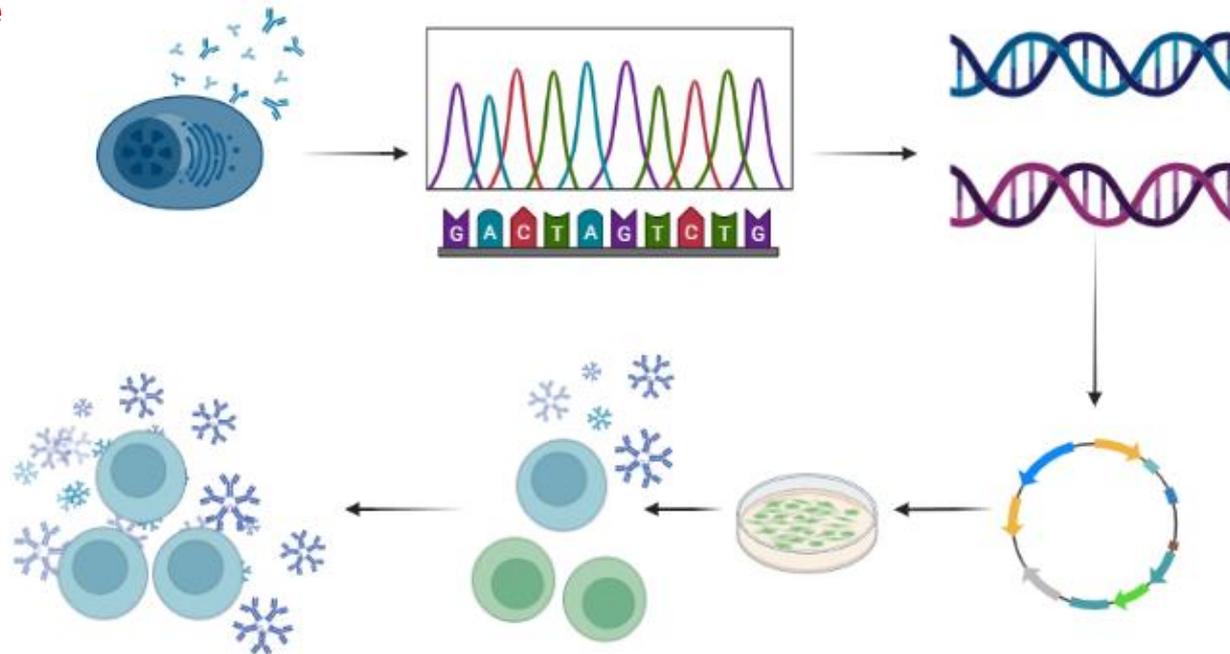
## Contexte

Echecs immunisation souris

Difficulté d'obtention prélèvement (immunisation récente)

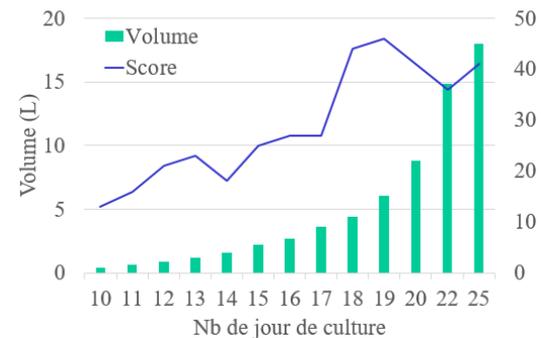
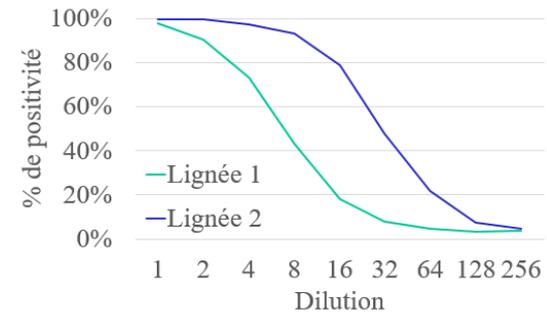
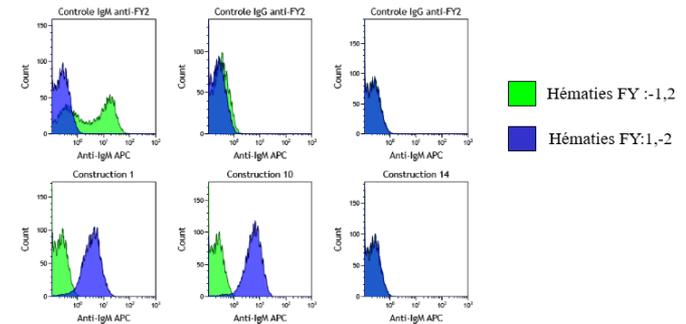
Plusieurs AcM humain anti-FY1 IgG disponibles

## Stratégie



# Résultats

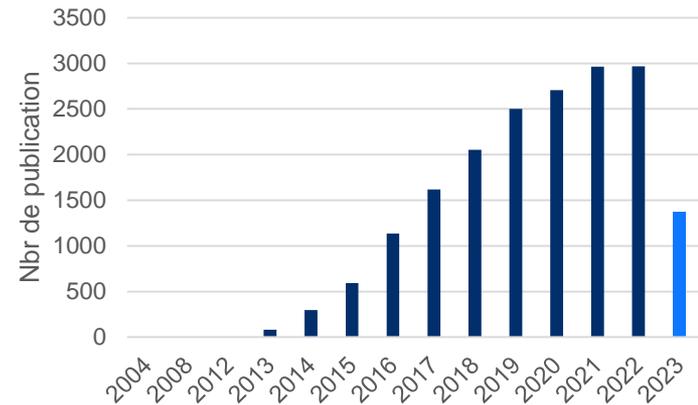
- Génération de 2 lignées exprimant un anticorps recombinant IgM anti-FY1
- Etude de stabilité conforme sur 80 jours de culture
- Capacité de production validée
- Optimisation de la lignée en cours pour améliorer le taux de sécrétion



# Edition de génome pour la modification d'hybridome

## CRISPR Cas9

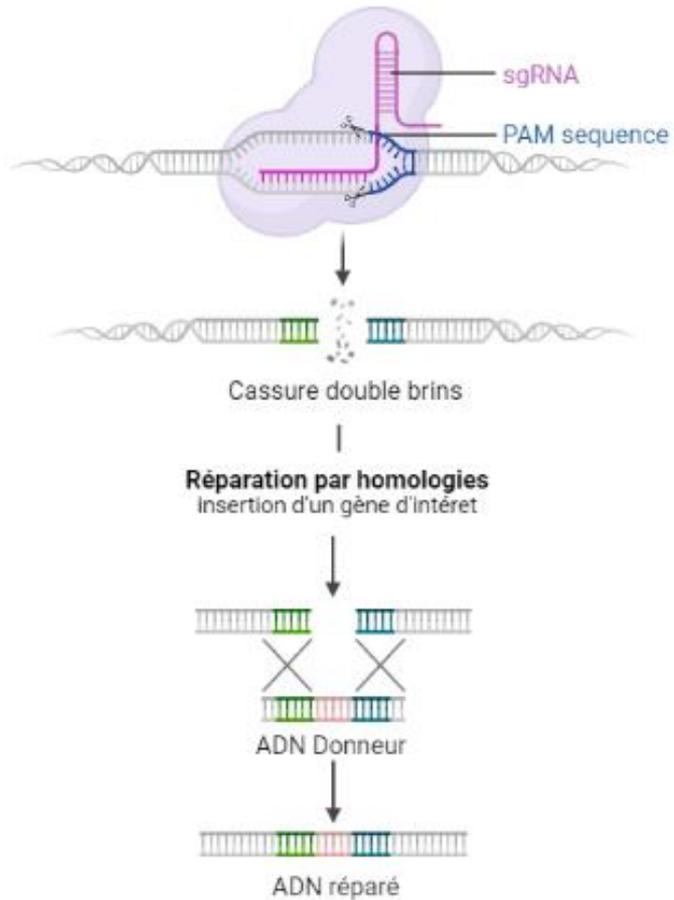
- Nouvelle méthode en pleine expansion
- Prix Nobel de chimie 2020 (JA Doudna et E Charpentier)
- Utilisation du système de défense des bactéries



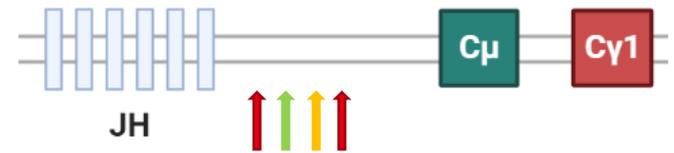
- Modification de l'isotype de l'anticorps : Substitution de la séquence Cgamma par une séquence Cmu dans des hybridomes établis
- Modification de la physiologie de la cellule (ex : voie métabolique)
- Modification du type d'anticorps sécrétés (ex : anticorps thérapeutiques dans des cellules B)

# Edition du génome

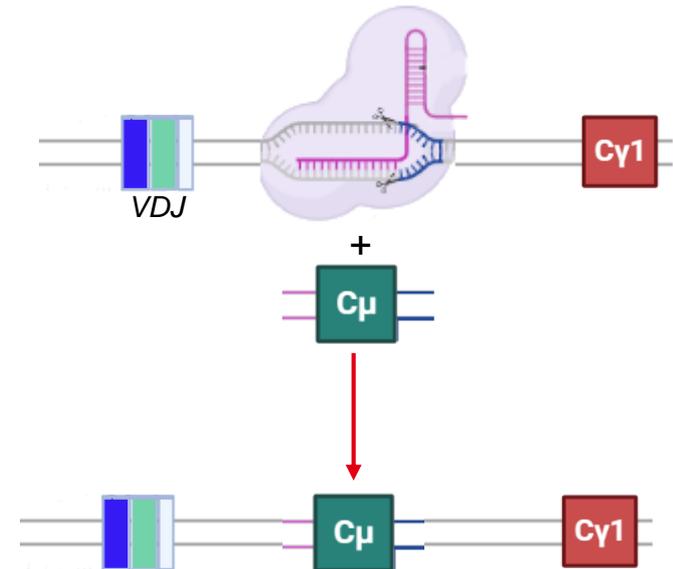
## Comment ça marche ?



### A) Choix de la séquence cible



### B) Intégration de la cassette au locus

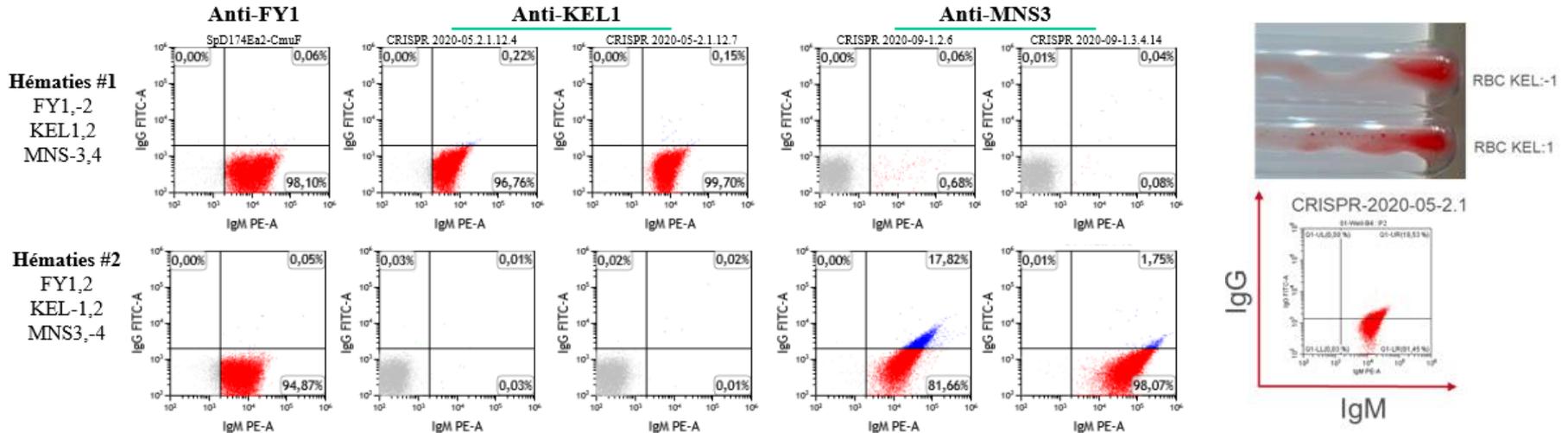


# Edition de gène: Retro-switch des hybridomes

## Des résultats prometteurs

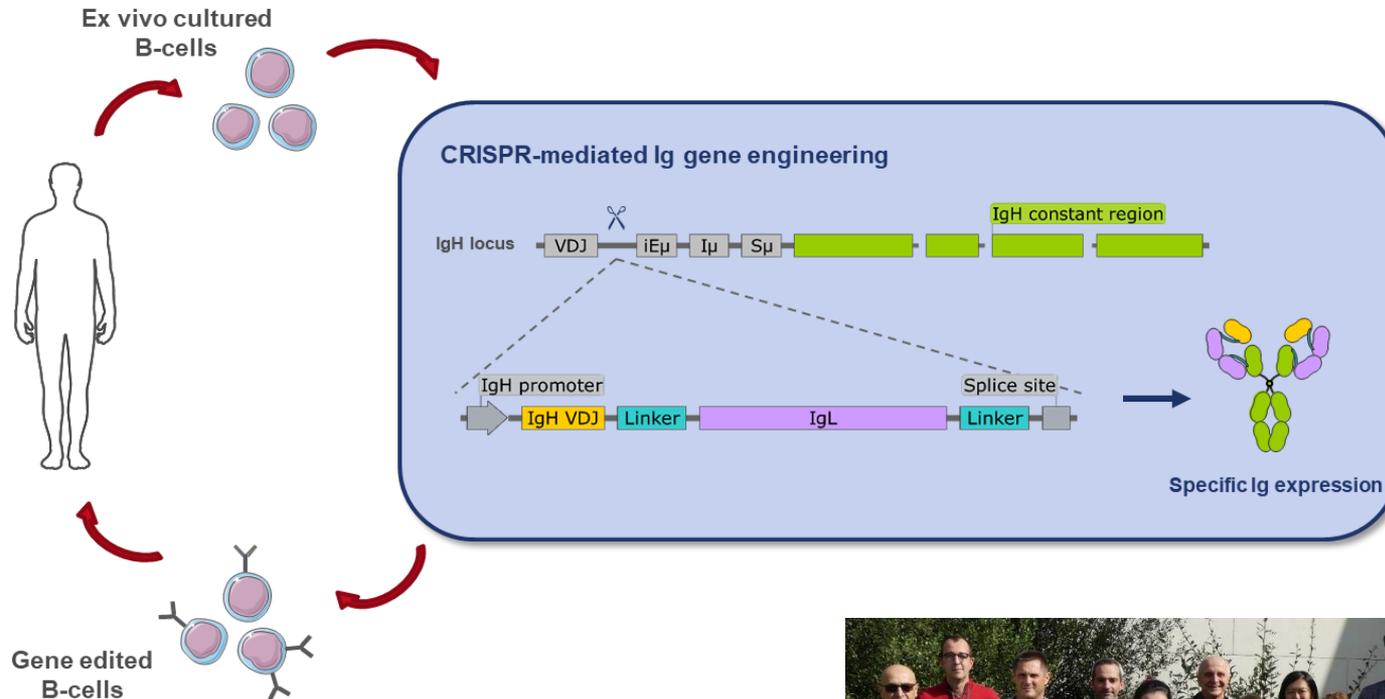
Validation du procédé de remplacement de la chaîne lourde avec 3 hybridomes différents

Etude et caractérisation des lignées obtenus en cours => impact sur la sécrétion et croissance cellulaire



# Edition du génome : application thérapeutique

## Projet BAR-B



Ueda, N., Cahen, M., Danger, Y., Moreaux, J., Sirac, C., & Cogné, M. (2021). Immunotherapy perspectives in the new era of B-cell editing. *Blood Advances*, 5(6).



### Team 3: BIGRES

#### M Cogné

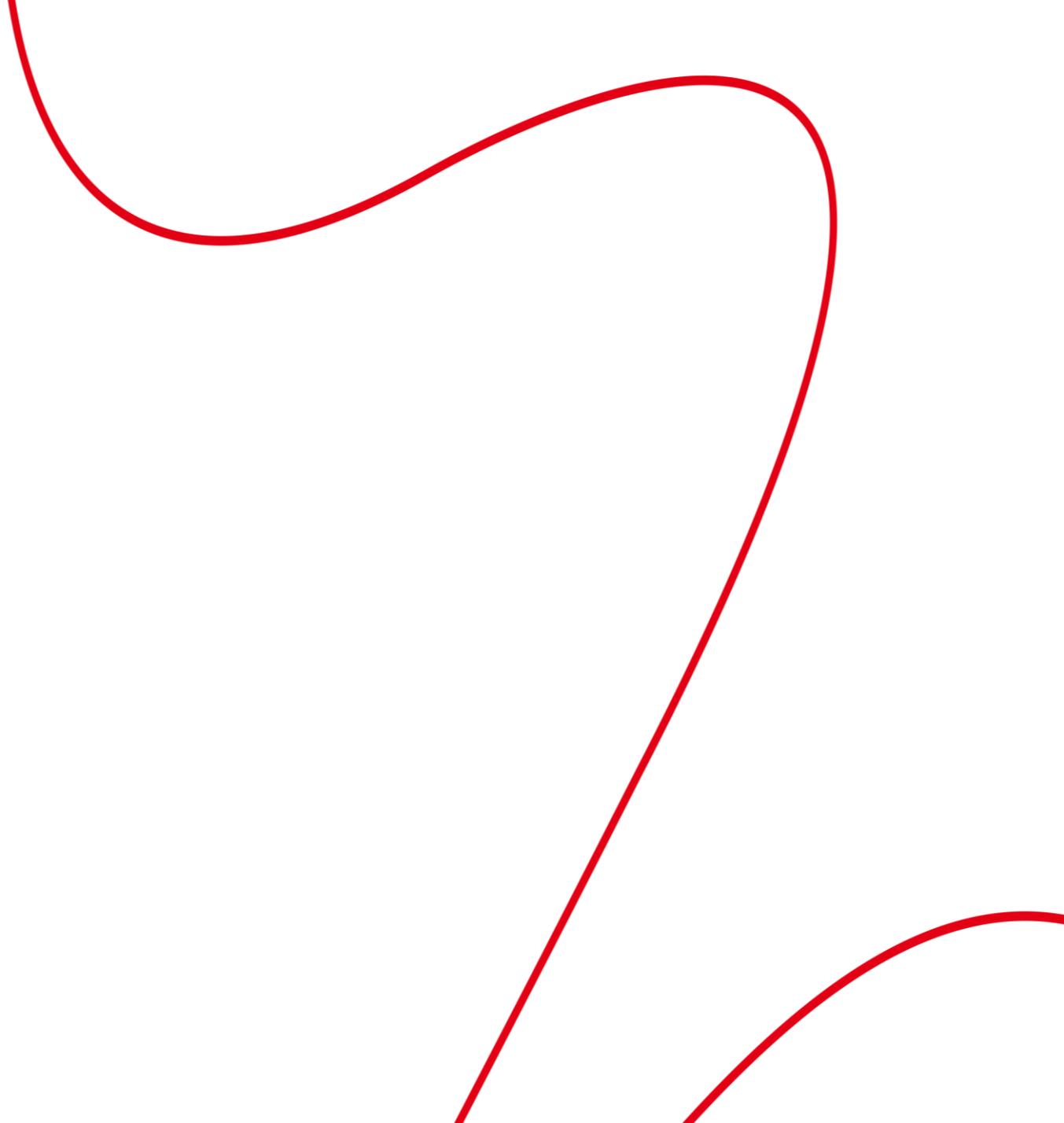
**RESEARCHERS**  
 R Houot, PU-PH  
 B Laffleur  
 G Noël EFS

**STAFF**  
 L Deleurme, AI UR1 (50%)  
 Y Danger, IR EFS  
 N Ueda, IR EFS\*

#### POST-DOC

**PHD**  
 M Cahen  
 O Dèze





# MERCI !

## **CONTACT**

Yannic DANGER  
yannic.danger@efs.sante.fr  
+ 33 (0)2 99 54 83 43