



HAL
open science

Prérequis pour une production académique des cellules CART conforme aux bonnes pratiques pharmaceutiques (BPF). Recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC)

Marina Deschamps, Véronique Decot, Camille Giverne, Marine Pinturaud, Alix Vaissié, Nathalie Parquet, Sylvain Olivero, Mamez Anne-Claire, Jacques-Olivier Bay, Ibrahim Yakoub-Agha, et al.

► To cite this version:

Marina Deschamps, Véronique Decot, Camille Giverne, Marine Pinturaud, Alix Vaissié, et al.. Prérequis pour une production académique des cellules CART conforme aux bonnes pratiques pharmaceutiques (BPF). Recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). Bulletin du Cancer, 2020, 107 (1), pp.S85-S93. 10.1016/j.bulcan.2019.08.006 . hal-02870580

HAL Id: hal-02870580

<https://uca.hal.science/hal-02870580>

Submitted on 7 Mar 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial 4.0 International License

Prérequis pour une production académique des cellules CART conforme aux bonnes pratiques pharmaceutiques (BPF). Recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC)

Requirements for academic production of CAR-T cells in accordance with Good Pharmaceutical Practice (GMP). Guidelines from the Francophone Society of Bone Marrow Transplantation and Cellular Therapy (SFGM-TC)

**Marina Deschamps¹, Véronique Decot², Camille Giverne³, Marine Pinturaud⁴,
Alix Vaissié^{5,6}, Nathalie Parquet⁷, Sylvain Olivero⁸, Mamez Anne-Claire⁹,
Jacques-Olivier Bay¹⁰, Ibrahim Yakoub-Agha^{5,11}, Christophe Ferrand^{1*}**

1 EFSBFC, INSERM UMR1098, UFC, Besançon 25000, France

2 Unité de Thérapie cellulaire et banque de Tissus, BSP, UMR CNRS UL7365, Vandoeuvre les Nancy 54000, France

3 CHU de Rouen, service d'immunologie et biothérapies, Normandie université, UNIROUEN, IRIB INSERM U1234, Rouen 76000, France

4 CHRU Lille, Institut de Pharmacie, Lille 59000, France

5 CHRU de Lille, unité d'allogreffe de CSH, maladies du sang, 59037 Lille, France.

6 CHRU de Lille, Plateforme de biothérapies, Lille 59000, France

7 Unité d'Aphérèse Thérapeutique, Hôpital Saint-Louis, 75010 Paris, France

8 Unité de thérapie cellulaire et génique, CHU de Nice, Hôpital Pasteur, 06000 Nice, France

9 Laboratoire de thérapie cellulaire en héματο-oncologie, Hôpitaux Universitaires de Genève, 1205 Genève, Suisse.

10 CHU Clermont-Ferrand, site Estaing, Service de thérapie cellulaire et d'hématologie clinique adulte, 63000 Clermont-Ferrand

11 Université de Lille 2, Inserm U995, LIRIC, 59000 Lille, France

* Corresponding author: **Christophe Ferrand**

Laboratoire de Thérapeutiques Immuno-Moléculaires et cellulaires des cancers, INSERM UMR1098
Etablissement Français du Sang – Bourgogne / Franche-Comté, Université de Bourgogne / Franche-Comté
8 rue du Dr Jean-François Xavier Girod
25020 Besançon cedex, France
E-mail: christophe.ferrand@efs.sante.fr

Résumé

Le succès aussi extraordinaire qu'inattendu de l'immunothérapie cellulaire utilisant des lymphocytes T génétiquement modifiés pour exprimer un récepteur chimérique à l'antigène (CAR) ciblant CD19, dans le traitement de certaines hémopathies B réfractaire/rechute, a permis un véritable espoir. Les taux de rémission atteignent plus de 80 % chez des patients pédiatriques en impasse thérapeutique. Ces travaux initialement issus de la recherche académique ont conduit à l'autorisation de mise sur le marché de deux médicaments de thérapie innovante (MTI) autologues, Kimryah® et Yescarta®. Les résultats cliniques impressionnant, certes principalement dans les hémopathies malignes, laisse entrevoir des applications très diverses notamment pour les tumeurs solides. Cependant si le développement des cellules *CAR-T* semble aujourd'hui aux mains des industriels, les contraintes logistiques, la cryopréservation et le coût très important, risque à terme de limiter leur usage. Le développement de productions académiques de cellules *CAR-T* pourrait contourner ces inconvénients. L'innovation des établissements de santé associés à des unités de recherche permet d'identifier la cible tumorale idéale, les cellules effectrices performantes, et de disposer de plateformes de production autorisées permettant un délai d'administration raccourci avec un coût de production acceptable pour les systèmes de santé. Cet atelier permet de recenser les prérequis nécessaires à une production académique des *CAR-T cells*, en respectant les standards de la recherche nécessaire à la preuve de concept, et à l'étape de développement préclinique, conduisant à la fabrication, *in fine*, par un établissement pharmaceutique autorisé, du MTI. Le but ultime est de permettre l'accessibilité de ces MTI au plus grand nombre de patients.

Mots-clés : Récepteur chimérique à l'antigène ; immunothérapie ; recherche académique

Abstract

The extraordinary and unexpected success of cellular immunotherapy using genetically engineered T-cells to express a chimeric antigen receptor (CAR) targeting CD19, in the treatment of refractory or relapsing B-hematological malignancies, has provided a real therapeutic hope. Indeed, remission rates reach more than 80 % in patients at a stage, without any other possibilities of treatment, notably in the child's acute lymphoblastic leukemia. These works, initially resulting from academic research, led to Food and Drug accreditation for market access of two innovative autologous therapy drugs, Kimryah® and Yescarta®. Based on the impressive clinical results, certainly mainly in hematological malignancies (LAL, MM, LBDGC, etc.), the development of several types of cells expressing a CAR receptor suggest a wide range of future applications, particularly in the field of solid tumors. However, while the development of *CAR-T* cells now appears to be in the hands of private pharmaceuticals companies, the logistical constraints, the cryopreservation and the very high cost of these personalized medicines may ultimately limit their use. The development of academic productions by *CAR-T* cells could bypass some of these disadvantages. The strong innovation capacity of healthcare institutions associated with research units allows them to identify the ideal tumor target, efficient performing cells, and have authorized production platforms that allow for shorter administration times with reasonable production costs for national health systems. The aim of this workshop is to identify the requirements for the academic production of CART cells, while respecting the research standards useful to establish proof of concept, but also at the preclinical development stage, leading in fine to the manufacture, by an authorized pharmaceutical establishment, of the innovative therapy drug, and in accordance with Good Manufacturing Practice (GMP). The ultimate goal is to make these innovative and high-performance medicines available to as many patients as possible.

Keywords: Chimeric Antigen Receptor; Immunotherapy; academic research

Prérequis

Au niveau Pré-clinique, au stade de la recherche, il est nécessaire de bien identifier la cible et de réaliser la preuve concept in vitro et in vivo avant la **phase de transfert** permettant d'obtenir un surnageant de grade clinique nécessaire à produire des *CAR-T* à une échelle compatible avec son utilisation chez l'homme.

Au stade de la production, l'établissement doit être autorisé, procédé ou médicament.

En post-production, le circuit des cellules *CAR-T* doit être validé (libération, dispensation, administration, surveillance...) : Voir atelier 2017 [1], rôle du pharmacien hospitalier dans le circuit des *CAR-T* [2]. Le service clinique doit également être accrédité. L'ensemble de ces étapes doit anticiper (recherche et pré-clinique) et répondre (production et post-production) à la réglementation applicable aux cellules *CAR-T* [3].

Questions posées

Au niveau de la recherche : Quels sont les points critiques à envisager dès la phase amont de réflexion, design et validation fonctionnelle pour finaliser et envisager une production GMP ?

En ce qui concerne **la phase préclinique et de mise à l'échelle** compatible avec un usage chez l'homme, quels outils (milieux de culture, cytokines, vecteurs viraux ou non viraux) doivent être utilisés en vue de la production selon les bonnes pratiques de fabrication (BPF) de cellules *CAR-T*? Et quelles validations des outils sont nécessaires pour une production BPF ?

Pour l'étape de production : A quelles bonnes pratiques faut-il se conformer ? **La méthode des 5M** permet de poser les questions relatives aux **Matières premières**, au **Milieu** de production, à la **Main-d'œuvre**, aux **Matériels** et équipements et aux **Méthodes**. En ce qui concerne les matières premières, à quels critères les produits initiaux prélevés doivent-ils satisfaire ? (CYTA) ? Quels sont les contrôles qualités libérateurs des Matières Premières et réactifs (milieux de cultures, cytokines, agents de transfection viraux ou non viraux) ? les contenants (systèmes clos ou non clos). Pour le Milieu, quels sont les facteurs qui peuvent impacter la production BPF ? Types de locaux où ces productions peuvent se dérouler (locaux de production, de stockage). Pour la main-d'œuvre, quelles doivent être la formation initiale et les compétences du personnel de production ? Faut-il un personnel pluridisciplinaire (scientifiques, pharmaciens, thérapeutes cellulaires, qualitatifs, personnels techniques). Y a-t-il nécessité de réaliser des *media process tests*. Pour les matériels, quels moyens techniques adaptés doivent être mis en place ? Production manuelle vs semi-automatisée vs automatisée ? Avantages et inconvénients respectifs ; Impact du choix sur les conditions environnementales requises pour la production selon la classification de propreté particulière de l'air, graduée A>B>C>D ; D était le niveau le plus propre (A dans C ou A dans B?). Pour les méthodes, nécessité de disposer d'un système de management de la qualité : documents opératoires à écrire, analyses de risque, audit de la production ?

Enfin, quels sont les contrôles de qualité à mettre en place pour libérer les lots de cellules *CAR-T*? Quelles sont les spécifications attendues pour les lots de cellules *CAR-T* ?

État actuel de la question

Actuellement, sont disponibles en France et en Europe des immunothérapies cellulaires autologues utilisant des cellules *CAR-T* industrielles ciblant le CD19 avec autorisations de mise sur le marché (AMM) : Yescarta®, (Kite/Gilead) dans le traitement du lymphome B à grandes cellules chez les patients adultes en rechute ou réfractaire après au moins deux ou trois lignes de traitement et Kymriah® (Novartis) dans le traitement de troisième ligne ou plus des lymphomes diffus à grandes cellules B réfractaires ou en rechute.. Des développements dans le cadre d'essais cliniques concernent, entre autres, le myélome multiple, ciblant notamment *B Cell Maturation Antigen* (BCMA).

Cette thérapeutique innovante a montré une efficacité spectaculaire et prometteuse [4], ouvrant ainsi la voie vers d'autres applications cliniques, tant dans le domaine de l'onco-hématologie que des tumeurs solides [5]. Pour autant, ces traitements restent très onéreux (350 000 € en post-ATU (Autorisations temporaires d'utilisation) pour Yescarta® et 320 000 € en ATU de cohorte pour Kymriah®) [6] avec des circuits de production longs et complexes, qui pourraient justifier une optimisation afin de limiter les coûts et le délai de mise à disposition aux patients (aphérèse-injection) tout en évitant les étapes critiques de cryopréservation.

Cependant, en dehors des productions industrielles, en l'état actuel des connaissances, malgré l'implication de plusieurs unités de recherche, il n'y a pas encore à ce jour, en France, de production de cellules *CAR-T* académiques. En Europe, un modèle de production « *point of care* » est développé par les équipes barcelonaises pour permettre une meilleure accessibilité du traitement [7]. Aussi cette étude a pour but de proposer des éléments visant à guider un laboratoire académique dans le choix de ses outils et de ses pratiques en vue d'une production de cellules *CAR-T*.

Le recours à une production académique permettrait de stimuler la valorisation et l'émulation de projets scientifiques, portant notamment sur de nouvelles cibles exprimées dans des niches, de limiter les coûts de prise en charge, de mieux caractériser le médicament mis à disposition, d'avoir une flexibilité nécessaire à l'amélioration du médicament, de garantir une meilleure accessibilité et une répartition territoriale équitable de ces traitements et enfin de développer des essais cliniques élaborés par les sociétés savantes concernées. Une production académique de cellules *CAR-T*, par la proximité des centres producteurs, permettrait une réactivité utile au développement d'essais cliniques de phase I.

L'objectif serait également de proposer des pratiques alternatives ou complémentaires à celles imposées par les firmes industrielles dans le choix des centres cliniques, dans la caractérisation du médicament, dans les indications et les modes d'administration ou encore dans le monitoring des cellules *CAR-T*.

Méthodologie suivie

Cet atelier a été conduit selon la méthodologie des ateliers d'harmonisation des pratiques de la SFGM-TC [8].

Vu l'état actuel du développement des cellules *CAR-T*, il n'a pas été possible d'établir de questionnaire sur les pratiques de production dans les pays francophones car peu de laboratoires académiques se sont identifiés comme tels.

Nous nous sommes donc appuyés sur l'expertise du laboratoire INSERM UMR1098 de l'EFS Bourgogne Franche Comté engagé dans la production de cellules *CAR-T* en ce qui concerne les phases amont de recherche et de « *scale-up* ». Nous sommes également appuyés sur l'expertise de 3 laboratoires de thérapie cellulaires dont 2 autorisés pour la préparation de médicament de thérapie innovante préparé ponctuellement et ayant une expérience en production de lymphocytes T thérapeutiques. Une revue de la littérature scientifique, ainsi qu'une analyse des textes réglementaires et de quelques standards professionnels concernant la préparation d'autres types cellulaires comme les Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) ont complété les connaissances. Ainsi, les documents suivants ont servi de base à la discussion de cet atelier :

- Standards JACIE 7e édition ; Décret numéro 2012-1236 du 6 novembre 2012 relatif aux médicaments de thérapie innovante ; Décret numéro 2016-1536 du 15 novembre 2016 relatif aux médicaments de thérapie innovante ; règlement (CE) numéro 1394/2007 du Parlement européen et du Conseil du 13 novembre 2007 concernant les médicaments de thérapie innovante.
- Arrêté du 28 mars 2019 limitant l'utilisation de médicament de thérapie innovante à base de lymphocytes T génétiquement modifiés dits cellules *CAR-T* autologues...
Bonnes pratiques de fabrication (BPF) des médicaments de thérapie innovante. (Décision du 6 mai 2019 modifiant la décision du 29 décembre 2015 modifiée relative aux bonnes pratiques de fabrication des médicaments)

L'ensemble du processus a été revu en suivant la méthode d'Ishikawa pour édicter des recommandations dans chaque secteur pouvant impacter la réussite du projet de production. D'autres méthodes d'analyse de risque peuvent être conduites.

Recommandations de l'atelier:

Les objectifs de cet atelier sont de définir les pré-requis pour chaque étape de développement d'une immunothérapie utilisant des cellules *CAR-T*, en partant de la recherche, puis du développement pré-clinique jusqu'à la production du médicament de thérapie innovante (figure 1).

**Figure 1 : Prérequis nécessaires au développement académique d'une cellule CAR-T.
De la preuve de concept à la production clinique**

Au stade de la recherche : du choix de l'antigène cible à la preuve de concept

Le développement d'une immunothérapie par cellules *CAR-T* (figure 2) débute par le choix de l'antigène à cibler. L'antigène tumoral idéal, doit être exprimé par la cellule tumorale et pas ou peu par la cellule saine et ne doit pas affecter les tissus sains, notamment le tissu hématopoïétique. Exprimé à la surface cellulaire, il peut provenir de mutations faux-sens, d'épissages alternatifs, de l'expression transcrits de fusion ou encore de surexpression. Son expression doit demeurer stable à la membrane, afin de se prémunir des mécanismes d'échappement [9].

La construction du CAR fusionne le domaine d'activation d'un anticorps monoclonal spécifique de l'antigène cible (séquences codant pour les chaînes lourde et légère du fragment variable) avec un seul domaine d'activation (Signal 1 : CD3z, CAR de première génération) du lymphocyte T. Des signaux de co-stimulation peuvent être ajoutés si on souhaite favoriser l'activation (Signal 1 plus signal 2 : CD28, CAR de deuxième génération) et/ou la persistance (Signal 1 et 2 signaux 2 : CD28 et 4.1BB ou Ox40, CAR de 3e génération) des cellules *CAR-T*. En plus du CAR, l'addition « *in-construct* » d'autres transgènes permettra de sécuriser par un système de gène suicide caspase 9 inducible par un inducteur chimique (iCASP9/Rimiducid®), par la système du récepteur au facteur de croissance épidermique tronqué dans sa partie interne sensible à un anticorps anti-EGFR (Δ EGFR/Cetuximab) ou encore l'expression de la molécule de surface CD20 tronqué en intracellulaire, sensible à un anticorps anti-CD20 (Δ CD20/Rituximab). Ces systèmes combinent également la possibilité de monitorer et/ou sélectionner les cellules *CAR-T* [10] comme d'ailleurs l'épitope minimum de CD34 et CD20 : R4R8, l'expression membranaire de CD19 tronqué en intracellulaire Δ CD19, ou encore l'expression du récepteur tronqué au *nerve growth factor* Δ NGFR...). L'ajout d'autres transgènes permet d'améliorer l'approche d'immunothérapie, comme l'expression de gène codant pour des cytokines (IL-12, TRUCK ou CAR de quatrième génération) ou pour lever les freins immunologiques de la tumeur (PD1/PDL1). Selon les choix effectués, il est nécessaire de bien identifier les différentes étapes et les séquences qui ont conduit à la construction plasmidique, ainsi que la traçabilité des lignées utilisées, qui seront nécessaires pour la constitution du dossier destiné aux agences réglementaires [11].

Concernant la méthode d'intégration de matériel génétique exogène, les systèmes intégratifs lentivirus sont privilégiés pour des raisons de facilité d'utilisation, d'efficacité de transduction, de taille des transgènes multiples, d'intégration dans le génome hôte et transmission aux cellules filles, de limitation de risque de mutagenèse insertionnelle, ou de transduction de cellules quiescentes. Des systèmes de vecteurs non viraux, par électrolocation à l'aide de transposon/transposase ou « *sleeping beauty* » présente l'avantage d'une insertion permanente du transgène, d'être peu coûteux sur le plan de la fabrication et moins immunogène que les vecteurs viraux [12]. Cette approche est actuellement en cours de validation dans un essai clinique

[13]. Contrairement à la situation autologue où les propres cellules du patient sont génétiquement modifiées, en situation allogénique, c'est-à-dire à partir de cellules d'un donneur compatible apparenté ou non, des systèmes de transfection sont utilisés pour l'édition du génome (TALEN, CRISPR/Cas9) afin de limiter les effets indésirables qui peuvent survenir, comme la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD). Ils sont moins appropriés pour transférer le CAR, car non intégratifs, et donc ne permettent pas de se transmettre à la descendance des cellules *CAR-T* en division engendrant un effet mémoire T limité.

À partir de la construction définie, après (tri-) transfection d'une lignée d'emballage des particules virales, un surnageant viral est produit et son titre est évalué par transduction de lignées cellulaires permissives et/ou de cellules primaires T. En situation autologue, une efficacité de transduction >50% est acceptable et permet de ne pas trop amplifier *ex vivo* les cellules afin de limiter les pertes fonctionnelles. En situation allogénique, une population de cellules *CAR-T* > 90% sera souhaitable, nécessitant un système de tri permettant l'enrichissement des cellules transduites. L'expression à la surface du CAR et son affinité à l'antigène sont ensuite vérifiées respectivement par western blot CD3z et marquage avec l'antigène cible biotinylé. Après la transduction, les cellules *CAR-T* sont ensuite multipliées à l'aide de différents réactifs ajoutés dans le milieu de culture. Classiquement, des billes magnétiques Dynabeads CD3/CD28 (*In Vitrogen*), compatibles avec le passage en mode GMP, activent les signaux 1 et 2, et permettent à la fois l'enrichissement en lymphocytes T et l'activation des cellules. Le choix de(s) la(es) cytokine(s) pour l'activation et l'expansion (signal 3) est un paramètre important. En effet, selon la(es) cytokine(s) choisie(s), à titre d'exemple, des sous populations de cellules *CAR-T* de phénotype naïf ou central mémoire seront plutôt obtenus en présence d'IL-7 et/ou d'IL-15, leur assurant un renouvellement et donc une persistance plus grande, tandis que l'utilisation d'IL-2 favorisera le développement d'effecteurs mémoires terminaux.

La fonctionnalité des cellules *CAR-T* est ensuite évaluée par différents tests cellulaires *in vitro* en les co-cultivant à différents ratios effecteurs : cibles avec des lignées cellulaires ou mieux des cellules tumorales primaires de patients exprimant l'antigène cible.

L'activation et la prolifération des cellules *CAR-T* peuvent être vérifiées par un test de prolifération utilisant du CFSE. La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires peut être mesurée par marquage intracellulaire d'IFN γ et analyse multiplexe d'un panel de cytokines, Luminex (R&D systems) ou *Cytometry Bead Array*, CBA (Beckton Dickinson)]. La cytotoxicité cellulaire des effecteurs peut être évaluée par mesure de la dégranulation (par exemple par Elispot perforine et granzyme) ou par détection membranaire du marqueur de dégranulation CD107 par cytométrie en flux

In vivo, l'utilisation de modèles murins de xélogreffe [14], par exemple les souris humanisées de type NOD-scid IL-2R γ null permet après implantation de la tumeur et injection des cellules *CAR-T* de vérifier la diminution tumorale et la survie. Des modèles de souris « *Patients Derived Xenograft* (pDX) », dans lesquels les cellules de patients sont implantées, sont aujourd'hui nécessaires afin de démontrer l'efficacité des

cellules *CAR-T*. L'établissement des modèles de souris pDX pouvant prendre plusieurs mois, il est nécessaire d'anticiper leur mise en place.

En ce qui concerne les études de toxicité, il n'y a actuellement pas de modèle idéal, permettant de prédire formellement l'innocuité des cellules *CAR-T*. Des modèles murins de prédiction de la toxicité reproduisant le « *Cytokine Release Syndrome* » (CRS-like, en injectant un grand nombre de *CAR-T* par souris : $> 20.10^6$) ou les effets neurologiques [15] ont été décrits et peuvent être appliqués, tout en restant cependant réservés à des équipes de recherche très spécialisées. Il faut néanmoins garder à l'esprit que les effets observés dans des modèles murins ne seront pas forcément reproduits chez l'homme. Il existe aussi des modèles complètement murins (*CAR-T* murins ciblant un antigène murin) qui peuvent aider à ces prédictions

La spécificité du domaine de reconnaissance de l'anticorps est importante. Il est nécessaire de vérifier que celui-ci ne reconnaît pas d'autres tissus en dehors des tissus tumoraux. Ce marquage « *off-target* » peut-être évalué par immunohistochimie sur un panel de tissus sains issus de différents donneurs (par ex : *Tissue Micro Array*, TMA certifié par la FDA, utilisé pour valider les Anticorps Monoclonaux thérapeutiques). *In vitro*, la toxicité sur le système hématopoïétique peut être évaluée en analysant les cultures de progéniteurs après co-culture des cellules CD34+ avec les cellules *CAR-T* autologues, issus de sang placentaire par exemple. *In vivo*, le monitoring de la reconstitution hématopoïétique chez des souris greffées avec du sang de cordon ombilical, après injection de cellules *CAR-T* autologues, permet de vérifier la toxicité sur la CSH et sur le système hématopoïétique. Ces cellules *CAR-T* autologues sont produites *ex vivo* à partir de lymphocytes T humains circulant chez les souris, puis réinjectés aux mêmes souris. Enfin, si la construction possède un système suicide, il est nécessaire d'évaluer son efficacité tant *in vitro*, qu'*in vivo*. De même, des analyses complémentaires peuvent être nécessaires pour analyser par exemple l'immunogénicité dans le cas d'utilisation d'une *single chain fragment* variable (Chaînes lourde et légère de l'immunoglobuline clonées en ligne : scFv) d'origine murine et améliorer sa tolérance par mutation.

- **Figure 2 : Principales étapes de développement d'une cellule *CAR-T* après identification de la cible.**

[Au stade pré-clinique : validation du changement d'échelle de la production compatible avec l'usage clinique](#)

Un des défis du traitement par cellules *CAR-T* est que bien qu'il s'agisse d'un traitement personnalisé. D'un point de vue réglementaire, il s'agit d'un Médicament de Thérapie Innovante (MTI) et de ce fait, sa préparation est régie par la Pharmacopée ainsi que les Bonnes Pratiques de Fabrication MTI (BPF ou GMP : *Good Manufacturing Process*).

Entre l'étape de recherche/preuve de concept et l'étape de production du MTI dans l'établissement pharmaceutique, il est nécessaire de transférer le protocole de production des cellules *CAR-T* du laboratoire

à l'établissement pharmaceutique. Plus le procédé initial tient compte précocement dans sa mise au point des exigences réglementaires pour la préparation d'un MTI, plus rapide sera le transfert du procédé de production. L'objectif de l'étape de transfert est donc de passer en revue de manière exhaustive tous les réactifs et consommables ainsi que toutes les étapes de production et les contrôles qualités afin d'identifier, dans un premier temps, tout ce qui n'est pas compatible avec une production MTI, puis dans un second temps, d'amener chacune de ces étapes à un niveau BPF. Il faut donc des matières premières ainsi qu'un surnageant viral GMP, un procédé de fabrication aseptique permettant d'obtenir une dose injectable à l'homme ainsi que l'établissement de critères libératoires (spécifications) du produit fini. Enfin, le procédé de production BPF sera testé et réalisé en laboratoire L2 avant d'être transféré dans l'établissement pharmaceutique, ce qui permet le minimum d'ajustement en ZAC (Zone à Atmosphère Contrôlée), où les conditions de travail réglementées, restent contraintes.

La qualité des matières première est primordiale et doit répondre aux critères BPF. Dans la fabrication des MTI, les matières premières sélectionnées doivent tenir compte de la Pharmacopée Européenne. 5.2.12, chapitre général sur les matières premières d'origine biologique pour la production des médicaments à base de cellules et des médicaments de thérapie génique. Le surnageant viral est considéré comme une matière première et devra donc répondre aux critères BPF avec des spécificités au niveau de la sécurité virale, tel que l'identité du plasmide devant être déficient pour la réplication (test Rétrovirus/Lentivirus compétents pour la réplication : RCR/RCL respectivement) et une capacité à produire un haut titre viral garantissant une bonne efficacité de transduction. Afin de réaliser les différents tests du procédé de production des cellules *CAR-T*, le surnageant est produit et qualifié en un lot unique. Pour être le plus proche des conditions BPF il est préférable de pouvoir produire dans un bioréacteur type iCellis (*Pall Corporation*) ou *CliniMACS Prodigy* (Miltenyi Biotec).

La production en vue d'injection à un patient suppose nécessairement un changement d'échelle du procédé et donc produire non plus des millions mais des milliards de cellules *CAR-T*. Chaque étape va en être impactée et pour obtenir in vitro plus de cellules, en conservant au mieux leur priorité, différents paramètres sont à prendre en compte tels que : concentration cellulaire, volume total, surface, gestion des échanges de milieux et de gaz... Les temps de manipulation seront également plus longs.

[Au niveau de la production GMP \(Établissement autorisé, procédé ou médicament\)](#)

Sur le plan réglementaire, les cellules *CAR-T* appartiennent à la classe des médicaments de thérapie innovante (MTI), 17^e classe des médicaments (figure 3). Une réglementation française existe pour l'encadrement des pratiques de production de MTI issue d'une transposition de la réglementation européenne des médicaments ATMP (*advanced therapy medicinal products*) qui édicte des règles générales de conformité [3]. De plus, La modification de l'article 37 du code de la Santé publique française permet

aujourd'hui, aux structures hospitalières académiques de produire des médicaments expérimentaux auxquels appartiennent les cellules *CAR-T*.

Figure 3 : Établissement pouvant préparer des cellules *CAR-T* en fonction du produit et de son stade de développement.

La production d'un MTI doit être conforme aux BPF et compatible avec la manipulation dans une ZAC. La conformité aux BPF est garantie entre autres par un ensemble de procédures et modes opératoires qui régissent les modalités de production et de contrôle qualité du produit mais aussi le contrôle de l'environnement de production, les modalités de suivi des produits et matériels utilisés, le suivi des déviations et anomalies l'ensemble formant le système de management de la qualité des unités de préparation.

Actuellement les cellules *CAR-T* doivent être produites dans un environnement de propreté particulière (A>B>C>D, D étant la classe la plus élevée) classé A dans B (pour les étapes ouvertes) ou C et D pour les étapes en circuits clos et dans un confinement de niveau 2 du fait que les cellules *CAR-T* entrent dans la catégorie des Organisme Génétiquement Modifiés (OGM) et sont donc classées par le Haut Comité des Biotechnologies. Le développement d'un procédé BPF doit tenir compte de ces contraintes : manipulations spécifiques, gestion des flux entrants et sortants, temps de manipulations, interventions en cours de production, etc. Le développement ciblera ces différents points, on cherchera à manipuler le moins possible le produit et à réduire les interventions directes, notamment en travaillant avec des bioréacteurs autonomes ou des automates capables de gérer seule les différentes étapes (isolation des lymphocytes, activation, transduction, tri, lavage...). Ces étapes devront être préalablement appréhendées au stade de transfert.

De plus, le produit fini ne pouvant pas être stérilisé en fin de production, le procédé devra être réalisé en conditions aseptiques. Dans l'idéal, la production sera réalisée entièrement en système clos y compris l'échantillonnage pour les tests en cours de production (*Xury/Wave, GE Healthacare life sciences ; Allegro XRS Bioreactor, Pall Corporation Clinimacs Prodigy, Miltenyi Biotec...*) permettant ainsi une production dans un environnement de classe C, dans des conditions conformes aux BPF, par du personnel spécialisé, formé et validé au procédé de production. La formation du personnel à la fois sur le plan théorique (formation aux BPF) et pratique (modalité d'habillage, manipulation aseptique validée par des *media process tests* répétés) peut commencer dès l'étape pré-clinique et doit être tracée dans un système de management de la qualité adapté à cette activité. La réalisation de trois *runs* à blanc devra permettre d'assurer la maîtrise du procédé de fabrication en permettant l'obtention de lots conformes aux critères libératoires [16] définis préalablement parmi lesquels peuvent être cités : stérilité, absence de mycoplasme, taux d'endotoxine inférieur au seuil établi, test RCR/RCL, pourcentage de cellules CD3+, pourcentage de cellules *CAR-T*, viabilité, réponse au test de fonctionnalité (« *potency* » ; par ex : sécrétion d'IFN γ) conforme selon des seuils préalablement établis...).

L'accès et/ou la proximité d'une plateforme de *biomonitoring* maîtrisant la réalisation des tests de contrôle qualité est indispensable pour l'obtention rapide des résultats déterminant la conformité aux critères libératoires.

Les matières premières, substances actives, et produits finis ainsi que les résultats des *runs* de validation sont détaillés dans le dossier technique du médicament de thérapie innovante qui sera par la suite envoyé aux instances réglementaires. Il est nécessaire de rappeler que les cellules du patient, collectées par aphérèse, sont aussi une matière première, mais imposée.

Le circuit de médicament devra également être établi pendant ou après cette période, de la même manière que pour un *CAR-T* industriel avec AMM, selon les recommandations de l'atelier SFGM-TC 2017 « Prérequis nécessaires pour la mise en place de protocoles de recherche clinique évaluant des thérapies cellulaires et géniques par lymphocytes T dotés de récepteur chimérique à l'antigène (cellules *CAR-T*) » [1].

Conclusion

Les équipes académiques de recherche et de recherche clinique contribuent pleinement à l'identification de nouvelles cibles tumorales, à l'amélioration des domaines de reconnaissance (scFv), au perfectionnement des constructions virales (promoteurs viraux ou internes, séquences *enhancers*...) ou non [nouveaux CAR bispécifiques possédant 2 domaines de reconnaissance liés (en tandem : TanCAR) ou dissociés (dualCAR)], à la proposition de nouveaux effecteurs cellulaires et au développement d'alternatives dans le transfert de gène ou encore l'utilisation de l'immunothérapie *CAR-T* en situation allogénique. Dans le domaine des *CAR-T* l'imagination semble infinie pour pouvoir répondre aux défis que sont les toxicités, les résistances et les mécanismes d'échappement de mieux en mieux connus au fil des essais cliniques.

Actuellement, dans le domaine académique, notamment en France et en Europe la recherche reste innovante mais ne dispose sans doute pas de tous les moyens nécessaires pour mettre en œuvre, dans des essais cliniques, ces avancées technologiques. En effet, le temps, les coûts, la disponibilité des structures de production grade BPF (surnageants viraux ou cellules médicaments), la compétition avec les grandes firmes, sont autant de freins à la mise en œuvre de ces projets de recherche clinique.

Les défis de demain dans l'immunothérapie utilisant les cellules *CAR-T* seront de faciliter le transfert vers les essais cliniques, afin de conduire à l'AMM le plus grand nombre de médicaments *CAR-T* pour les patients.

Questions résiduelles

- Faut-il produire des cellules *CAR-T* académiques déjà proposées par l'industrie pharmaceutique et disposant de l'AMM (ex CD19) ?

- Interrogation sur l'adaptation/évolution de la législation actuelle (GMP MTI) pour la production de cellules *CAR-T* autologues afin de favoriser les développements, en garantissant tout de même une qualité du produit cellulaire. Statut particulier (cf Canada, USA, hors UE, Asie)?
- Soutien des pouvoirs publics et des tutelles permettant de développer la recherche académique et le développement clinique des cellules *CAR-T*.
- Structures dédiées gouvernementales pour produire et fournir des surnageants viraux ?
- Réseaux d'établissements académiques pharmaceutiques ou non producteurs de cellules *CAR-T*

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs ne déclarent pas de conflit d'intérêt

La SFGM-TC remercie les partenaires industriels pour leur soutien financier qui ont permis la réussite de cette neuvième édition des ateliers d'harmonisation des pratiques :

ABBVIE, BIOTEST, CELGENE, CHUGAI, GILEAD, JAZZ PHARMACEUTICALS, KEOCYT, MACOPHARMA, MALLINCKRODT THERAKOS, MSD FRANCE, NOVARTIS, SANOFI.

Références

1. Yakoub-Agha I, Ferrand C, Chalandon Y, *et al.* [Prerequisite for hematopoietic cellular therapy programs to set up chimeric antigen receptor T-cell therapy (CAR T-cells): Guidelines from the Francophone Society of Bone Marrow Transplantation and Cellular Therapy (SFGM-TC)]. *Bull Cancer* 2017; 104 : S43-S58.
2. Pinturaud M, Vasseur M, Odou P. *Bull Cancer* 2018; 105 Suppl 2 : S205-S13.
3. Chabannon C, Larghero J. *Bull Cancer* 2018; 105 Suppl 2 : S198-S204.
4. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, *et al.* Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 2018; 378 : 439-48.
5. Lee YH, Kim CH. Evolution of chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy: current status and future perspectives. *Arch Pharm Res* 2019.
6. Bach PB, Giralt SA, Saltz LB. FDA Approval of Tisagenlecleucel: Promise and Complexities of a \$475000 Cancer Drug. *JAMA* 2017; 318 : 1861-2.
7. Castella M, Boronat A, Martin-Ibanez R, *et al.* Development of a Novel Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor: A Paradigm for an Affordable CAR T Cell Production at Academic Institutions. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2019; 12 : 134-44.
8. Tipton R, Yakoub-Agha I. Ateliers d'harmonisation des pratiques de la SFGM-TC. *Bulletin du Cancer* 2016; 103 : S193-S7.
9. Townsend MH, Shrestha G, Robison RA, O'Neill KL. The expansion of targetable biomarkers for CAR T cell therapy. *J Exp Clin Cancer Res* 2018; 37 : 163.
10. Warda W, Larosa F, Neto Da Rocha M, *et al.* CML Hematopoietic Stem Cells Expressing IL1RAP Can Be Targeted by Chimeric Antigen Receptor-Engineered T Cells. *Cancer Res* 2019; 79 : 663-75.

11. Gandara C, Affleck V, Stoll EA. Manufacture of Third-Generation Lentivirus for Preclinical Use, with Process Development Considerations for Translation to Good Manufacturing Practice. *Hum Gene Ther Methods* 2018; 29 : 1-15.
12. Hudecek M, Ivics Z. Non-viral therapeutic cell engineering with the Sleeping Beauty transposon system. *Curr Opin Genet Dev* 2018; 52 : 100-8.
13. Kebriaei P, Singh H, Huls MH, *et al.* Phase I trials using Sleeping Beauty to generate CD19-specific CAR T cells. *J Clin Invest* 2016; 126 : 3363-76.
14. Siegler EL, Wang P. Preclinical Models in Chimeric Antigen Receptor-Engineered T-Cell Therapy. *Hum Gene Ther* 2018; 29 : 534-46.
15. Norelli M, Camisa B, Barbiera G, *et al.* Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells. *Nat Med* 2018; 24 : 739-48.
16. Wang X, Riviere I. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. *Mol Ther Oncolytics* 2016; 3 : 16015.

Figures

- **Figure 1 : Prérequis nécessaires au développement académique d'une cellule CAR-T. De la preuve de concept à la production clinique**
- **Figure 2 : Principales étapes de développement d'une cellule CAR-T après identification de la cible.**
- **Figure 3 : Établissement pouvant préparer des cellules CAR-T en fonction du produit et de son stade de développement.**

Recherche

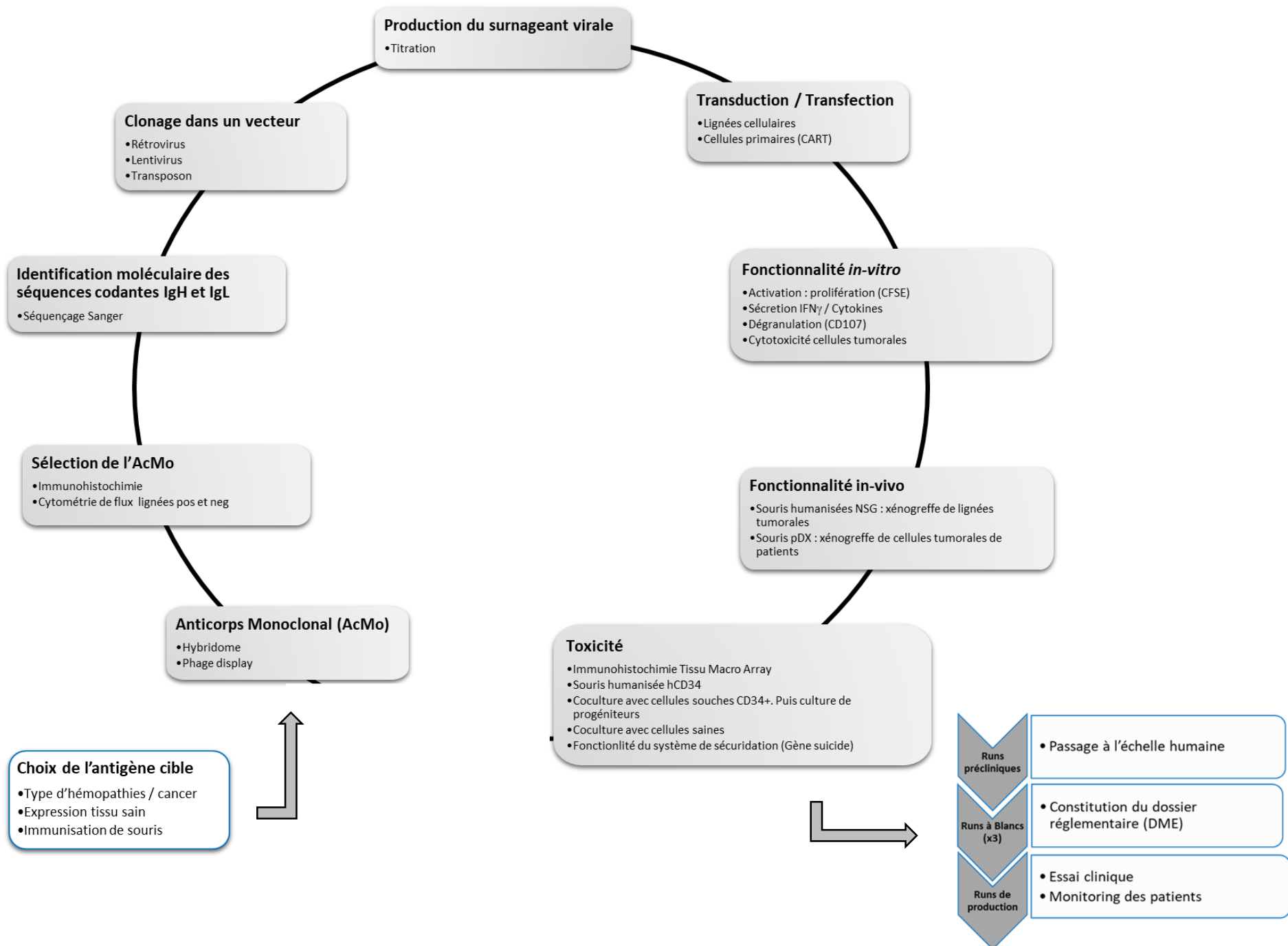
- Choix de la cible
- Construction du vecteur (CAR et gènes associés)
- Classification de l'OGM (HCB)
- Preuve de concept in vitro et in vivo (1^{er} éléments de toxicité)

Transfert et validation à l'échelle clinique

- Validation du vecteur grade clinique
- Production de cellules CART à l'échelle clinique
- Définition des critères fonctionnels des cellules CART (critères des critères libérateurs)
- Toxicité des cellules CART in vivo et in vitro
- Classification du médicament (EMA)

Production clinique

- Etablissement autorisé
- Locaux, matériels et personnels qualifiés (BPF)
- Run à Blancs (x3), Contrôles qualifiés conformes, et Dossier du Médicament expérimental (DME)
- Autorisation ANSM /EMA de l'essai (Service clinique autorisé)



Statut du produit envisagé à terme

Médicament de thérapie innovante (MTI)

Médicament de thérapie innovante préparé ponctuellement (MTI-pp)

**Phase essai clinique
Phase I, II, III
expérimentales**

Etablissement pharmaceutique (EFS) ou Etablissements autorisés UTC (EFS, Etablissements de santé)
Décret 2016-1536

Etablissement autorisé MTI-pp
Décret 2016-1236

Production du produit après autorisation ANSM ou EMA

Etablissement pharmaceutique (EFS) prépare un produit ayant une AMM (EMA)
Décret 2016-1536

Etablissement autorisé MTI-pp prépare un produit MTI-pp dont le procédé est autorisé (ANSM)