

université  
PARIS-SACLAY

FACULTÉ DE  
PHARMACIE

UEL343 - UE libre DGFSP3

Du fondamental à l'appliqué : exemple de la biologie vasculaire

# Les nanobodies, une nouvelle classe d'anticorps thérapeutiques

François SALLER

[francois.saller@universite-paris-saclay.fr](mailto:francois.saller@universite-paris-saclay.fr)

Jeudi 31 Octobre 2024



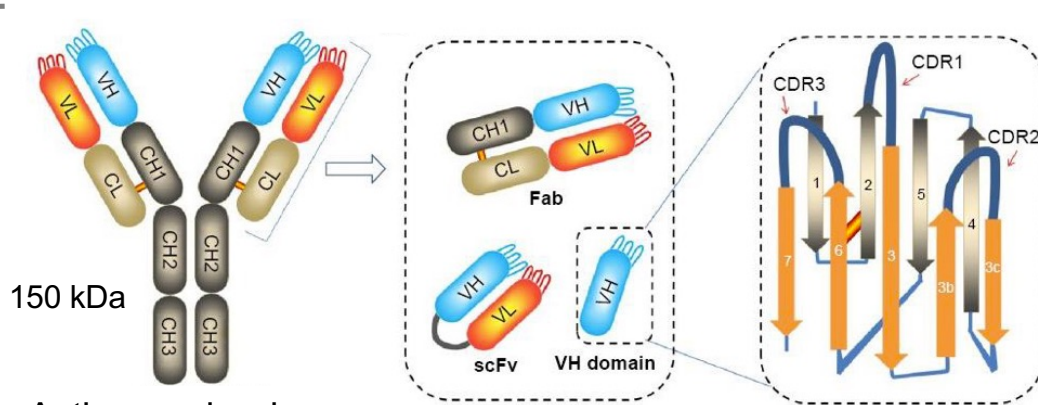
**HiTh**  
INSERM UMR 1176  
Hémostase  
Inflammation - Thrombose

**Inserm**  
La science pour la santé  
From science to health

université  
PARIS-SACLAY

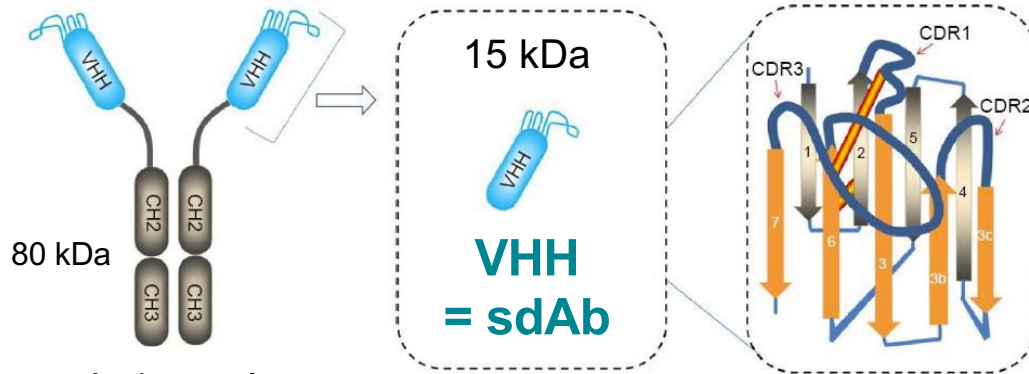
# Les « nanobodies » ou « anticorps à domaine unique » (sdAb)

Camelidés  
(Llama)



150 kDa

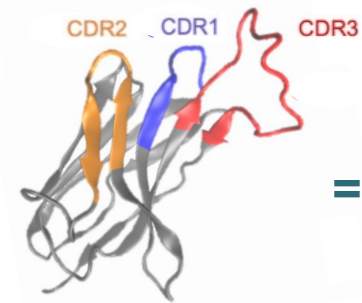
Anticorps classiques



80 kDa

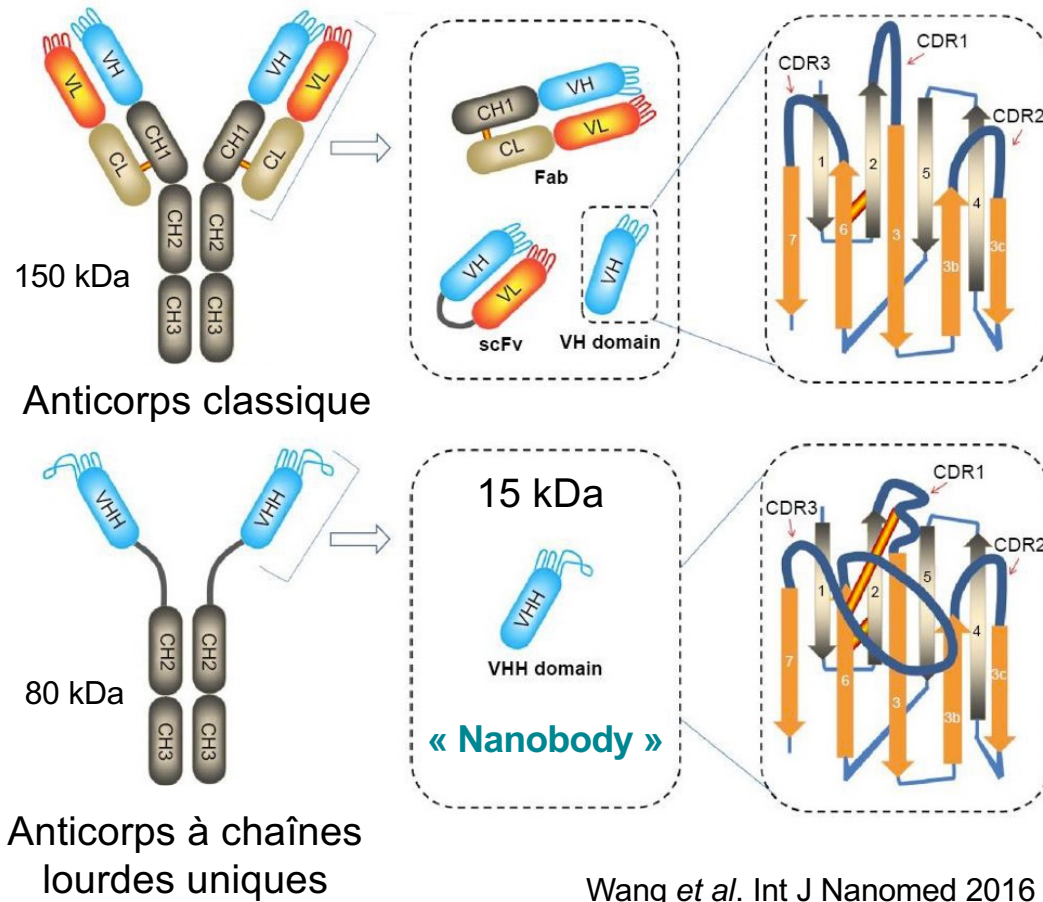
Anticorps à  
chaînes lourdes  
uniques

Wang *et al.* Int J Nanomed 2016



**VHH**  
= sdAb  
= Nanobody®  
(15 kDa)

# Avantage des nanobodies



Petits, stables, solubles à fortes concentrations

Forte pénétration tissulaire

Production à grande échelle dans *E. coli*

Faible **immunogénicité** *per se*

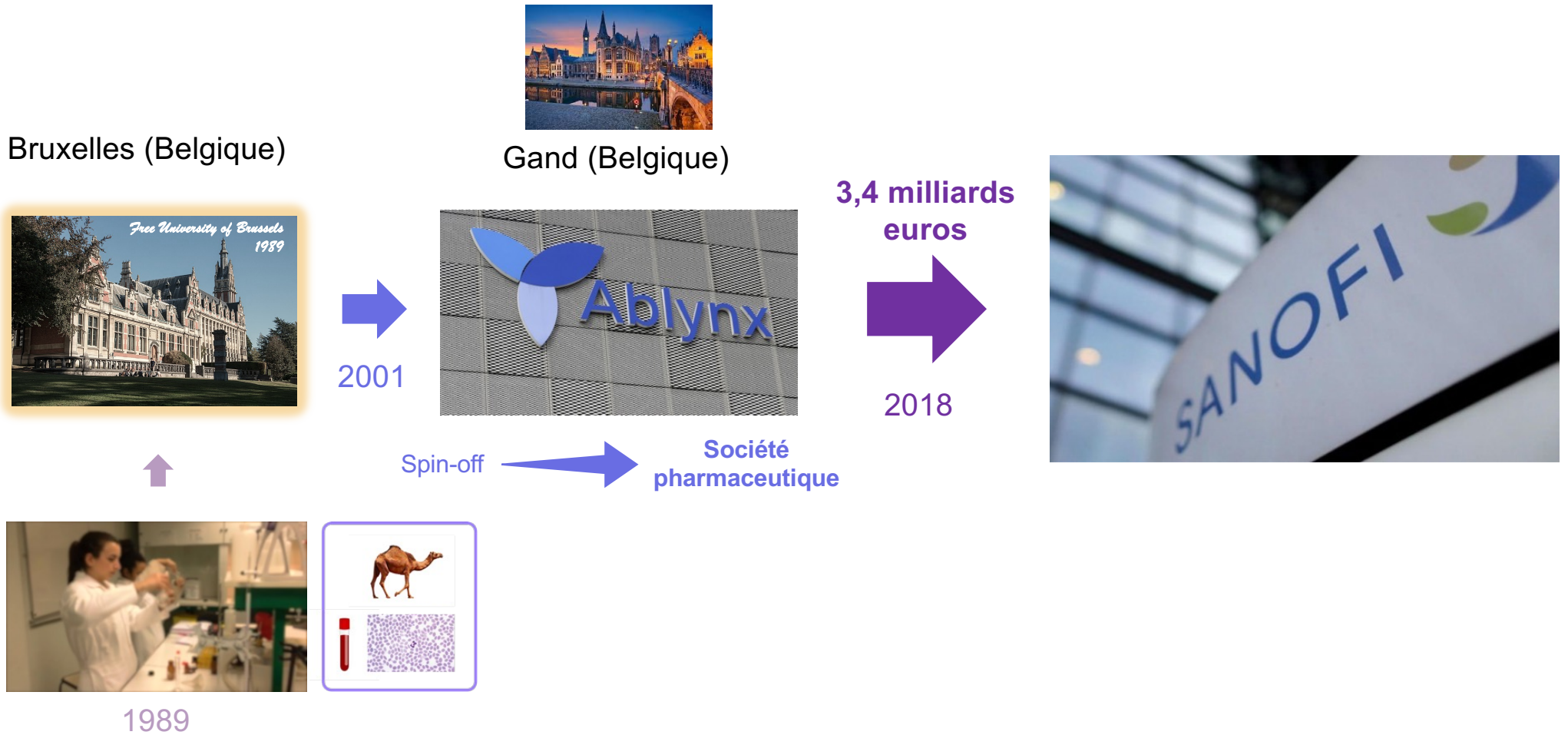
**Ingénierie** facile

Reconnaissance d'**épitopes cryptiques & originaux**

Peuvent être facilement identifiés par **phage-display**



# Développement pharmaceutique des Nanobodies®



# Développement pharmaceutique des Nanobodies®

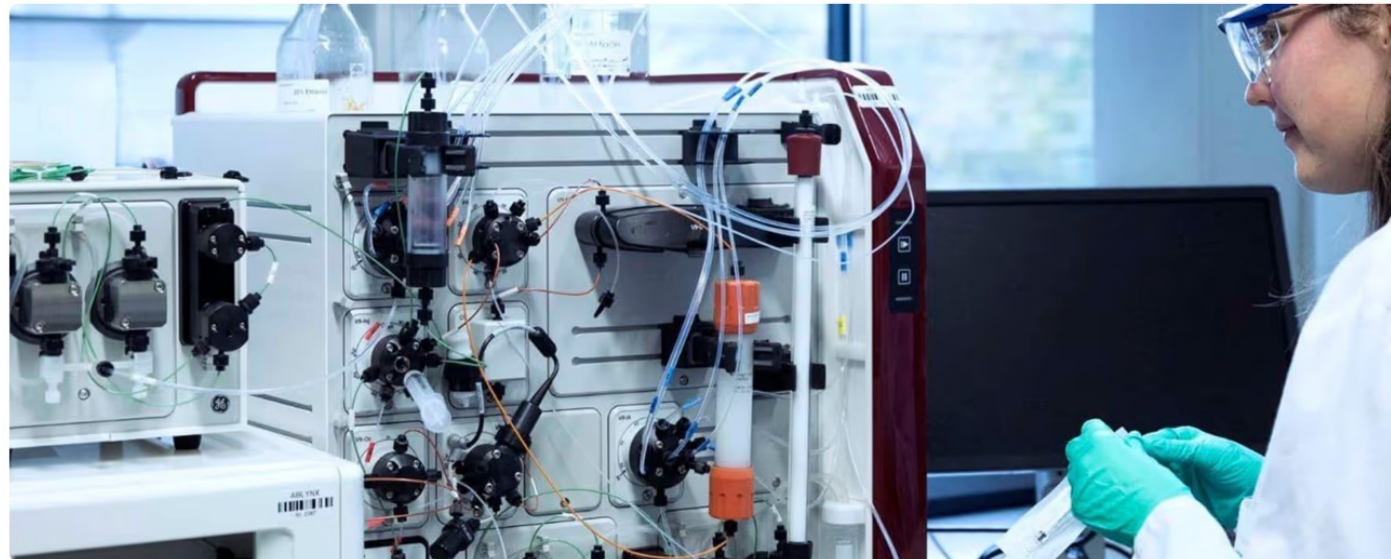
sanofi

Our Company Our Science Your Health Partnering

Media Investors Careers Paris 2024

## NANOBODY® Technology Platform

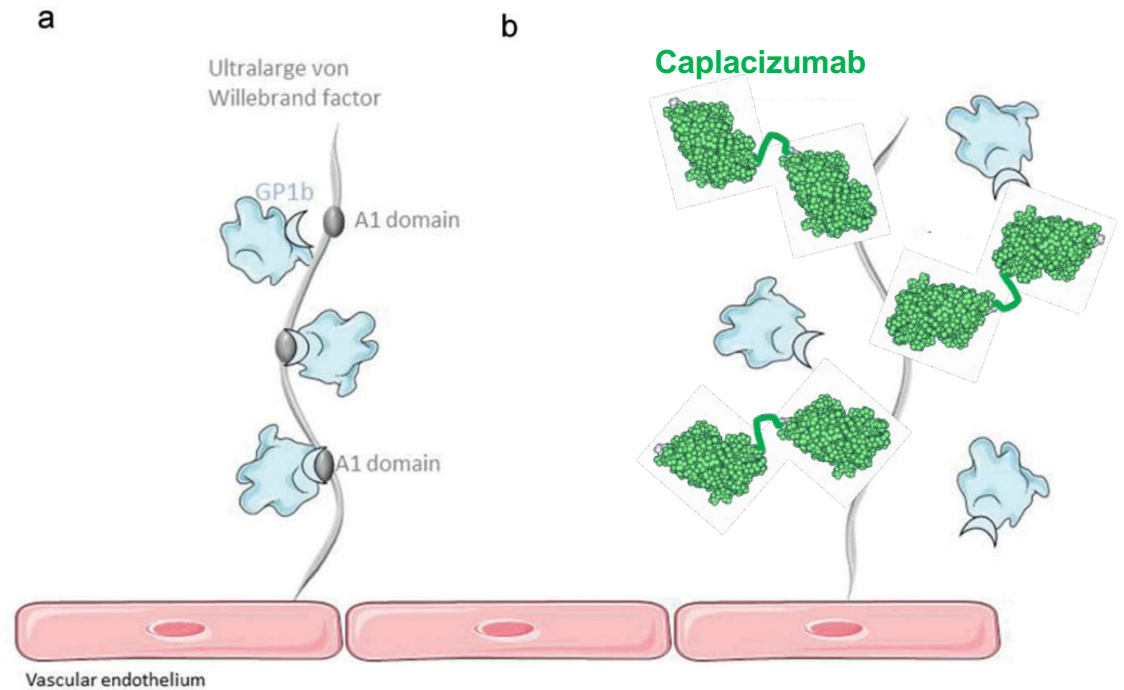
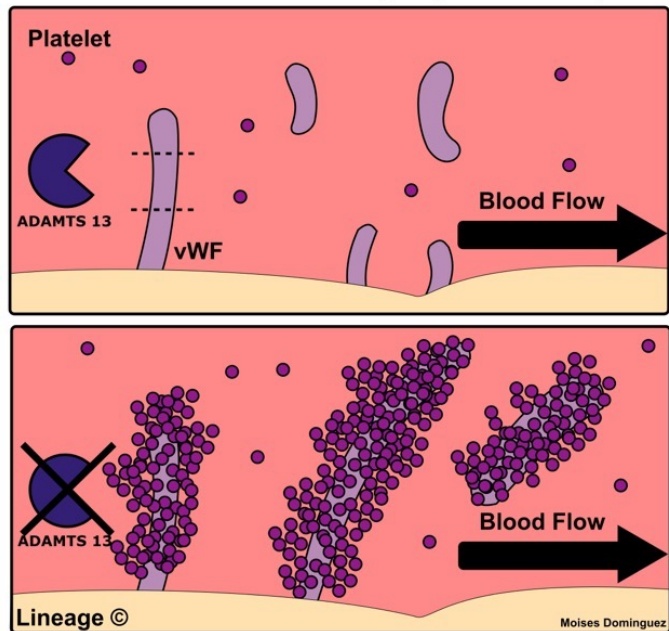
Published on: February 1, 2021



<https://www.sanofi.com/en/magazine/our-science/nanobody-technology-platform>

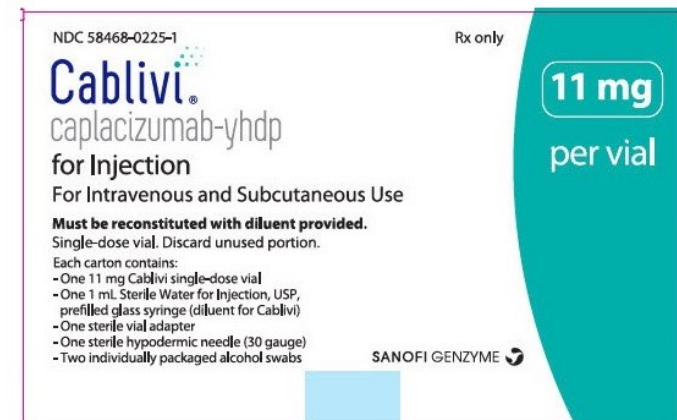
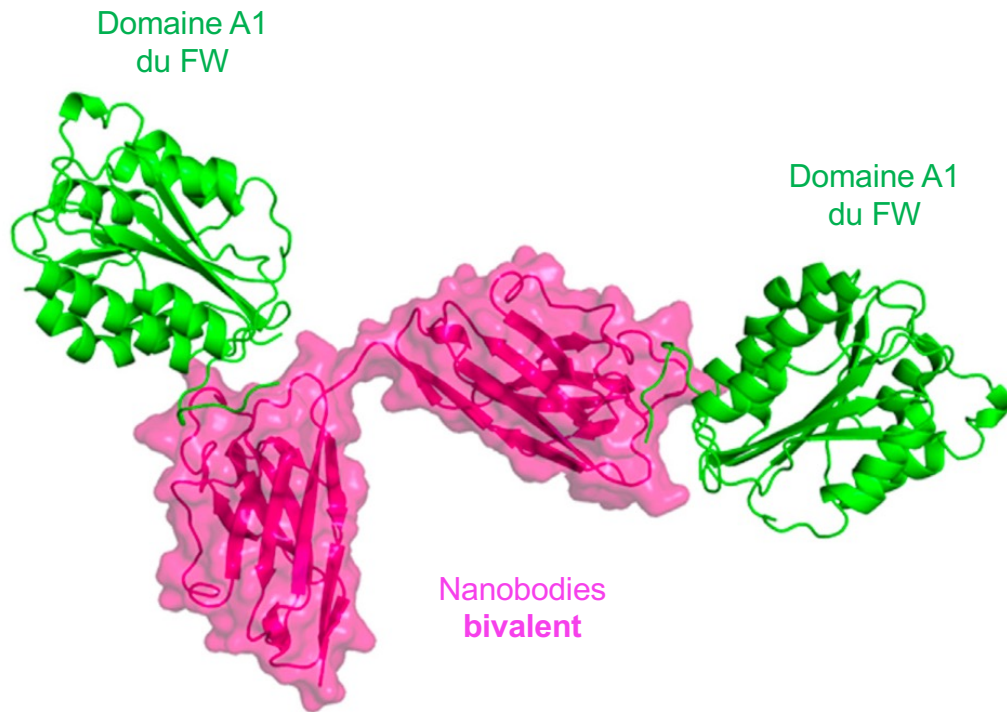
# Nanobodies en clinique : Caplacizumab

## Thrombotic Thrombocytopenic Purpura



Adapté de le Beresnais *et al.* Expert Opin Biol Ther 2019

# Nanobodies en clinique : Caplacizumab



# Nanobodies multi-spécifiques

---

Petits, stables, solubles à fortes concentrations

Forte pénétration tissulaire

Production à grande échelle dans *E. coli*

Faible **immunogénicité** *per se*

**Ingénierie** facile

Reconnaissance d'**épitopes cryptiques & originaux**

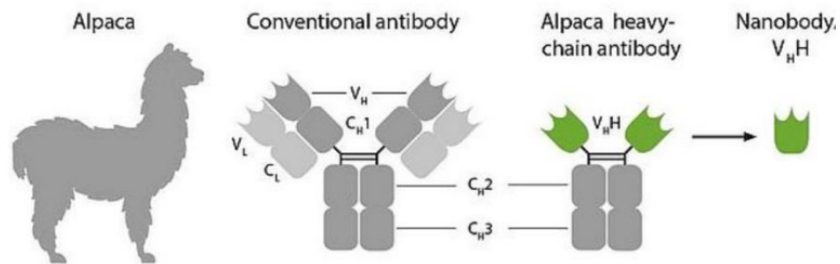
Peuvent être facilement identifiés par **phage-display**





# Nanobody anti-FW KB-V13A12

## Les nanobodies



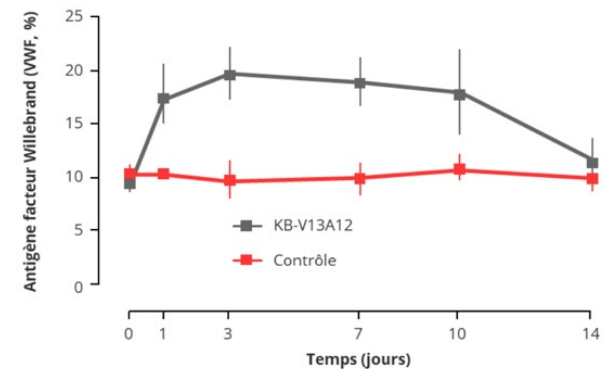
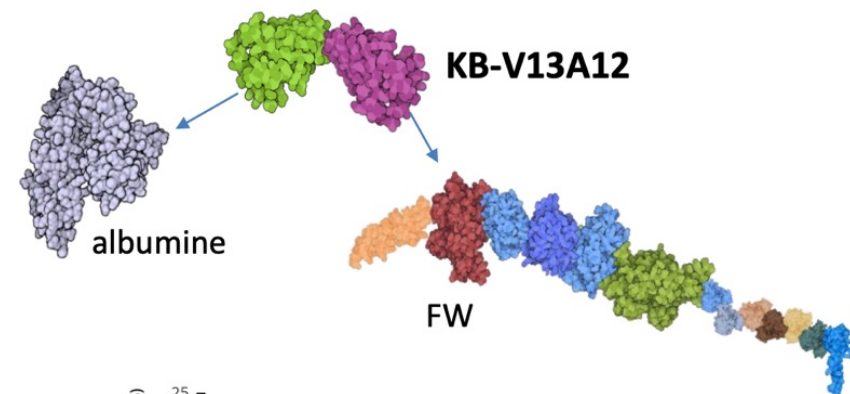
**Avantages** : facilité de production, petite taille, formats multivalents



Cours de Claire Auditeau

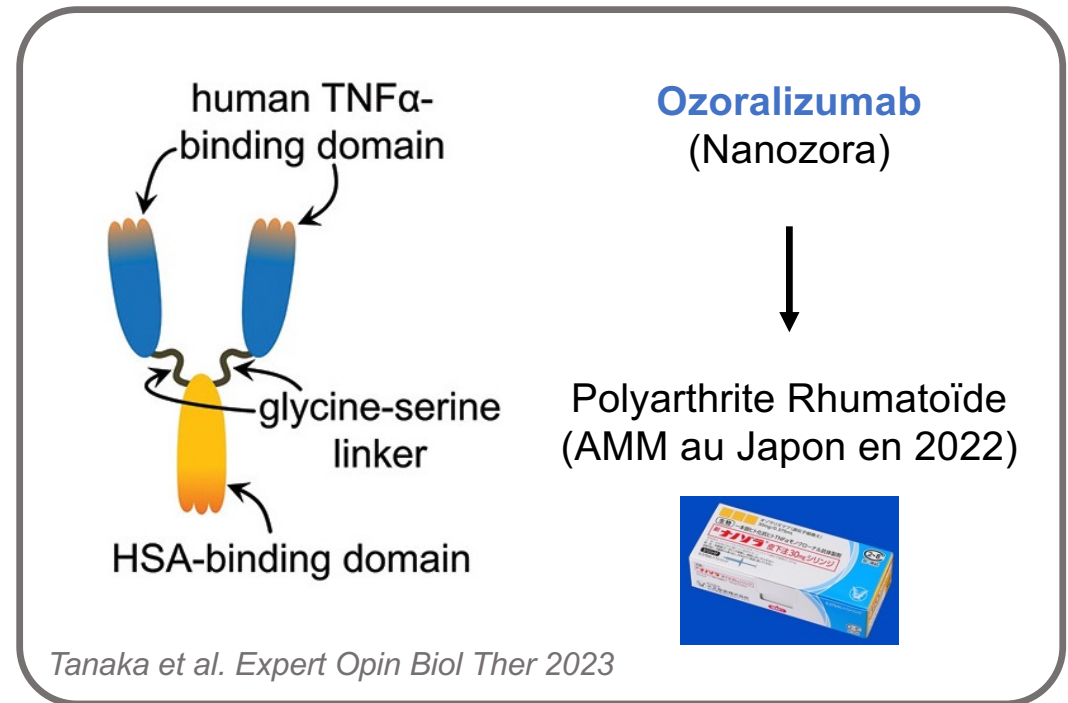
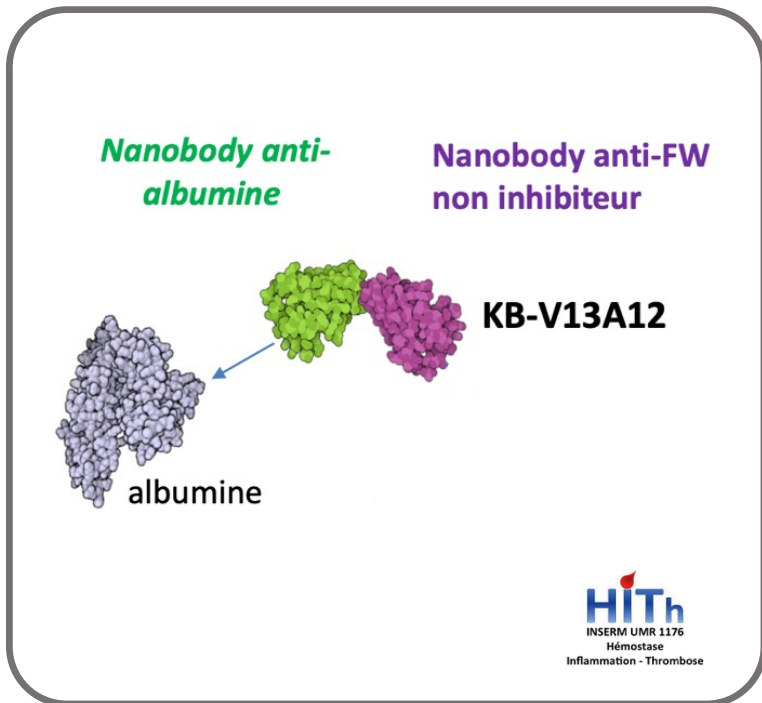
Nanobody anti-albumine

Nanobody anti-FW non inhibiteur



WF : pourcentage par rapport à un pool de plasma normal = % plasma normal

# Nanobodies en clinique : Ozoralizumab



# Développement de nanobodies dirigés contre la Protéine S

**HiTh**  
INSERM UMR 1176  
Hémostase  
Inflammation - Thrombose



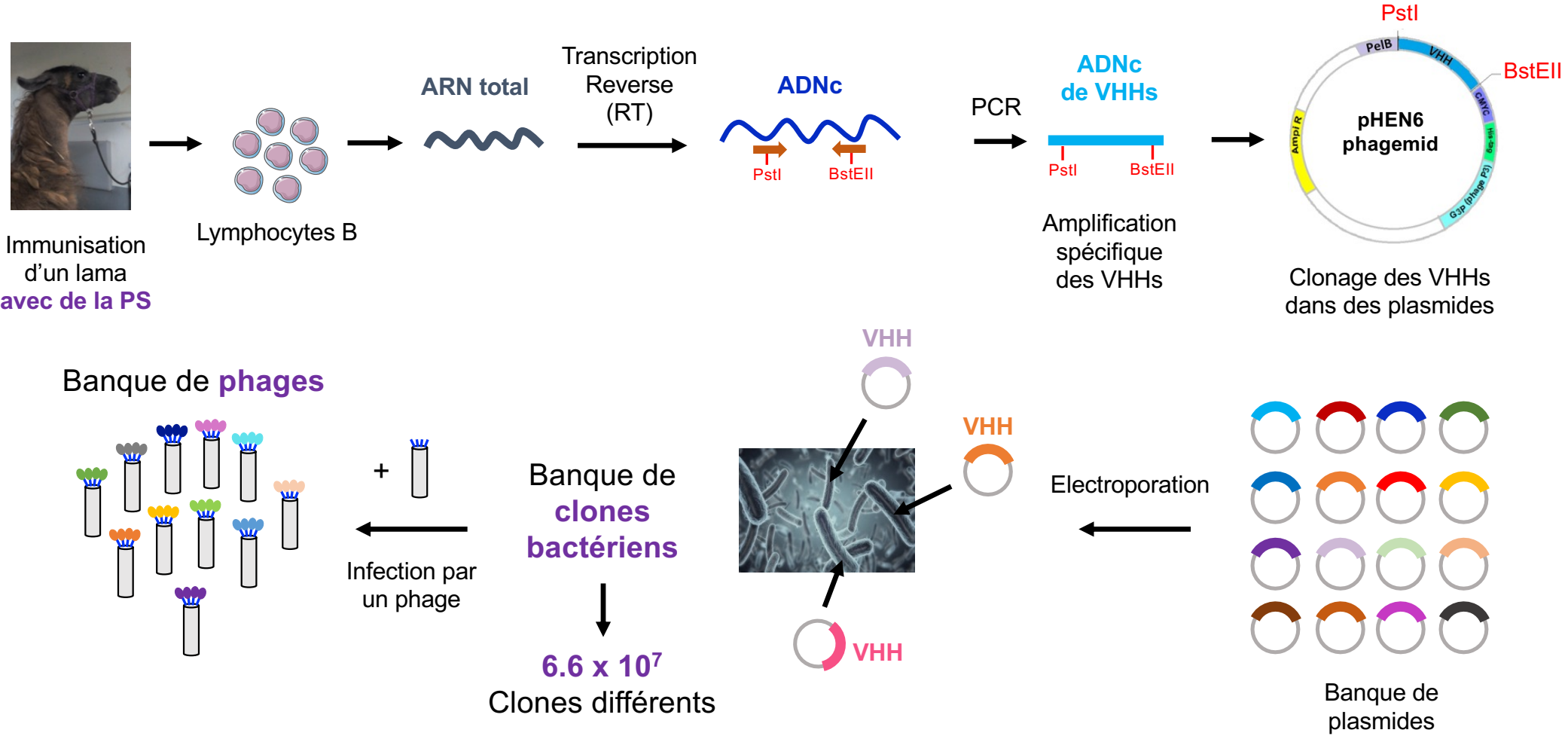
Nanobodies de lamas  
dirigés contre des  
protéines de l'hémostase



*Josepha Clara Sedzro*  
(Doctorante, 2018-2021)

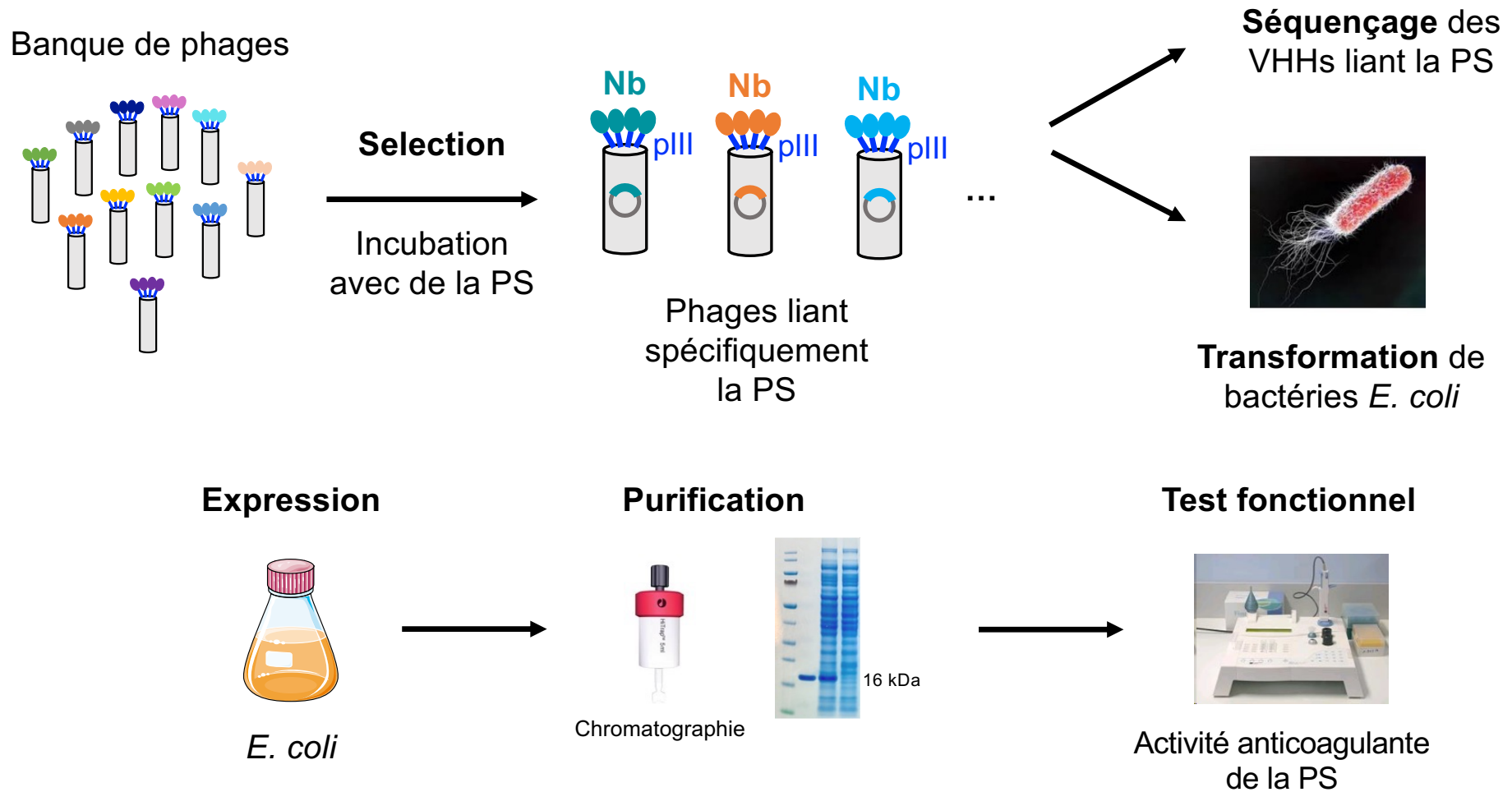
**Nanobodies de  
lamas dirigés contre  
la Protéine S**

# Préparation d'une banque « **immune** » de nanobodies

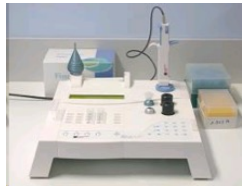




# Identification de nanobodies par phage-display

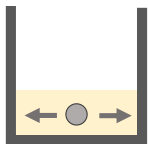


# Identification du nanobody PS003 potentialisant la PS



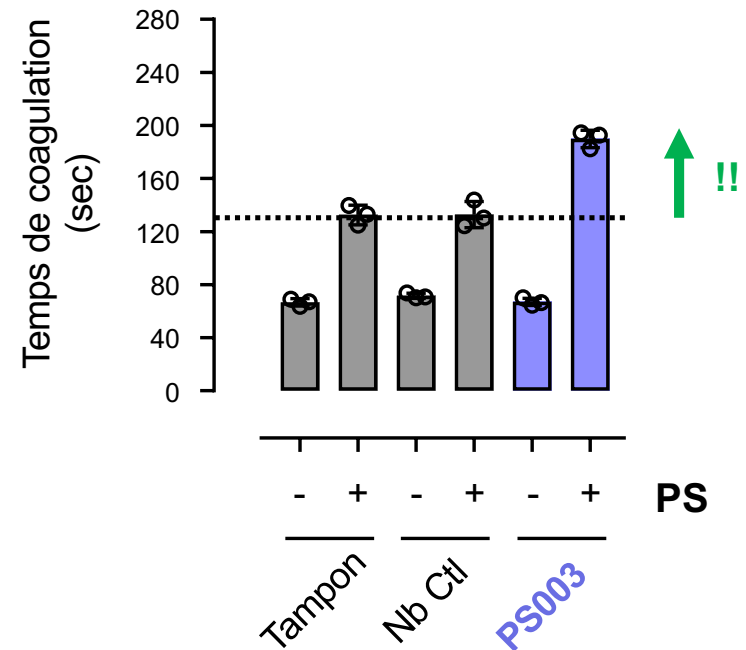
## Test d'activité anticoagulante de la PS

PS-déficient plasma  
(25  $\mu$ L)



- 1) VHH
- 2) + PS + PCa
- 3) + Réactif TCA
- 4) + Ca<sup>2+</sup>

Coagulation



Josepha Clara Sedzro

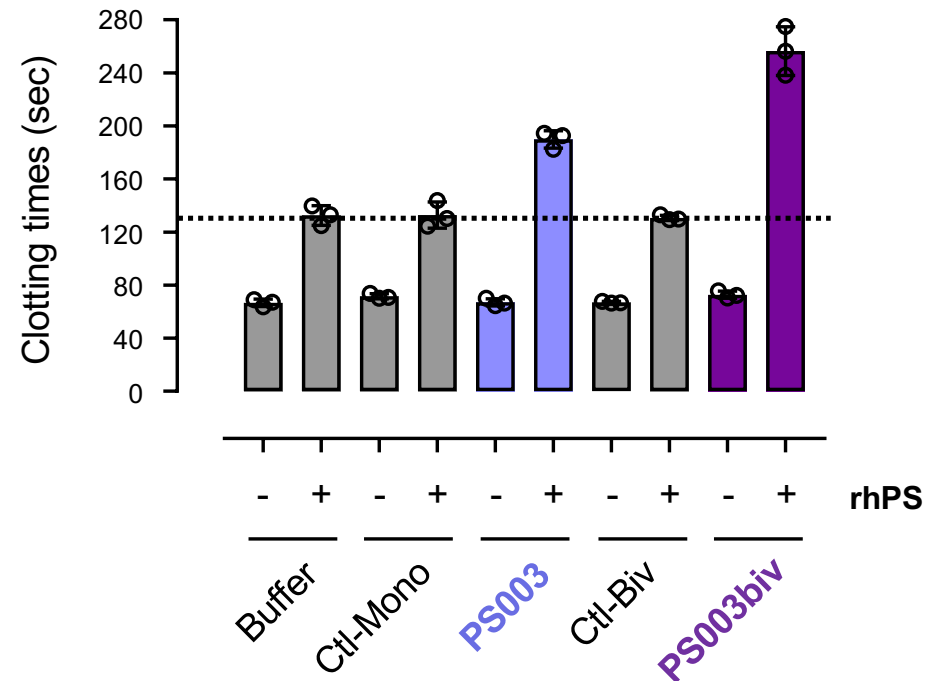
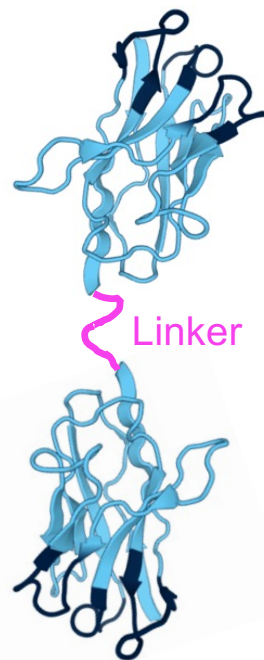
PS003 est un nanobody “agoniste” potentialisant la PS

# Génération du nanobody bivalent PS003biv

PS003  
Monovalent

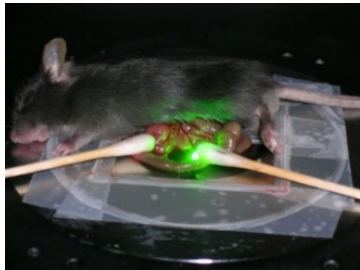


PS003biv  
Bivalent



Activité de **potentialisation augmentée** pour la forme bivalente (PS003biv)

# Effets antithrombotiques de PS003biv *in vivo*



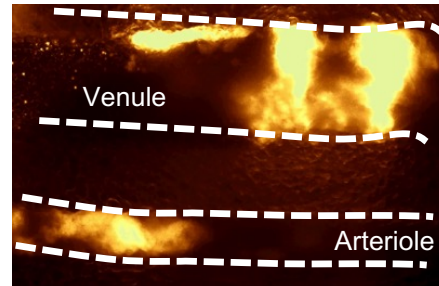
Frédéric Adam (UMR-S1176)



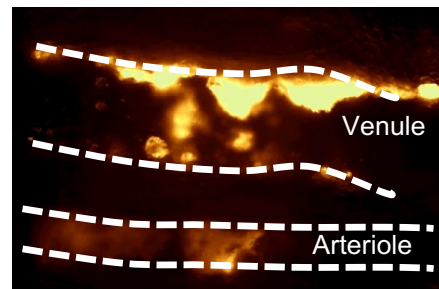
FeCl<sub>3</sub>

Li et al. JoVE 2016

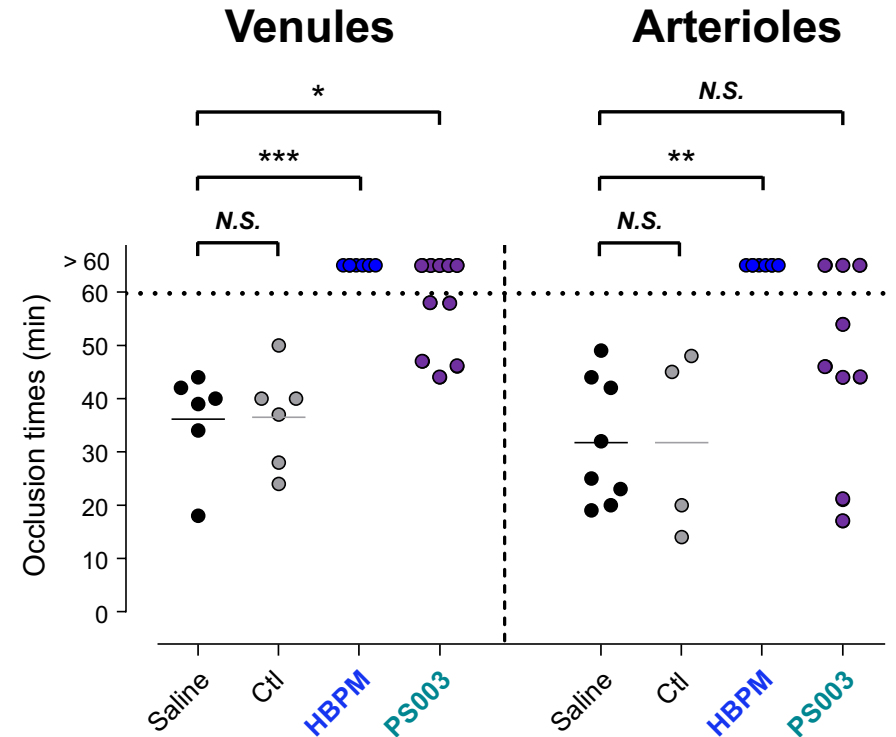
Ctl Nb



PS003biv



+ Fort taux d'embolisation pour PS003biv



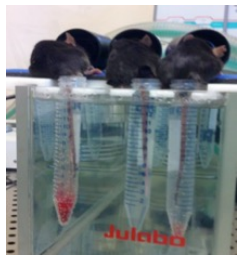
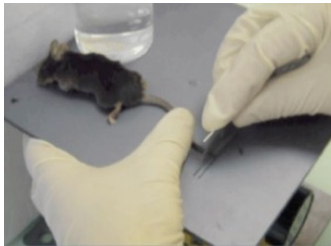
L'administration de PS003biv entraîne des **temps d'occlusion retardés**

associés à une **instabilité des thrombi** dans les microvaisseaux mésentériques

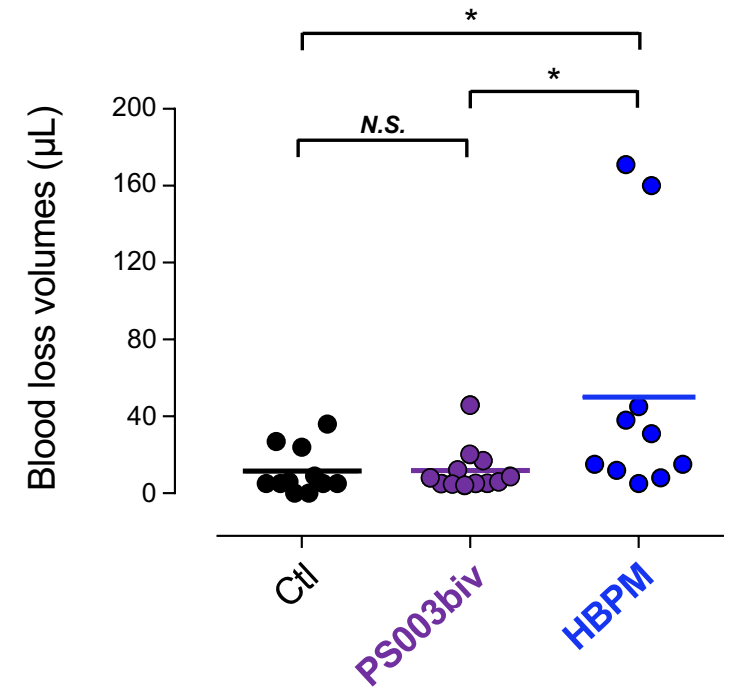
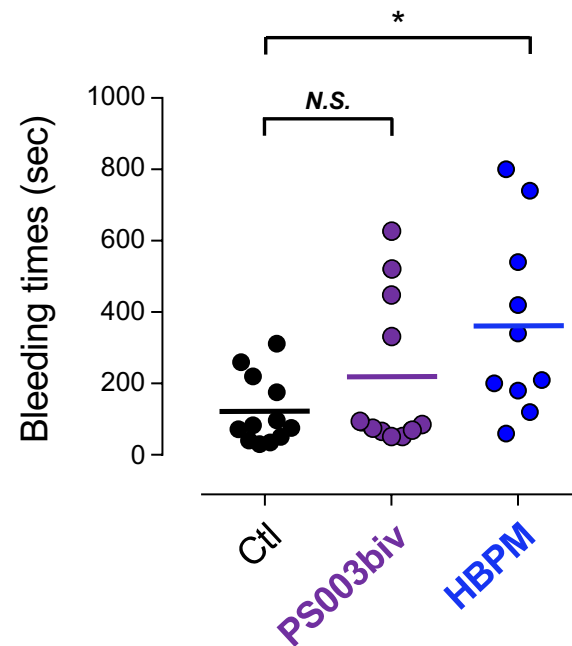


# Effets de PS003biv sur l'hémostase physiologique

## Modèle de saignement ("tail-clip")

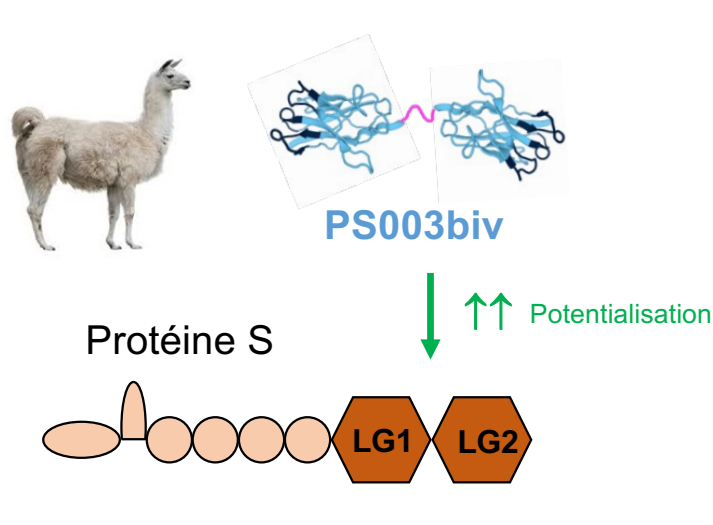


Cécile Denis, UMR-S1176



PS003 n'a **aucun effect significatif** sur les temps de saignement et les volumes de sang perdus

# Potentiel thérapeutique du nanobody anti-PS PS003biv



Stimule la fonction anticoagulante de la PS

Exerce des effets antithrombotiques chez la souris

N'affecte pas l'hémostase physiologique

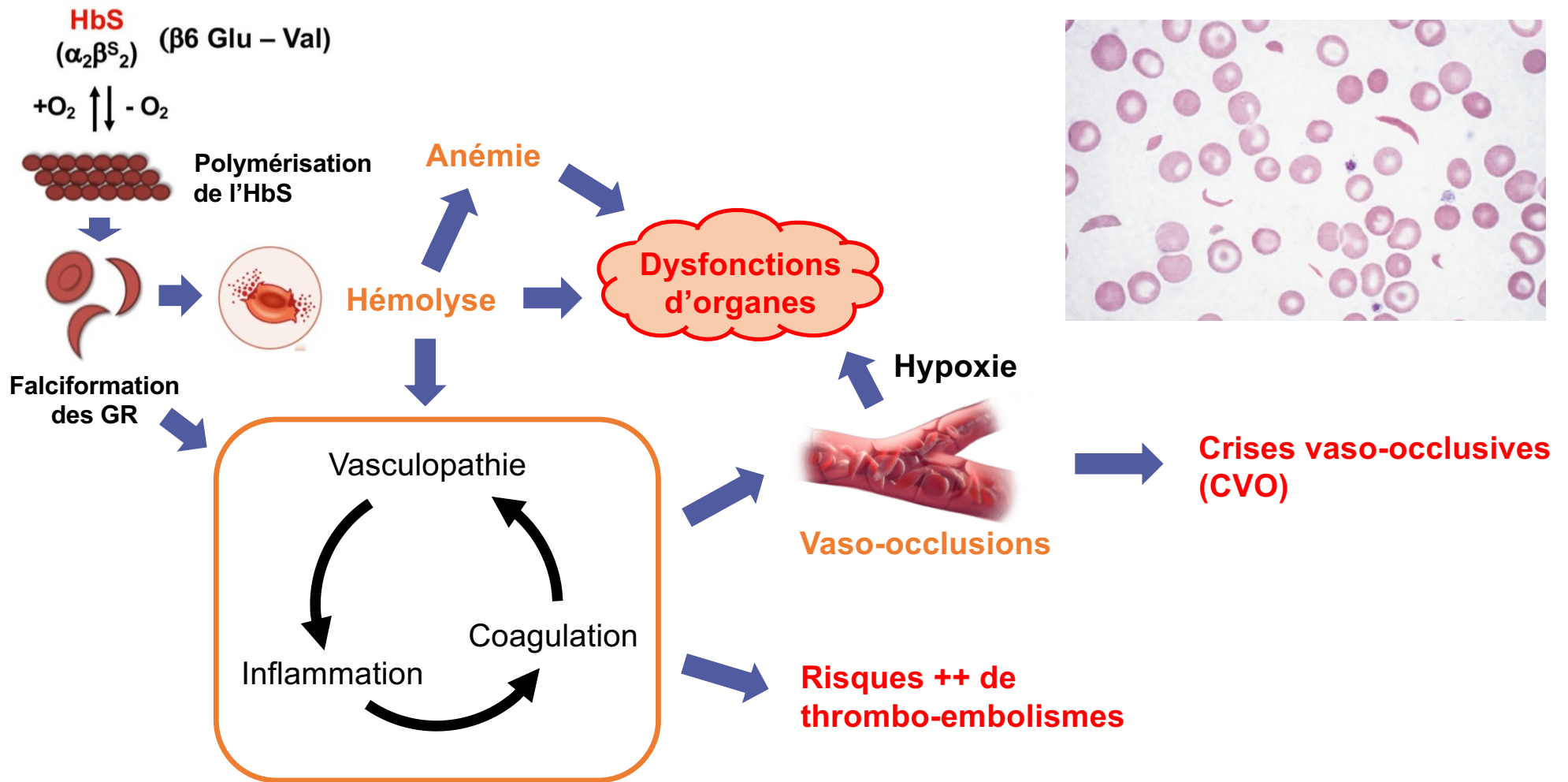
Potentiel thérapeutique dans

Des **maladies (thrombotiques)** avec :

- Défaut d'activation de la PC
- Résistance à la PCa
- Déficit acquis en PS et/ou en PC

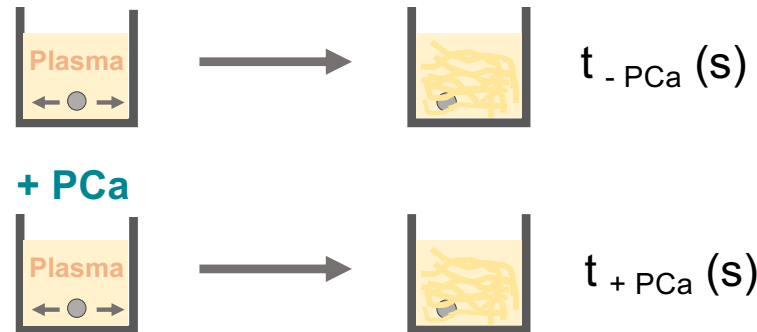
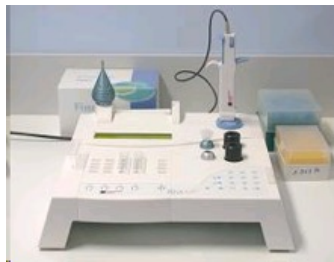
**Objectif :**  
Booster le système  
de la PCa/PS

# La drépanocytose : une hémoglobinopathie complexe



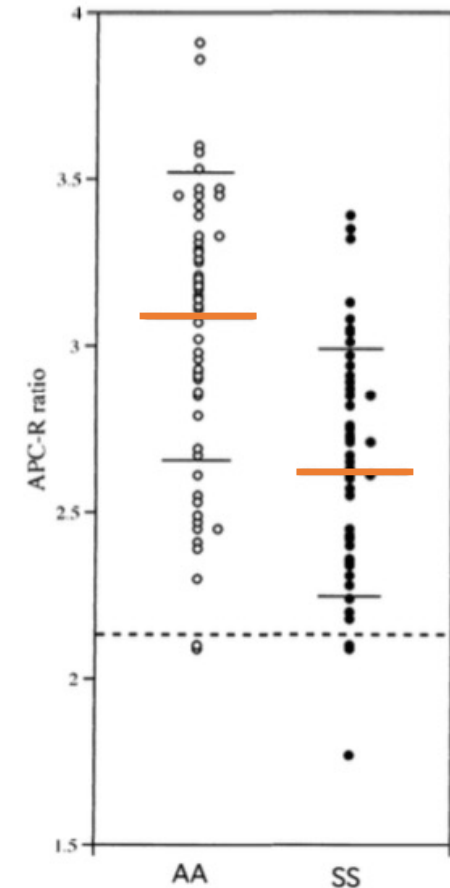
# Résistance à la PCa dans la drépanocytose

Mesure d'un **temps de coagulation plasmatique**  
en absence et présence de PCa



$$\text{APC Ratio} = t_{+PCa} \text{ (s)} / t_{-PCa} \text{ (s)}$$

Chez des **patients drépanocytaires (SS)**  
et contrôles (AA)





# Déficit acquis en protéine S (PS) dans la drépanocytose

Taux plasmatiques de PS réduits chez les drépanocytaires

Réduction accrue lors des CVO

**Table 1** Baseline blood and plasma characteristics in sickle cell disease (SCD) and control cohorts

	Control (n = 25)	SCD (n = 25)	P value
Baseline TAT (ng mL <sup>-1</sup> )	2.3 ± 1.1	10.2 ± 9.5	0.0004
phosphatidylserine+ RBCs (%)	0.26 ± 0.25	4.8 ± 4.0	<0.0001
Protein C (% activity)	126 ± 32	81 ± 21	0.0036
Protein S (% activity)	88 ± 18	53 ± 20	0.0005
Protein S (% free antigen)	81 ± 17	58 ± 18	0.0003
Factor V (% activity)	89 ± 21	97 ± 29	0.3027
Factor VIII (% activity)	112 ± 25	179 ± 45	0.0003
TFPI (% antigen)	86 ± 33	83 ± 24	0.6659

# Déficit acquis en protéine S (PS) dans la drépanocytose

Déficit en PS



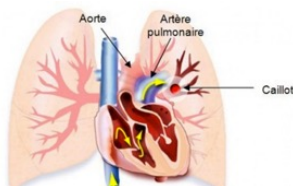
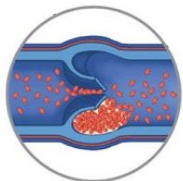
Perturbation du système PC/PS



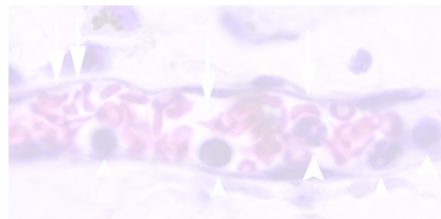
Etat Hypercoagulable  
dans la drépanocytose



Risque élevé de  
Thromboembolisme  
Veineux



Crises  
Vaso-Occlusives



Kalembur *et al.* Am J Hematol 2004

# Déficit acquis en protéine S (PS) dans la drépanocytose

Déficit en PS



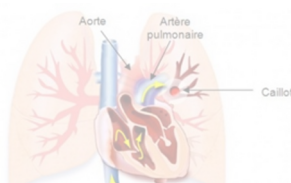
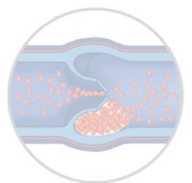
Perturbation du système PC/PS



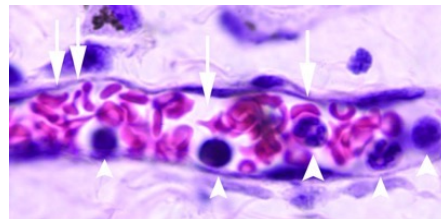
Etat Hypercoagulable  
dans la drépanocytose



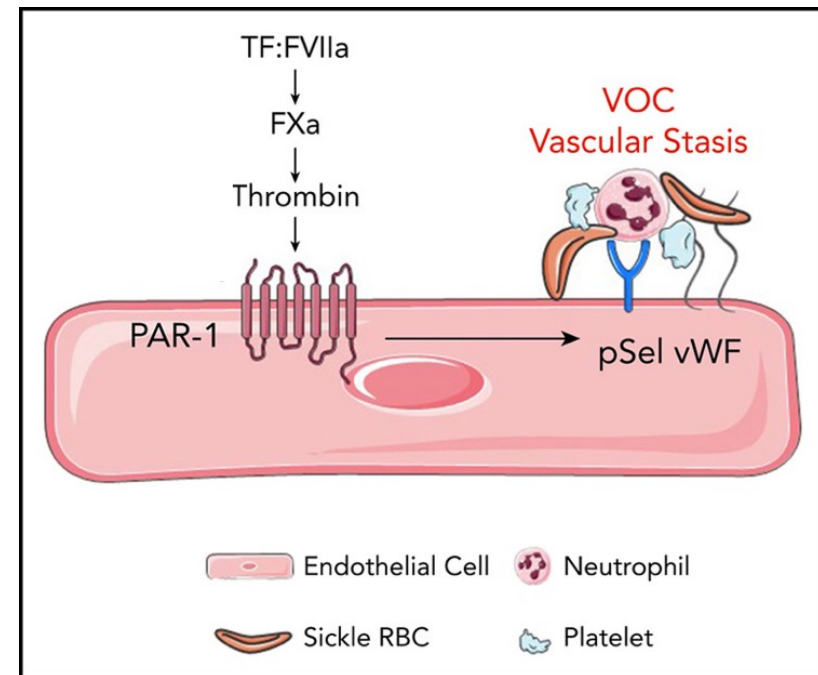
Risque élevé de  
Thromboembolisme  
Veineux



Crises  
Vaso-Occlusives



Kalembur *et al.* Am J Hematol 2004



Sparkenbaugh *et al.* Blood 2020

# Déficit acquis en protéine S (PS) dans la drépanocytose

Déficit en PS



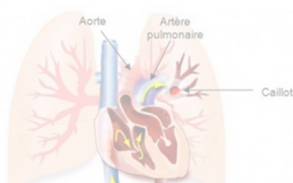
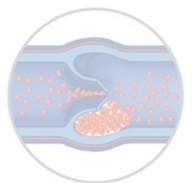
Perturbation du système PC/PS



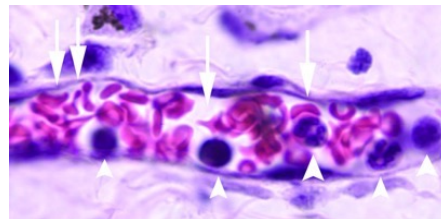
Etat Hypercoagulable  
dans la drépanocytose



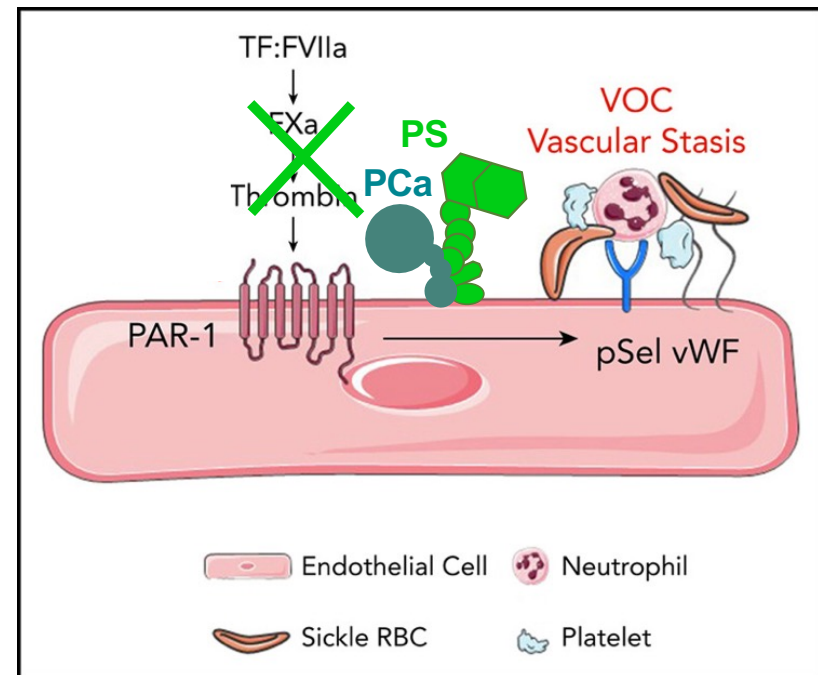
Risque élevé de  
Thromboembolisme  
Veineux



Crises  
Vaso-Occlusives



Kalembur *et al.* Am J Hematol 2004



Sparkenbaugh *et al.* Blood 2020

# Effets de PS003biv dans un modèle murin de CVO induite par **hypoxie**

**Souris  
Drépanocytaire  
(SS)**



Infusion IV  
de **PS003**  
(10 mg/kg) ou  
véhicule

1 h



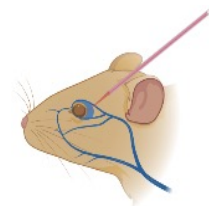
Hypoxie  
8% O<sub>2</sub>

3 h



Normoxie

1 h



Prélèvement  
de sang

+



Perfusion  
intracardiaque  
de PBS



Poumons

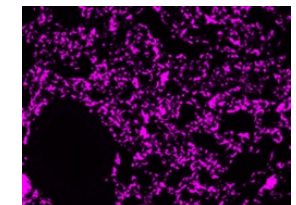


Foie



Falciformation,  
Hémolyse  
Adhésion  
Vaso-occlusion

Marqueurs plasmatiques  
d'**hémolyse**



Marquage des GR  
(Ter-119)

Quantification des  
**vaso-occlusions**

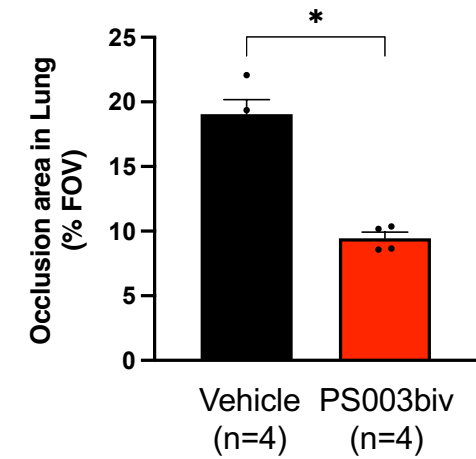
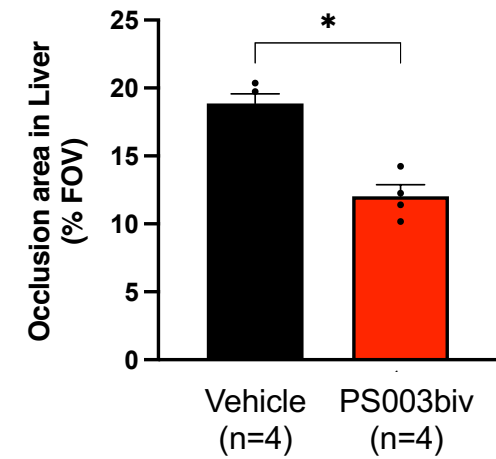
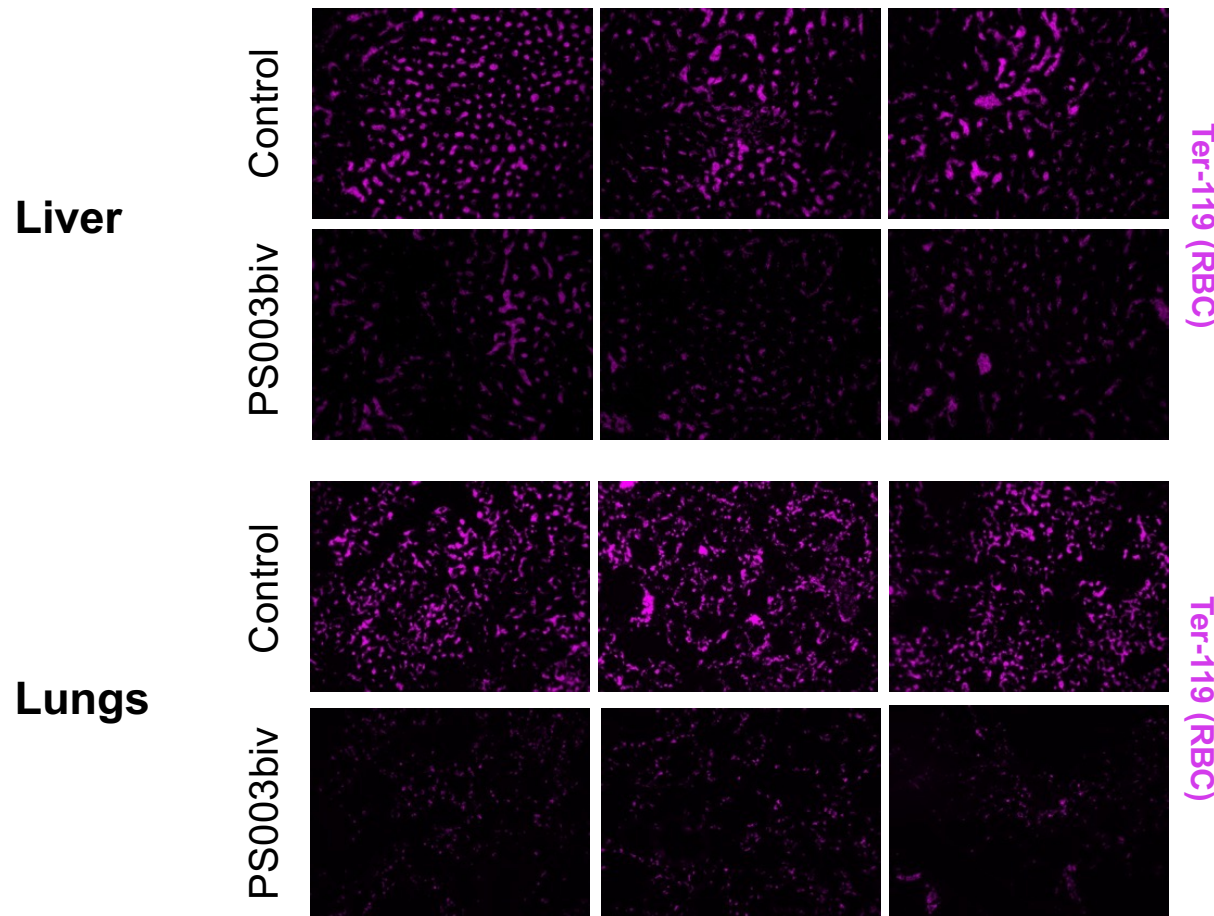


*Claire Auditeau*  
Doctorante  
2021-2024



*Thiago Maciel*  
UMR-S1163  
Institut Imagine, Paris

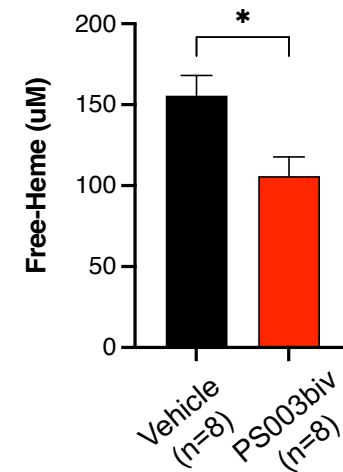
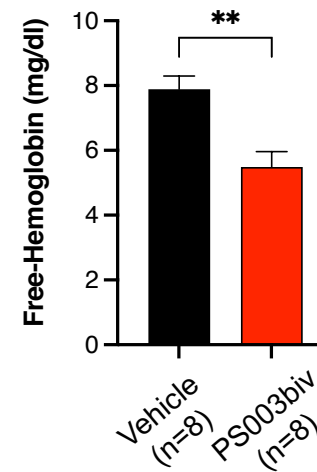
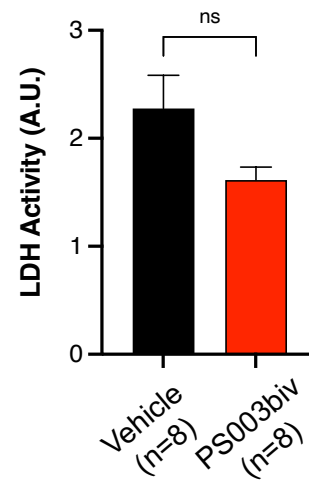
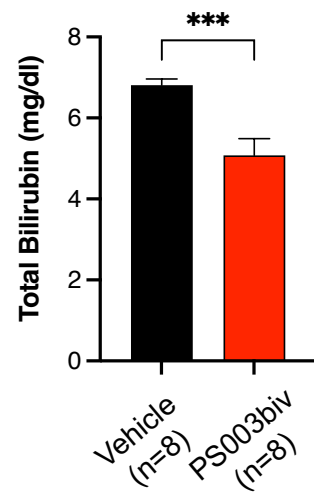
# Effets de PS003biv dans un modèle murin de CVO induite par **hypoxie**





# Effets de PS003biv dans un modèle murin de CVO induite par **hypoxie**

Réduction des marqueurs d'**hémolyse** par l'administration de PS003biv



# Effets de PS003biv dans un modèle murin de CVO induite par l'hème

**Souris  
Drépanocytaire  
(SS)**



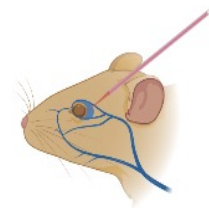
Infusion IV  
de **PS003**  
(10 mg/kg) ou  
véhicule

1 h



**Hème**  
(50 µmol/kg IV)

3 h



Prélèvement  
de sang

+



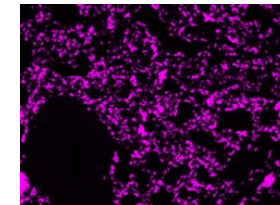
Perfusion  
intracardiaque  
de PBS



Poumons



Foie



Marquage des GR  
(Ter-119)



Quantification des  
**vaso-occlusions**

↓  
Marqueurs plasmatiques  
d'**hémolyse**

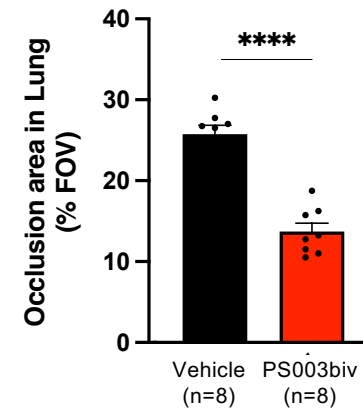
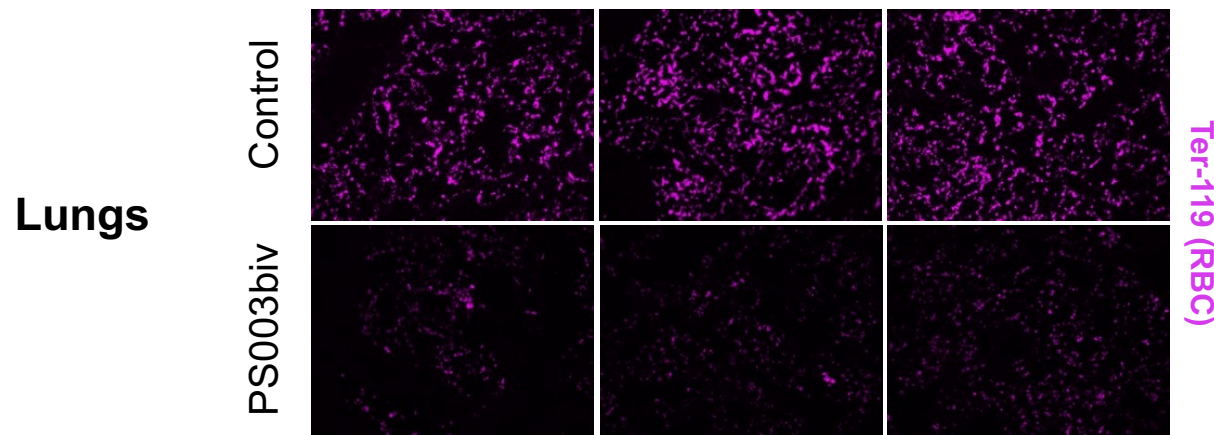
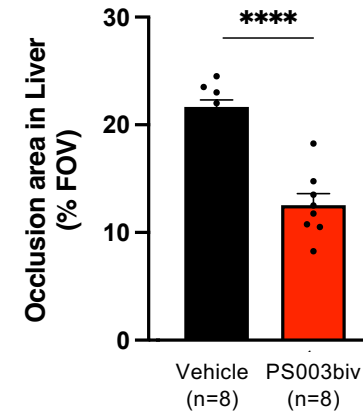
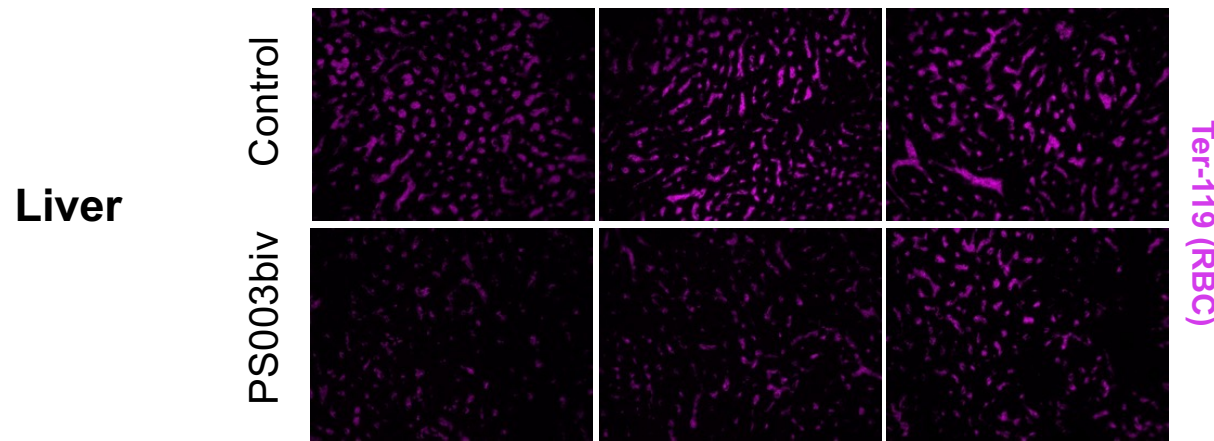


Claire Auditeau  
Doctorante  
2021-2024



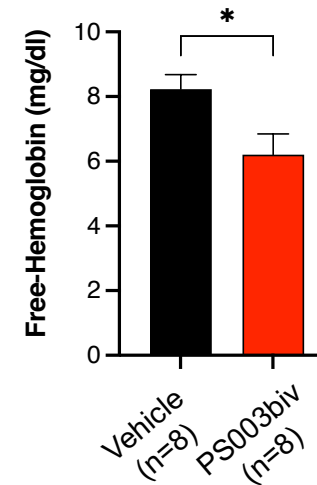
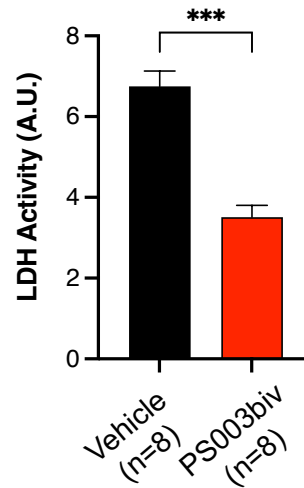
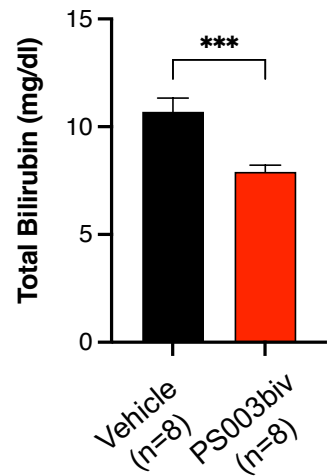
Thiago Maciel  
UMR-S1163  
Institut Imagine, Paris

# Effets de PS003biv dans un modèle murin de CVO induite par l'hème



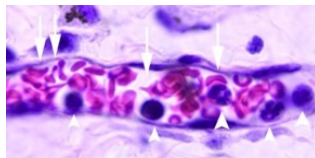
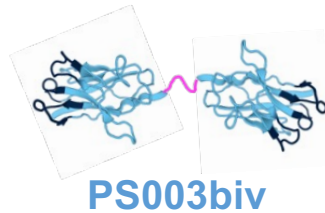
# Effets de PS003biv dans un modèle murin de CVO induite par l'hème

Réduction des marqueurs d'hémolyse par l'administration de PS003biv



# Potentiel thérapeutique de PS003biv dans la drépanocytose

## Identification & Preuve de concept



CVO dans la drépanocytose

PS003biv semble **protecteur** dans des modèles de CVO chez des souris drépanocytaires

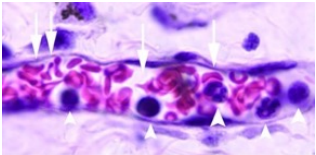
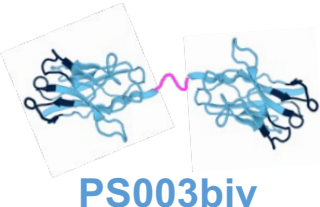
PS003biv pourrait également **limiter la survenue d'évènements thrombo-emboliques** chez des souris drépanocytaires (à démontrer !)



**Potentiel thérapeutique ++**

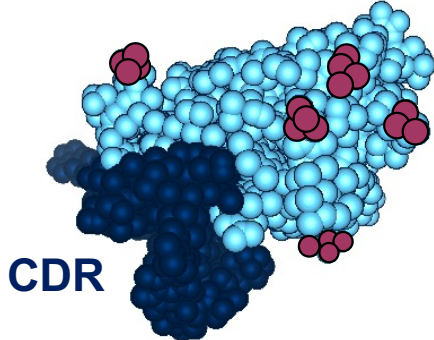
# Optimisation pharmacologique de PS003biv

## Identification & Preuve de concept

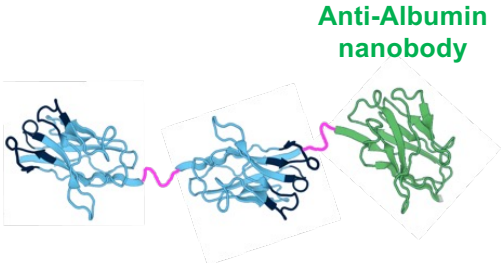


CVO dans la drépanocytose

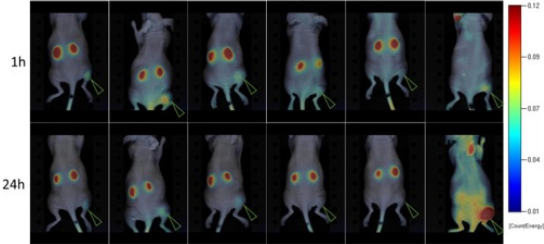
**Humanisation**  
(cf Caplacizumab)



**Extension** de la demi-vie plasmatisque  
(cf Ozoralizumab)

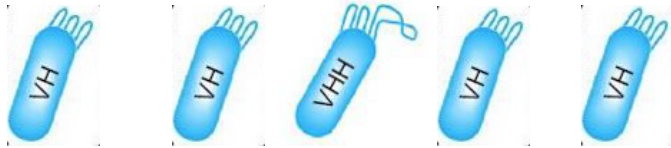


**Biodistribution**



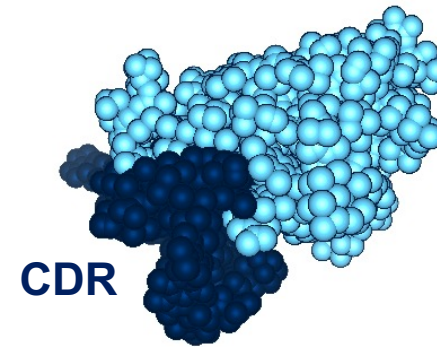


# Humanisation de PS003biv

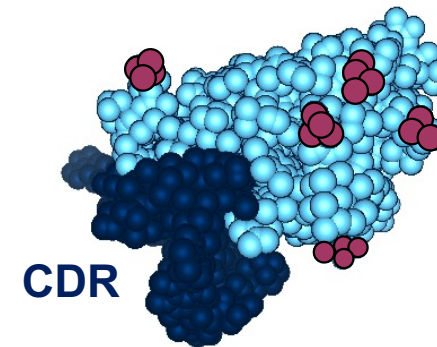


Faible immunogénicité  
des VHH de lama

PS003biv

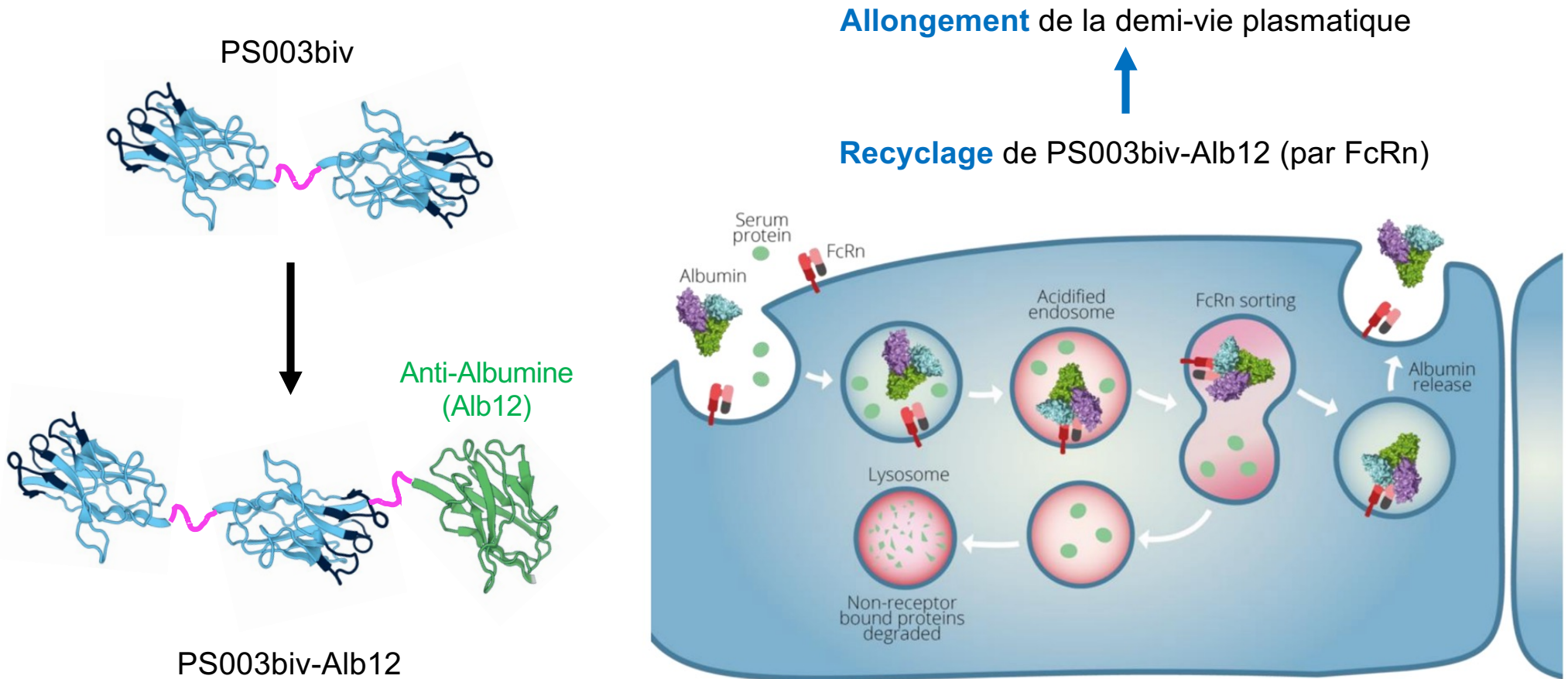


à 87.5%  
« humain »



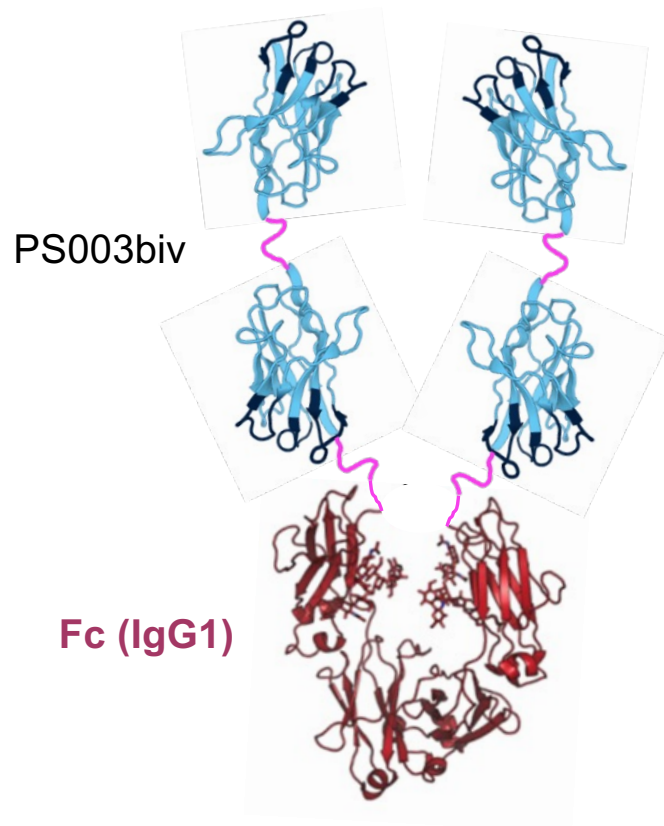
aa de VH  
humains

# Extension de la demi-vie plasmatique de PS003biv



Cours de Claire Auditeau

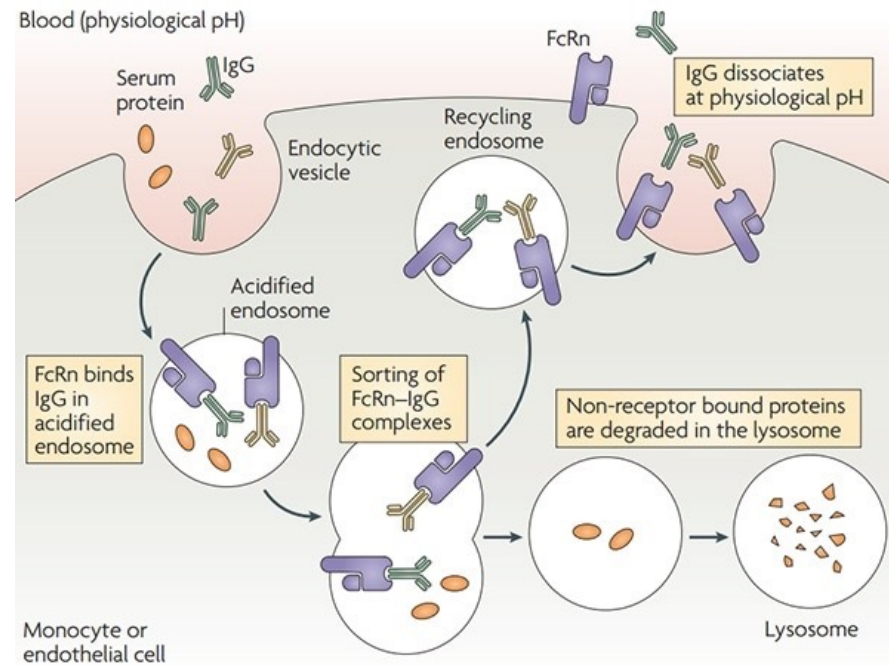
# Extension de la demi-vie plasmatique de PS003biv



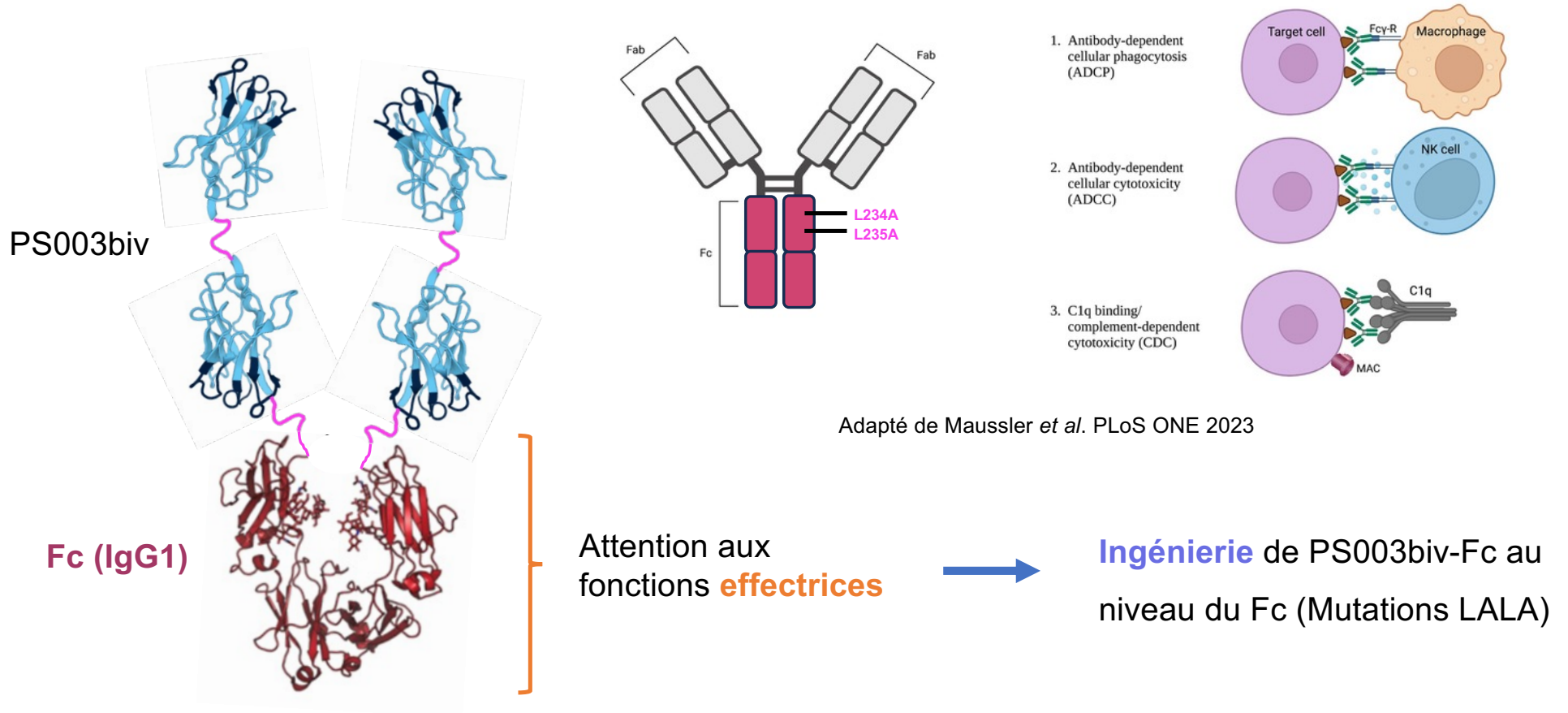
Allongement de la demi-vie plasmatique



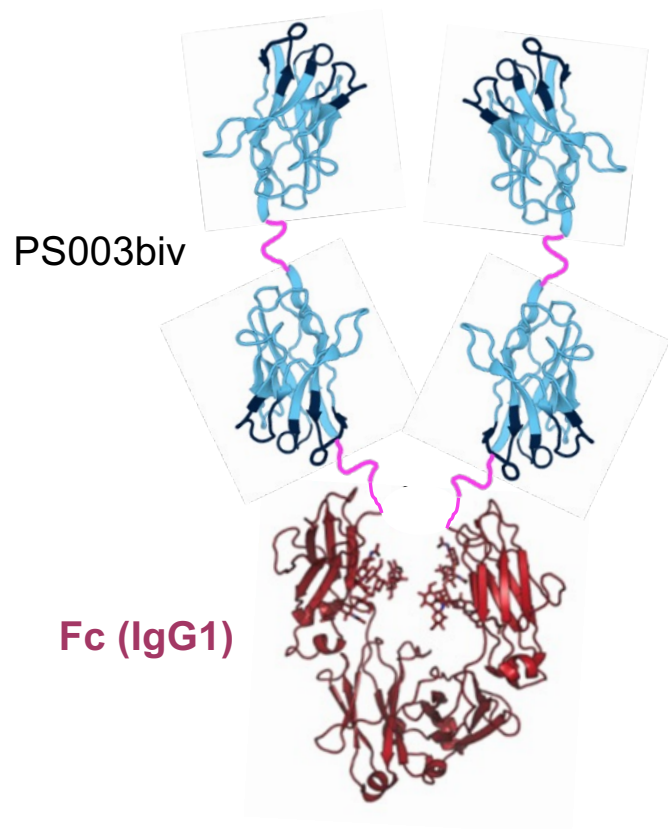
Recyclage de PS003-Fc (par FcRn)



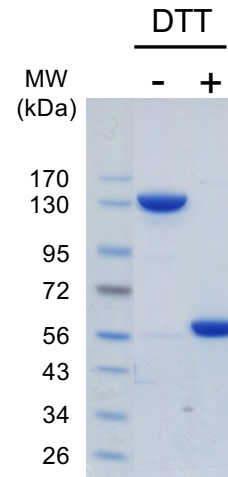
# Extension de la demi-vie plasmaticque de PS003biv



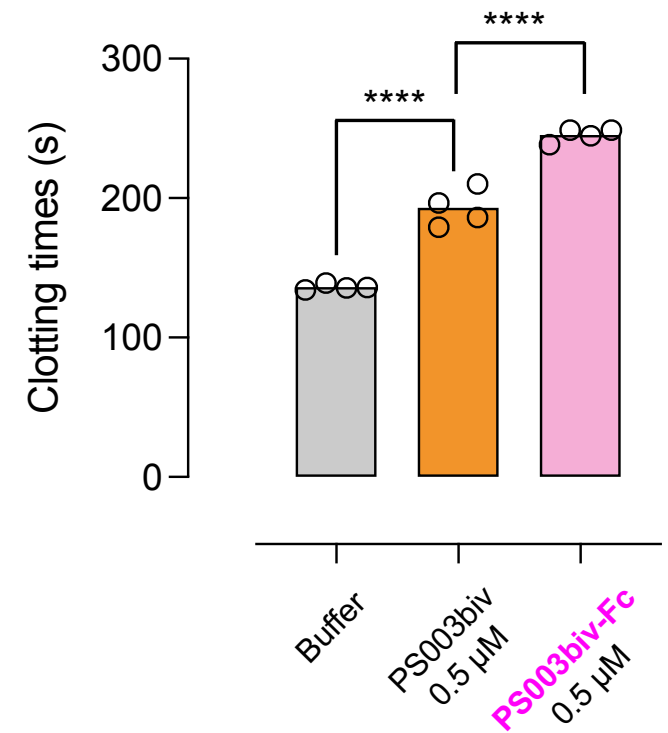
# Extension de la demi-vie plasmatique de PS003biv



Produit  
très pur



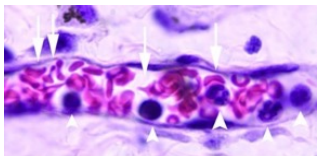
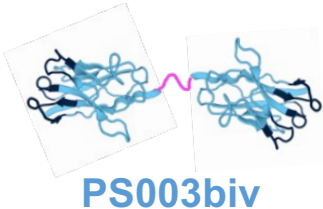
Activité biologique :  
PS003biv-Fc > PS003biv





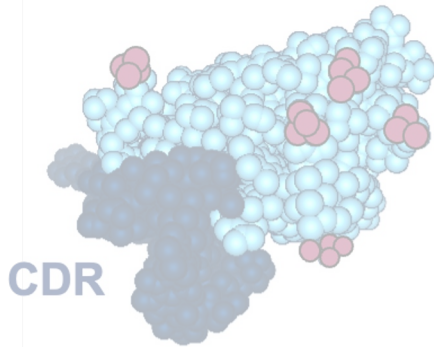
# Optimisation pharmacologique de PS003biv

## Identification & Preuve de concept



CVO dans la drépanocytose

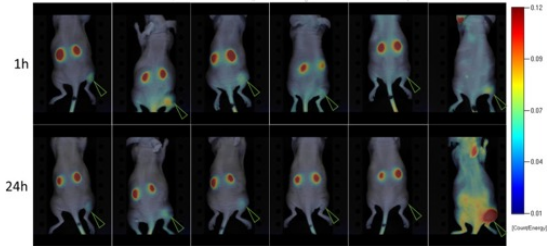
**Humanisation**  
(cf Caplacizumab)



**Extension** de la demi-vie plasmatique  
(cf Ozoralizumab)

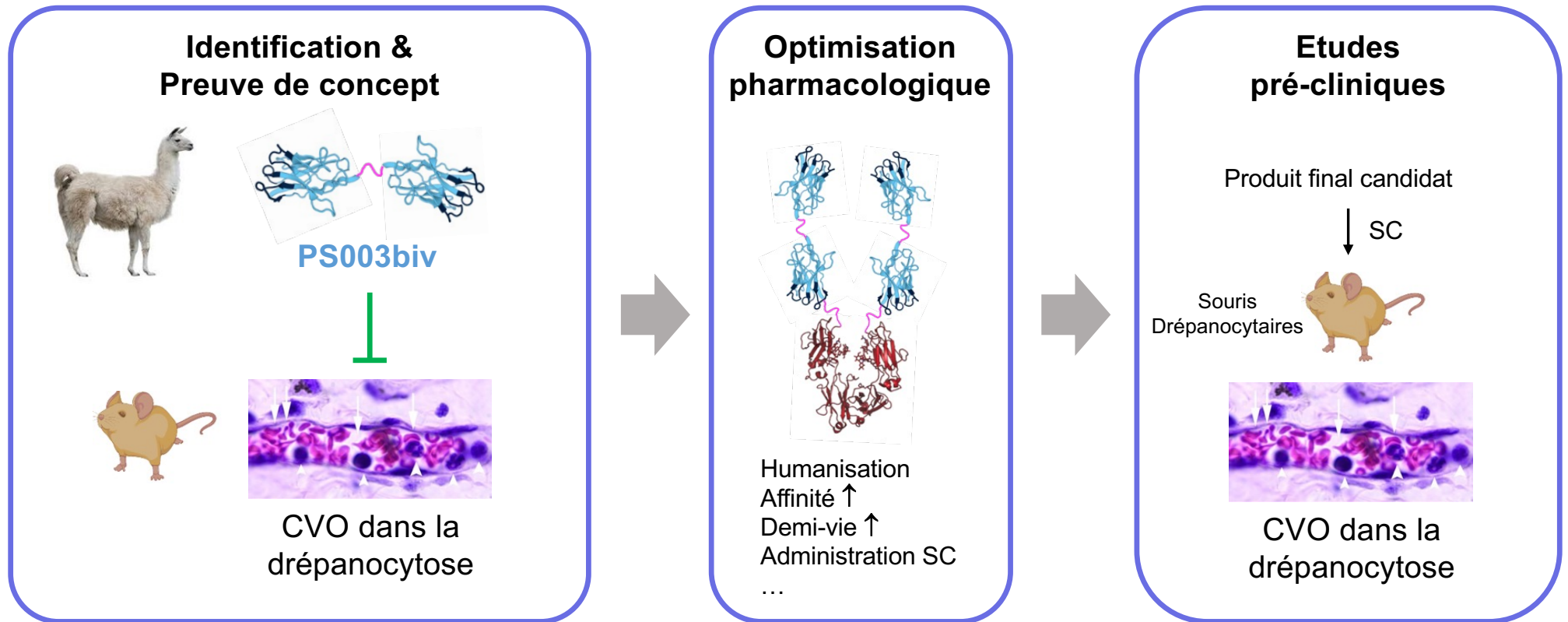


## Biodistribution





# Développement clinique du nanobody PS003biv



# Développement de nanobodies synthétiques

Banques **immunes**



Nanobodies « naturels »  
de lama



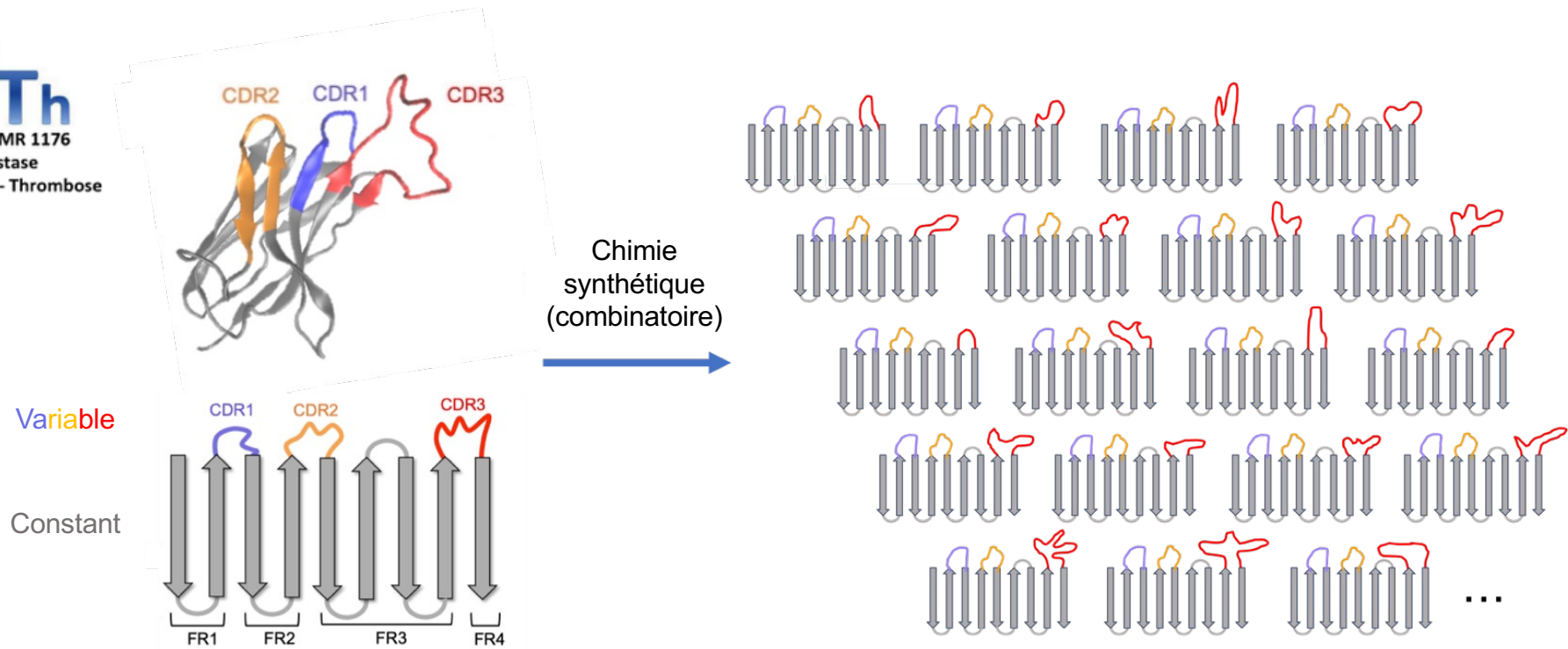
Banque « **synthétique** »



Nanobodies  
« **synthétiques** » de lama

**HiTh**  
INSERM UMR 1176  
Hémostase  
Inflammation - Thrombose

# Génération d'une banque synthétique (KB-SL)



Une banque synthétique peut être utilisée pour **n'importe quelle cible**

# Identification de nanobodies anti-TFPI « synthétiques »

	1		2		3		4		5		6	
	TFPI	BSA	TFPI	BSA	TFPI	BSA	TFPI	BSA	TFPI	BSA	TFPI	BSA
<b>A</b>	3,676	0,071	0,151	0,07	0,085	0,074	0,131	0,068	1,158	0,063	2,241	0,065
<b>B</b>	2,87	0,25	0,294	0,073	0,08	0,066	0,094	0,066	0,086	0,064	0,089	0,06
<b>C</b>	0,114	0,069	1,184	1,285	0,153	0,066	1,112	1,245	0,114	0,058	0,098	0,059
<b>D</b>	0,188	0,071	0,196	0,078	1,218	1,621	0,156	0,064	0,105	0,06	3,17	0,064
<b>E</b>	0,087	0,068	0,126	0,069	0,085	0,068	0,099	0,063	3,238	0,058	0,103	0,057
<b>F</b>	0,094	0,064	0,311	0,07	0,077	0,063	0,379	0,06	0,213	0,058	0,103	0,061
<b>G</b>	0,119	0,088	2,811	0,069	0,135	0,069	2,041	2,393	0,418	0,439	1,72	2,243
<b>H</b>	0,866	0,074	0,301	0,066	0,517	0,07	0,126	0,071	0,967	1,372	0,452	0,06
	7		8		9		10		11		12	
	TFPI	BSA	TFPI	BSA	TFPI	BSA	TFPI	BSA	TFPI	BSA	TFPI	BSA
<b>A</b>	0,406	0,075	0,223	0,068	0,187	0,071	0,076	0,065	0,307	0,061	0,302	0,445
<b>B</b>	1,264	0,067	0,09	0,068	0,177	0,068	0,136	0,064	0,077	0,061	0,121	0,071
<b>C</b>	0,091	0,073	0,6	0,069	0,216	0,068	0,18	0,066	0,082	0,061	0,56	0,738
<b>D</b>	0,328	0,074	0,122	0,073	3,453	0,065	0,129	0,063	3,124	0,061	0,15	0,064
<b>E</b>	0,978	0,114	3,084	0,067	2,291	2,666	0,594	0,729	0,243	0,063	0,133	0,063
<b>F</b>	3,331	0,067	0,152	0,066	0,087	0,065	3,117	0,06	0,935	0,094	0,218	0,067
<b>G</b>	0,094	0,072	0,171	0,099	0,165	0,07	0,082	0,071	0,736	0,774	0,101	0,071
<b>H</b>	2,004	0,071	0,841	0,073	0,153	0,073	0,216	0,186	0,073	0,064	0,654	0,066

94  
clones  
testés

# Identification de nanobodies anti-TFPI « synthétiques »

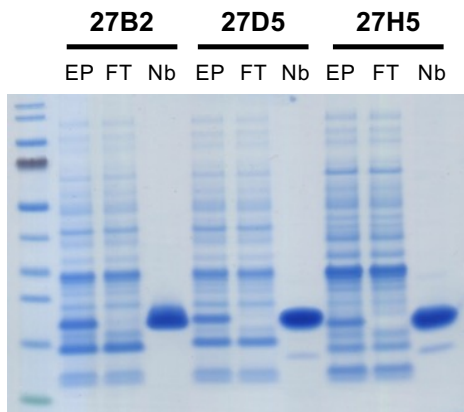
	1		2		3		4		5		6	
	TFPI	BSA	TFPI	BSA	TFPI	BSA	TFPI	BSA	TFPI	BSA	TFPI	BSA
<b>A</b>	1,992	1,067	0,816	0,068	0,111	0,066	0,654	0,062	0,226	0,069	0,268	0,073
<b>B</b>	0,205	0,062	1,863	0,065	0,13	0,063	0,154	0,059	2,404	0,217	0,121	0,071
<b>C</b>	0,147	0,063	2,979	0,07	0,102	0,06	0,078	0,06	0,161	0,063	0,084	0,065
<b>D</b>	1,192	1,694	0,104	0,064	0,142	0,061	0,884	0,06	0,849	0,087	0,173	0,063
<b>E</b>	0,491	0,065	0,237	0,206	0,375	0,243	0,174	0,06	0,171	0,063	0,664	0,838
<b>F</b>	0,199	0,284	0,138	0,061	0,075	0,06	0,107	0,06	0,302	0,066	0,11	0,067
<b>G</b>	0,122	0,071	0,331	0,069	0,493	0,069	0,096	0,074	2,331	2,455	0,499	0,945
<b>H</b>	0,188	0,067	0,159	0,19	0,23	0,145	0,193	0,065	3,383	0,066	0,261	0,066
	7		8		9		10		11		12	
	TFPI	BSA	TFPI	BSA	TFPI	BSA	TFPI	BSA	TFPI	BSA	TFPI	BSA
<b>A</b>	0,486	0,06	0,081	0,057	0,669	1,113	2,686	1,726	0,075	0,064	1,049	1,833
<b>B</b>	0,141	0,055	0,144	0,058	0,069	0,056	0,086	0,058	0,763	1,215	0,728	0,058
<b>C</b>	2,218	1,076	0,147	0,056	0,298	0,057	0,067	0,057	0,118	0,06	2,492	0,057
<b>D</b>	0,068	0,086	0,185	0,077	1,559	1,264	1,206	0,128	0,168	0,066	0,156	0,06
<b>E</b>	0,235	0,056	1,145	0,056	0,223	0,057	0,097	0,079	0,672	0,305	0,279	0,055
<b>F</b>	0,068	0,055	0,066	0,055	0,082	0,056	0,502	0,054	0,087	0,061	0,07	0,058
<b>G</b>	0,313	0,249	0,423	0,069	0,087	0,059	0,084	0,061	0,357	0,088	1,593	0,061
<b>H</b>	0,472	0,845	0,085	0,057	0,068	0,06	0,623	0,89	0,066	0,058	0,673	0,054

94  
clones  
testés

# Identifier des Nb anti-TFPI « anti-hémophiliques »

Expression (*E. coli*)

Purification

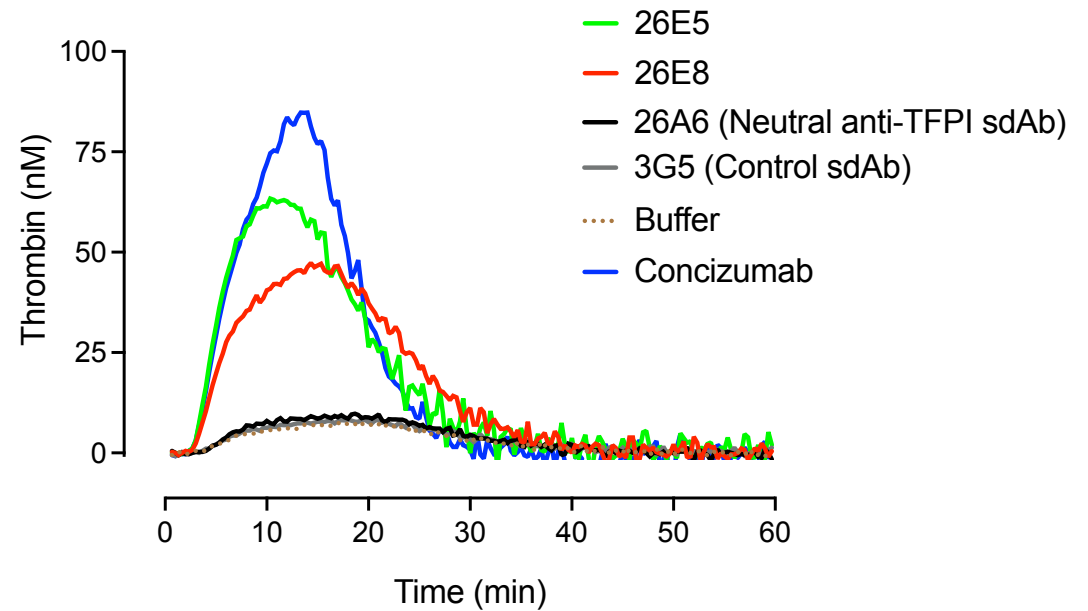


14 Nb anti-TFPI (sur 20)  
ont pu être exprimés et  
purifiés

Criblage  
Fonctionnel

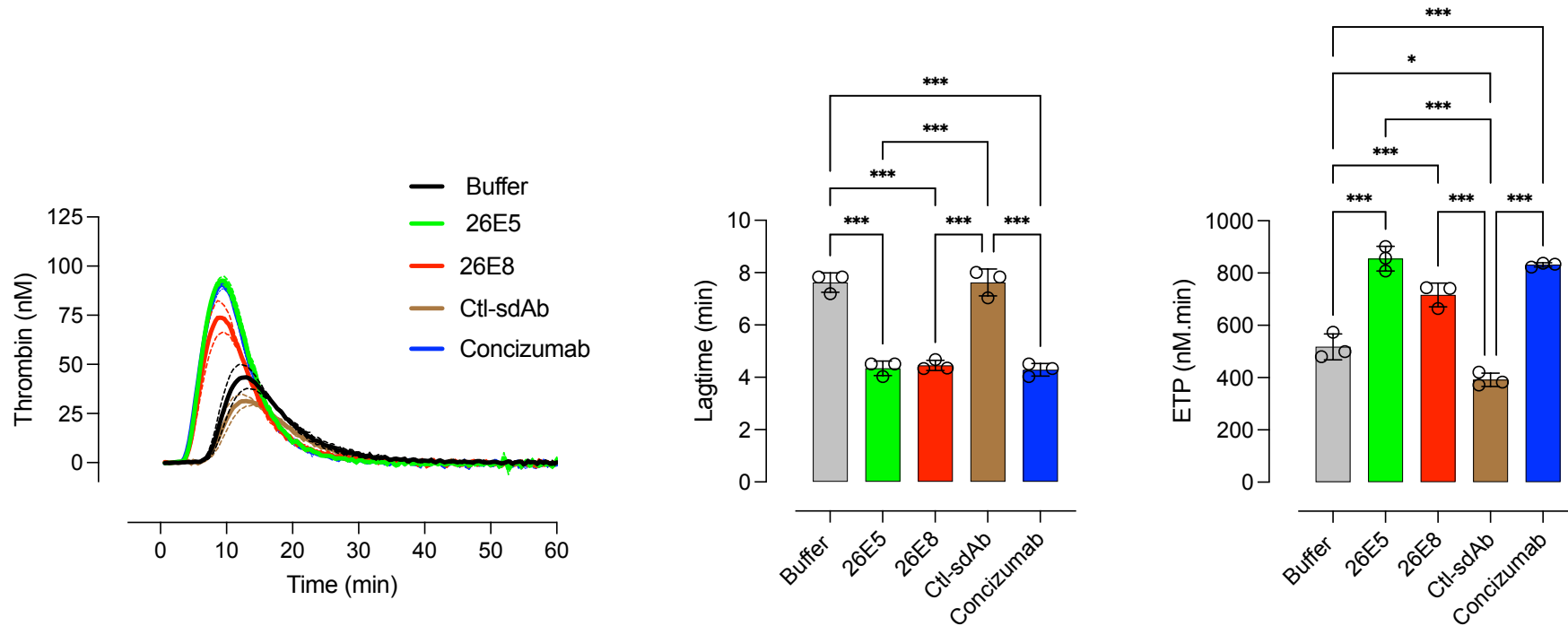


Test des 14 Nb dans un TGT : Plasma HA (< 1% FVIII)





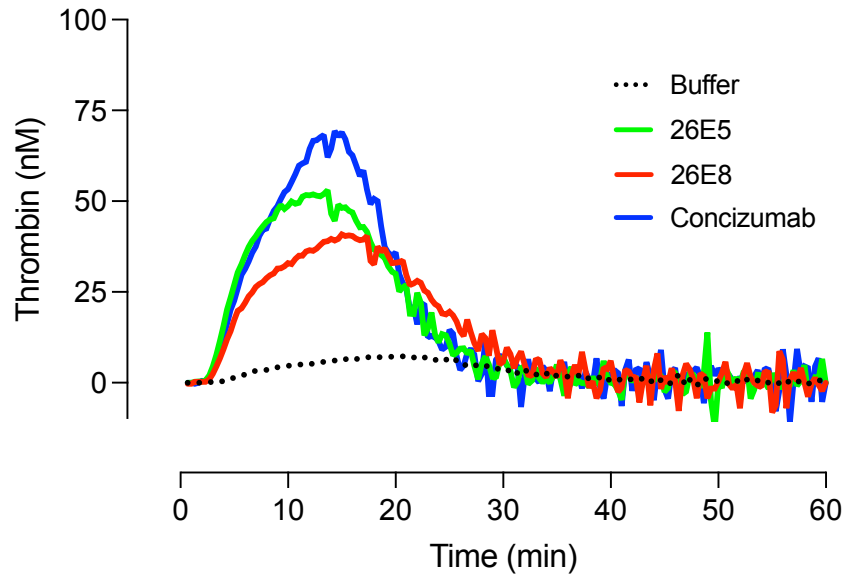
# Effets des nanobodies 26E5 et 26E8 en plasma normal



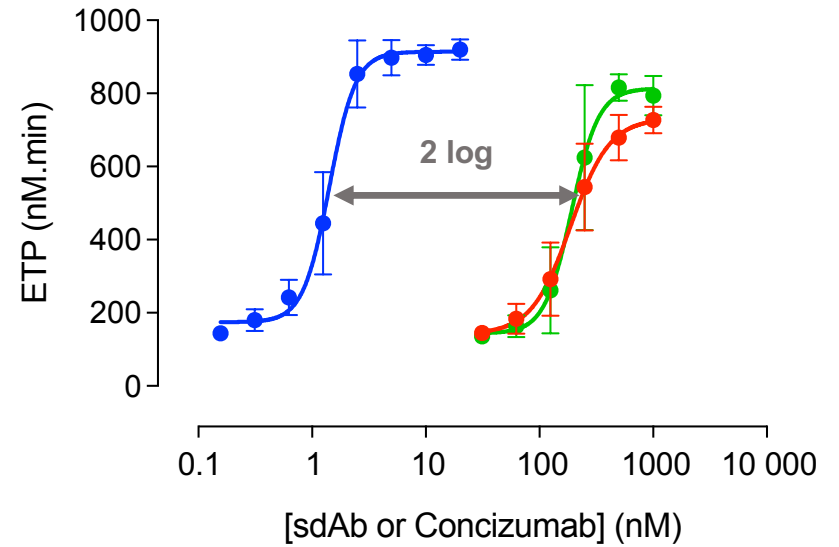
Les nanobodies 26E5 et 26E8 bloquent l'activité anticoagulante du TFPI

# Effets des nanobodies 26E5 et 26E8 dans un plasma HA

Plasma commercial de patient **hémophile A** (<1 % FVIII)

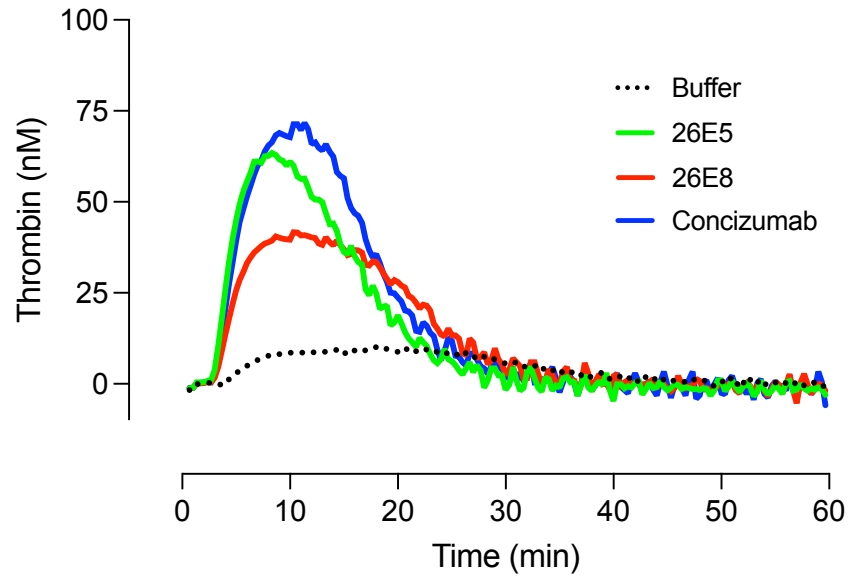


Les nanobodies 26E5 et 26E8 sont “100 fois moins” efficaces que le Concizumab

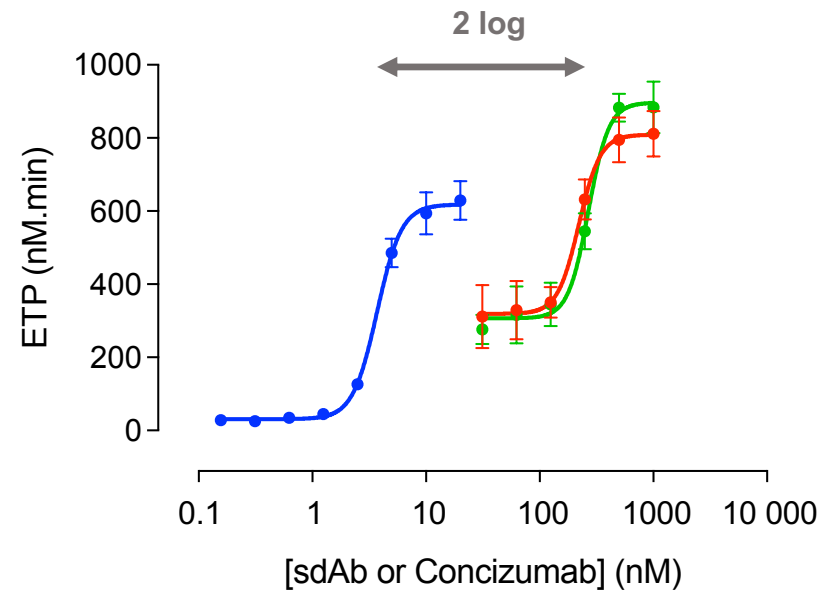


# Effets des nanobodies 26E5 et 26E8 dans un plasma HB

Plasma commercial de patient **hémophile B** (<1 % FIX)



Les nanobodies 26E5 et 26E8 sont “100 fois moins” efficaces que le Concizumab

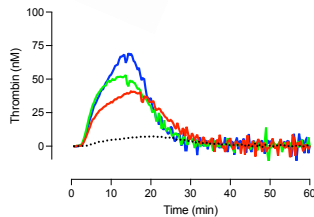


# Développement clinique de nanobodies anti-TFPI ?

## Identification & Preuve de concept



Nanobodies  
Anti-TFPI



↓ ??

Hémophilie



Procoagulant

Anticoagulant



Equilibre de la  
balance hémostatique

Cibles

Méthode



Ac humanisés  
anti-TFPI

Molécules

Concizumab (Novonordisk)  
Marstacimab (Pfizer)

Cours d'Elsa Bianchini (UEL343)

# Les nanobodies, une nouvelle classe d'anticorps thérapeutiques

---



1983

# Les nanobodies, une nouvelle classe d'anticorps thérapeutiques

## Are llamas the new unicorns?

**B B C**

© 10 February 2019 · [Comments](#)



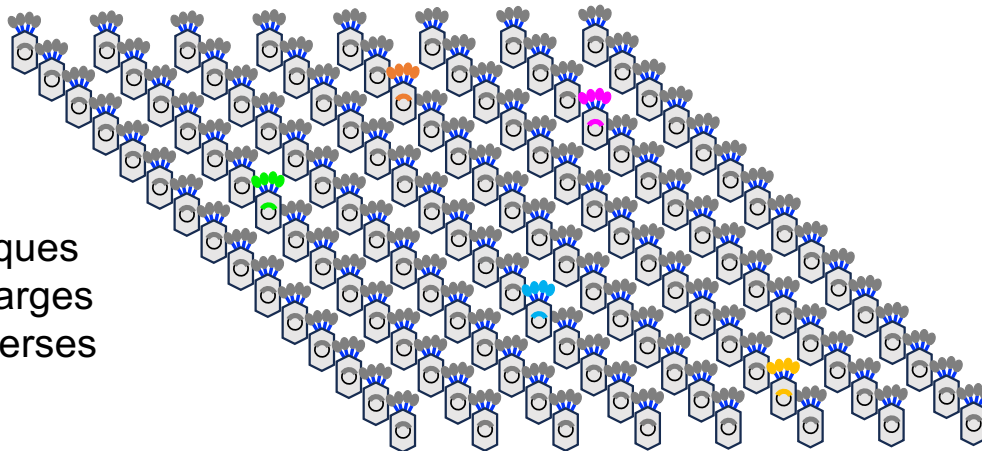
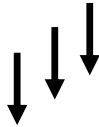
Step aside unicorns, there's a new trend-setting creature in town... the llama of course!



2019



# Les nanobodies, une nouvelle classe d'anticorps thérapeutiques



Banques  
très larges  
et diverses



Picture: Rowan Schindler

# Les nanobodies, une nouvelle classe d'anticorps thérapeutiques

---

