

MEMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenu publiquement le 31 août 2018

Par Mademoiselle Alix Vaissié

Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990

tient lieu de

THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Etude de faisabilité d'un essai clinique européen de
fabrication de médicament de thérapie cellulaire et génique au
CHU de Lille conformément à la réglementation

Membres du jury :

Président : **Monsieur le Professeur Pascal ODOU**
Pharmacien, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Assesseurs : **Monsieur le Professeur Guillaume DECOCQ**
Pharmacien, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens

Madame le Professeur Julie KERR-CONTE
Professeur des Universités
Faculté de Médecine de Lille

Madame le Docteur Marine PINTURAUD
Pharmacien, Assistant Hospitalier
Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Faculté de Pharmacie de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.



Faculté de Pharmacie de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Damien CUNY
Vice-présidente Formation :	Lynne FRANJIÉ
Vice-président Recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président Relations Internationales :	François-Olivier SEYS
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-Doyen et Assesseur à la Recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux Relations Internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur à la Vie de la Faculté et aux Relations avec le Monde Professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la Pédagogie :	Benjamin BERTIN
Assesseur à la Scolarité :	Christophe BOCHU
Responsable des Services :	Cyrille PORTA

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	ICPAL
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Onco et Neurochimie
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	ICPAL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	DEPREZ	Rebecca	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNE	Benoît	Bactériologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Onco et Neurochimie
M.	MILLET	Régis	ICPAL
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY	Anne Catherine	Législation
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHÉRAERT	Eric	Législation
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Lab. de Médicaments et Molécules

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mme	CHARTON	Julie	Lab. de Médicaments et Molécules
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
Mme	DUTOUT-AGOURIDAS	Laurence	Onco et Neurochimie
M.	EL BAKALI	Jamal	Onco et Neurochimie
M.	FARCE	Amaury	ICPAL
Mme	FLIPO	Marion	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	FURMAN	Christophe	ICPAL
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	ICPAL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Onco et Neurochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation
Mme	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie

Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RAVEZ	Séverine	Onco et Neurochimie
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Onco et Neurochimie
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Hai Pascal	Lab. Médicaments et Molécules
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie Pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie

REMERCIEMENTS :

A Monsieur le Professeur Pascal Odou,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail et de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Soyez assuré de ma parfaite considération et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Guillaume Decocq,

Je te remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Merci de m'avoir guidée et écoutée tout au long de mes études. Sois assuré de ma plus profonde reconnaissance.

A Madame le Professeur Julie Kerr-Conte,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Merci pour votre investissement dans ma formation. Soyez assurée de ma plus profonde gratitude et de tout mon respect.

A Madame le Docteur Marine Pinturaud,

Je te remercie d'avoir dirigé ce travail, sois assurée de ma parfaite considération et de mon profond respect.

A Madame le Docteur Michèle Vasseur,

Je vous remercie pour vos nombreux conseils et votre relecture avisée.

A toute l'équipe de la plateforme de biothérapie et du laboratoire U1190,

Merci à Rimed pour ta relecture et tes précieux conseils, merci à Sandrine et Bruno pour vos réponses à mes questions, votre disponibilité et votre patience. Merci à tous les autres membres du labo pour votre bonne humeur et votre soutien.

Au Professeur Ibrahim Yakoub-Agha,

Merci de votre soutien et d'être l'initiateur de ce projet.

A Franck,

SOMMAIRE :

Liste des tableaux :	11
Liste des figures :	12
Liste des annexes :	13
Liste des abréviations :	14
Introduction :	15
1ère Partie : Médicaments de Thérapie Innovante et Réglementation	16
<i>A) Définitions et réglementation:</i>	16
I. Définitions :.....	16
II. Réglementation :.....	22
1) Textes réglementaires relatifs aux MTI ou MTI-pp.....	22
2) Textes réglementaires relatifs aux MTI expérimentaux	24
3) Textes réglementaires pour la fabrication des MTI.....	24
<i>B) CAR-T cells</i>	29
1) Définition et principe	29
3) Efficacité et résultats scientifiques des études avec des CAR-T cells	32
4) Effets secondaires des CAR-T cells	34
5) Production des CAR-T cells.....	34
6) Prise en charge des CAR-T cells à l'hôpital	36
<i>C) Projet CARAMBA</i>	37
2ème partie : Etude de faisabilité de la production de MTI au CHU de Lille	42
<i>A) Matériel et Méthodes</i>	43
I. Besoins actuels et futurs	43
II. Etat des lieux des structures et conformités par rapport à la réglementation.....	44
a) Etat des lieux des structures	44
b) Conformité des structures existantes à la réglementation en ce qui concerne les locaux de production.....	44
i) Exigences des locaux de production et de leur monitoring	45
ii) Exigences concernant les OGM.....	47
c) Faisabilité d'une production de MTI selon le protocole CARAMBA dans les structures existantes	48
<i>B) Résultats</i>	49
I. Besoins actuels et futurs	49
II. Etat des lieux des structures existantes et conformités par rapport à la réglementation actuelle.....	51
1) L'Unité de Préparation Centralisée des Cytotoxiques (UPCC).....	52
a) Etat des lieux.....	52
b) Conformité à la réglementation actuelle	55
i) Conformité des locaux de production et de leur monitoring	55
ii) Conformités spécifiques aux OGM	56
c) Faisabilité d'une production de MTI selon le protocole CARAMBA dans les structures de la PUI.....	56
2) L'Unité Centralisée de Préparations Aseptiques	57
a) Etat des lieux.....	57
b) Conformité à la réglementation.....	59

i) Conformité des locaux de production et de leur monitoring	59
ii) Conformités spécifiques aux OGM	60
c) Faisabilité d'une production de MTI selon le protocole CARAMBA dans les structures de la PUI.	60
3) Salle blanche.....	61
a) Etat des lieux.....	61
b) Conformité à la réglementation.....	63
i) Conformités des locaux de production et de leur monitoring	63
ii) Conformités spécifiques aux OGM	64
c) Faisabilité d'une production de MTI selon le protocole CARAMBA dans les structures de la PUI.	64
4) La plateforme de biothérapie	65
a) Etat des lieux.....	65
b) Conformité à la réglementation.....	67
i) Conformité des locaux de production et de leur monitoring	67
ii) Conformités spécifiques aux OGM	68
c) Faisabilité d'une production de MTI selon le protocole CARAMBA dans la structure de la PBT	68
<i>C) Discussion :</i>	69
Conclusion :	77
Bibliographie :	78
Annexes :	81

LISTE DES TABLEAUX :

<i>Tableau 1 : MTI commercialisés ayant ou ayant eu une AMM européenne.....</i>	<i>20</i>
<i>Tableau 2 : Tableau récapitulatif des différents textes réglementaires en fonction du statut du produit.....</i>	<i>28</i>
<i>Tableau 3 : Résultats des principaux essais cliniques avec des CAR-T cells autologues dans le traitement des hémopathies malignes</i>	<i>33</i>
<i>Tableau 4 : Résultats des principaux essais cliniques avec des CAR-T cells autologues dans le traitement du myélome multiple</i>	<i>33</i>
<i>Tableau 5 : Etudes précliniques utilisant la technique de transfert de gène Sleeping Beauty.</i>	<i>40</i>
<i>Tableau 6 : Besoins actuels et futurs du CHU de Lille</i>	<i>50</i>
<i>Tableau 7 : Résumé des non conformités des différentes structures pour une production CARAMBA.....</i>	<i>69</i>

LISTE DES FIGURES :

<i>Figure 1 : Schéma du principe de la thérapie génique in vivo et ex vivo</i>	30
<i>Figure 2 : Action des CAR-T cells sur les cellules tumorales</i>	30
<i>Figure 3 : Les quatre générations de récepteur antigénique chimérique</i>	32
<i>Figure 4 : Schéma des différentes étapes de production des CAR-T cells.</i>	35
<i>Figure 5 : Schéma de production du lymphocyte T-CAR SLAMF7</i>	37
<i>Figure 6 : Système d'intégration du transposon Sleeping Beauty.</i>	39
<i>Figure 7 : Implantation de la pharmacie à usage intérieur et de la plateforme de biothérapie au CHU de Lille.</i>	51
<i>Figure 8 : Plan global de la PUI</i>	52
<i>Figure 9 : Caractéristiques aérauliques et flux de l'UPCC</i>	54
<i>Figure 10 : Caractéristiques aérauliques et flux de l'UCPA</i>	58
<i>Figure 11 : Caractéristiques aérauliques et flux de la salle blanche du préparatoire</i>	62
<i>Figure 12 : Caractéristiques aérauliques et flux de la plateforme de biothérapie</i>	66
<i>Figure 13 : Proposition d'aménagement de la surface de la plateforme de biothérapie</i> .73	
<i>Figure 14 : algorithme décisionnel de cohabitation de différents produits au sein d'une zone multi-production.</i>	75
<i>Figure 15 : schéma d'agencement d'une « structure idéale »</i>	76

LISTE DES ANNEXES :

<i>Annexe I : Annexe I du Règlement Européen (CE) n°1394/2007 du Parlement Européen et du Conseil. Liste des manipulations non substantielles.....</i>	<i>81</i>
<i>Annexe II : Mesures préventives contre les contaminations croisées (Chapitre 9.4 Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapy Medicinal Products)</i>	<i>82</i>
<i>Annexe III : Adaptations possibles concernant les MTI expérimentaux. (Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapy Medicinal Products)</i>	<i>83</i>

LISTE DES ABBREVIATIONS :

ADA : Adénosine Désaminase
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
ARS : Agence Régionale de Santé
ATMP : Advanced Therapy Medicinal Products
BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication
BPP : Bonnes Pratiques de Préparation
BPTC : Bonnes Pratiques Tissus Cellules
CAT : Committee for Advanced Therapies
CAR : Chimeric Antigen Receptor
CAR-T cell : Lymphocyte T exprimant un CAR
CEE : Communauté économique européenne
CE : Communauté européenne
CFU : Colony-Forming Unit
CSH : Cellule Souche Hématopoïétique
CSP : Code de la Santé Publique
CTA : Centrale de Traitement d'Air
DLI : Donor Lymphocyte Infusion
EMA : European Medicines Agency
FDA : Food and Drug Administration
GMP : Good Manufacturing Practice
HCB : Haut Conseil des Biotechnologies
LAL : Leucémie Aiguë Lymphoblastique
LNE : Laboratoire Nationale de métrologie et d'Essais
MTI : Médicament de Thérapie Innovante
MTI-exp : Médicament expérimental de Thérapie Innovante
MTI-PP : Médicament de Thérapie Innovante Préparé Ponctuellement
OGM : Organisme Génétiquement Modifié
PMO : Prélèvement Multi Organes
PSM : Poste de Sécurité Microbiologique
PBT : Plateforme de Biothérapie
PTC : Produit de Thérapie Cellulaire
PUI : Pharmacie à Usage Intérieur
SB : Sleeping Beauty
UCPA : Unité Centralisée de Préparations Aseptiques
UPCC : Unité de Préparation Centralisée des Chimiothérapies
UTC : Unité de Thérapie Cellulaire
ZAC : Zone à Atmosphère Contrôlée

INTRODUCTION :

Les CAR-T cells sont des lymphocytes T porteurs d'un récepteur chimérique à un antigène tumoral. Ils appartiennent à une nouvelle classe de médicaments : les Médicaments de Thérapie Innovante (MTI) et plus particulièrement à la catégorie des médicaments de thérapie génique. Depuis plusieurs années, ils font l'objet d'un nombre croissant d'essais cliniques notamment dans le traitement d'hémopathies et plus récemment dans le traitement de tumeurs solides. Dernièrement, deux d'entre eux ont eu une autorisation de mise sur le marché en Europe dans le traitement du lymphome de l'adulte et de la leucémie aigüe lymphoblastique chez l'enfant et le jeune adulte. Pour la première fois, le CHU de Lille est sollicité pour participer à un essai clinique européen multicentrique (CARAMBA) nécessitant une production de CAR-T cells sur site. Cette nouvelle demande a entraîné une réflexion pluridisciplinaire importante sur les exigences liées à leur production et leur prise en charge au CHU de Lille.

L'objectif de ce travail est d'analyser les différentes solutions permettant d'envisager la production de ces CAR-T cells au CHU de Lille, en particulier du point de vue des locaux de production. L'apparition récente de cette nouvelle classe de médicaments s'accompagne de la mise en place d'une réglementation spécifique. Nous présenterons dans une première partie le contexte réglementaire encadrant les MTI, puis nous détaillerons les spécificités des CAR-T cells et, en fin nous exposerons le projet CARAMBA. Dans une deuxième partie nous effectuerons une étude de faisabilité de ce protocole de production au sein des différentes structures du CHU de Lille susceptibles de pouvoir prendre en charge cette activité. Pour ce faire, nous dresserons à partir du chapitre spécifique aux locaux des « Guidelines on GMP specific to ATMP » et du Manuel d'utilisation des OGM du Haut Conseil des Biotechnologies, une check-list des conformités nécessaires pour une production au grade GMP, puis nous l'appliquerons aux différentes structures susceptibles d'accueillir cette production au CHU de Lille.

1ERE PARTIE : MEDICAMENTS DE THERAPIE INNOVANTE ET REGLEMENTATION

A) DEFINITIONS ET REGLEMENTATION:

I. DEFINITIONS :

Les Médicament de Thérapie Innovante (MTI) sont une nouvelle classe de médicaments regroupant plusieurs catégories, mais ils relèvent avant tout de la définition de médicaments (article 2 de la directive 2001/83/CE du Parlement Européen et du Conseil, code communautaire relatif aux médicaments à usage humain) :

« **Médicament** :

a) toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ; ou

b) toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou pouvant lui être administrée en vue soit de restaurer, de corriger ou de modifier des fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique, soit d'établir un diagnostic médical. »

L'article 2 du règlement 1394/2007/CE du Parlement européen et du Conseil (1) expose les 4 catégories de **Médicament de Thérapie Innovante** :

- Les médicaments de thérapie génique,
- Les médicaments de thérapie cellulaire somatique,
- Les médicaments issus de l'ingénierie tissulaire,
- Les médicaments combinés de thérapie innovante.

La Commission Européenne définit les médicaments de thérapie génique et les médicaments de thérapie cellulaire somatique (partie IV, annexe I, directive 2003/63/CE) (2) :

Médicament de thérapie génique : par médicament de thérapie génique, on entend un médicament biologique qui a les caractéristiques suivantes :

a) il contient une substance active qui contient ou constitue un acide nucléique recombinant administré à des personnes en vue de réguler, de réparer, de remplacer, d'ajouter ou de supprimer une séquence génétique.

b) son effet thérapeutique, prophylactique ou diagnostique dépend directement de la séquence d'acide nucléique recombinant qu'il contient ou au produit de l'expression génétique de cette séquence

Exemple: Strimvelis® indiqué dans le traitement des immunodéficiences combinées sévères dues à un déficit en adénosine désaminase (ADA). Il s'agit d'une fraction cellulaire enrichie en cellules CD34+ autologues transduites avec un vecteur rétroviral codant pour la séquence du gène ADA.

Médicament de thérapie cellulaire somatique : par médicament de thérapie cellulaire somatique, on entend un médicament biologique qui présente les caractéristiques suivantes :

a) contient ou consiste en des cellules ou des tissus qui ont fait l'objet d'une manipulation substantielle de façon à modifier leurs caractéristiques biologiques, leurs fonctions physiologiques ou leurs propriétés structurelles par rapport à l'usage clinique prévu, ou des cellules ou tissus qui ne sont pas destinés à être utilisés pour la ou les mêmes fonctions essentielles chez le receveur et le donneur ;

b) est présenté comme possédant des propriétés permettant de traiter, de prévenir ou de diagnostiquer une maladie à travers l'action métabolique, immunologique ou pharmacologique de ses cellules ou tissus, ou est utilisé chez une personne ou administré à une personne dans une telle perspective. »

L'annexe 1 (en Annexe I) du règlement 1394/2007 (1) cite de manière non exhaustive des modifications non substantielles. Les manipulations généralement considérées comme substantielles par le Committee for Advanced Therapies (CAT) sont par exemple la culture ex vivo, l'expansion ou l'activation ex vivo, l'altération du phénotype cellulaire et la manipulation génétique incluant le transfert de gènes ou la modification du génome.

Exemple: Stempeucel® indiqué dans le traitement de l'ischémie critique des membres inférieurs. Il s'agit de cellules souches mésenchymateuses stromales allogéniques dont la fonction essentielle est différente chez le donneur et le receveur.

L'article 2 du règlement 1394/2007/CE du Parlement européen et du Conseil (1) définit les médicaments issus de l'ingénierie tissulaire et les médicaments combinés de thérapie innovante :

Un **produit issu de l'ingénierie tissulaire** est un produit :

- qui contient des cellules ou tissus issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire, ou en est constitué, et

- qui est présenté comme possédant des propriétés lui permettant de régénérer, réparer ou remplacer un tissu humain, ou est utilisé chez l'être humain ou administré à celui-ci dans ce but.

Sont considérés comme « issu(s) de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire » les cellules ou tissus qui répondent à au moins l'une des conditions suivantes :

- les cellules ou tissus ont été soumis à une manipulation substantielle, de façon à obtenir des caractéristiques biologiques, des fonctions physiologiques ou des propriétés structurelles utiles à la régénération, à la réparation ou au remplacement recherchés.,

- les cellules ou les tissus ne sont pas destinés à être utilisés pour la (les) même(s) fonction(s) essentielle(s) chez le receveur et chez le donneur.

Exemple: Holocar[®] indiqué dans le traitement des déficits modérés à sévères de cellules souches limbiques dus à des brûlures oculaires. Il s'agit de cellules souches limbiques autologues sur une membrane de fibrine après une expansion *ex-vivo*.

Un **médicament combiné de thérapie innovante** est un médicament de thérapie innovante qui satisfait aux conditions suivantes :

- il doit incorporer comme partie intégrante un ou plusieurs dispositifs médicaux (art. 1^{er} directive 93/42/CEE) (3), ou bien un ou plusieurs dispositifs médicaux implantables actifs (art. 1^{er} directive 90/385/CEE) (4), et

- sa partie cellulaire ou tissulaire doit contenir des cellules ou des tissus viables, ou

- sa partie cellulaire ou tissulaire contenant des cellules ou des tissus non viables doit être susceptible d'avoir sur le corps humain une action qui peut

être considérée comme essentielle par rapport à celle des dispositifs précités. »

Exemple: Maci® indiqué dans le traitement des défauts de cartilage articulaire au niveau du genou. Il s'agit de chondrocytes autologues expandus *ex-vivo* sur une membrane de collagène de type I/III d'origine porcine.

Le règlement 1394/2007/CE du Parlement européen et du Conseil (1) explique qu'un médicament relevant à la fois de la définition de médicament de thérapie cellulaire somatique OU de produit issu de l'ingénierie tissulaire ET de médicament de thérapie génique est considéré comme un médicament de thérapie génique.

Le tableau 1 ci-dessous recense les différents MTI ayant ou ayant eu une autorisation de mise sur le marché européenne.

Nom commercial	Composition	Indication	Catégorie de MTI	Date et statut de l'AMM
ChondroCelect®	Chondrocytes autologues sur membrane biologique (collagène)	Réparation des lésions cartilagineuses du genou	Issus de l'ingénierie tissulaire	2009-2016 Retrait (à la demande du fabricant)
Glybera® (alipogène tiparvovec)	Variante du gène de la lipoprotéine lipase dans un vecteur viral	Déficits familiaux en lipoprotéine lipase	Thérapie génique	2012- En cours
Maci®	Chondrocytes autologues sur membrane de collagène porcine	Réparation des lésions cartilagineuses du genou	Issus de l'ingénierie tissulaire	2013-2014 Suspendu (retrait de l'autorisation pour le site de fabrication)
Provenge®	Cellules dendritiques CD54+ autologues activées par une protéine recombinante	Cancer de la prostate métastatique résistant au traitement hormonal	Thérapie cellulaire	2013-2015 Retrait (à la demande du fabricant)

Holoclar [®]	Cellules souches limbiques autologues sur membrane de fibrine	Déficits en cellules souches limbiques causés par une brûlure	Issus de l'ingénierie tissulaire	2014- En cours
Imlygic [®] (talimogène laherparepvec)	Séquence codante du GM-CSF insérée dans un herpes virus simplex atténué	Mélanomes métastatiques non résecables	Thérapie génique	2015- En cours
Strimvelis [®]	Fraction cellulaire enrichie en CD34+ autologues et transduites avec un vecteur viral codant pour le gène ADA	Immunodéficiences combinées sévères dues à un déficit en Adénosine désaminase	Thérapie génique	2016- En cours
Zalmoxis [®]	Cellules T allogéniques modifiées génétiquement pour exprimer le récepteur humain low affinity nerve growth factor (Δ LNGFR) et la thymidine kinase HSV-1	Traitement adjuvant aux greffes de CSH haploidentiques dans le traitement d'hémopathies malignes	Thérapie génique	2016- En cours

Tableau 1 : MTI commercialisés ayant ou ayant eu une AMM européenne

Les Médicaments de Thérapie Innovante préparés ponctuellement : MTI-pp

Un statut, à part, comprenant ces différentes catégories, a été créé en France: les **MTI-PP**, ce sont des MTI préparés ponctuellement et définis par l'article 28 du règlement 1394/2007/CE (1) comme:

- « médicaments de thérapie innovante préparés de façon ponctuelle,
- selon des normes de qualité spécifiques,
- et utilisés au sein du même Etat membre, dans un hôpital, sous la responsabilité professionnelle exclusive d'un médecin, pour exécuter une prescription médicale déterminée,

- pour un produit spécialement conçu à l'intention d'un malade déterminé ».

Il convient de distinguer ces médicaments de thérapie innovante des préparations de thérapie cellulaire (PTC) pour lesquelles sont autorisés à manipuler les Unités de thérapie cellulaire hospitalières (UTC).

Contrairement aux MTI, ce sont des produits cellulaires ou tissulaires dont le processus de production ne requiert pas de modifications substantielles et dont la finalité thérapeutique est la même chez le donneur et le receveur. Si l'une de ces conditions n'est pas respectée, le produit sera considéré comme un MTI (ou un MTI-PP).

Exemple : greffe de cellules souches hématopoïétiques dans le traitement des hémopathies malignes.

II. REGLEMENTATION :

Les médicaments de thérapie innovante font l'objet d'un contexte normatif complexe, en particulier parce que leur action principale repose sur un ou des composants du vivant.

Jusqu'en 2003, les médicaments innovants étaient régis par les lois nationales de chacun des pays. En vue d'uniformiser et d'harmoniser les pratiques afin d'en permettre la libre circulation dans l'Union européenne, les institutions de celle-ci ont édicté plusieurs règles. Ces règles émanent, dans l'ordre hiérarchique, soit du Parlement européen, soit du Conseil de l'Union européenne, soit de la Commission européenne. Elles revêtent la forme de règlements ou de directives. Les règlements européens sont par essence uniformes et directement applicables sur tout le territoire de l'Union sans qu'ils nécessitent une transposition dans le droit national de chaque État membre. Les directives, quant à elles, doivent être transposées par l'autorité législative ou réglementaire nationale.

1) Textes réglementaires relatifs aux MTI ou MTI-pp

La directive 2003/63/CE (2) qui modifie la directive 2001/83/CE (5) est le texte réglementaire où le terme « thérapie innovante » est pour la première fois utilisé et définit les termes de médicaments de thérapie génique et de médicaments de thérapie cellulaire ainsi que leurs exigences spécifiques.

Le règlement 1394/2007/CE (1) du Parlement et du Conseil est une *lex specialis* qui prévaut sur les *leges generales* et expose dans ses considérants la nécessité d'avoir une définition juridique précise pour les produits thérapeutiques complexes (« lorsque les produits sont réalisés à partir de cellules ou tissus viables, l'action pharmacologique, immunologique ou métabolique doit être considérée comme le mode d'action principal ») dont font partie les MTI. Il édicte des règles harmonisées adéquates pour permettre la libre circulation dans la Communauté « en raison de la nouveauté, de la complexité et de la spécificité technique des médicaments de thérapie innovante » des MTI préparés de façon industrielle.

Ce règlement évoque aussi la création d'un comité de thérapie innovante (CAT – Committee for Advanced Therapies) (Chapitre 7) sous l'égide de l'Agence Européenne du Médicament (EMA) qui émettra un avis expert sur les différentes thérapeutiques et leur classification éventuelle en MTI ainsi que leur catégorie.

Il établit que les MTI doivent suivre la directive 2004/23/CE (6) en matière de qualité et de sécurité pour le don, l'obtention, le contrôle des tissus et cellules humaines.

L'arrêté du 4 février 2013 (7) fixe le contenu des demandes d'autorisation des MTI-PP qui sont délivrées par l'ANSM : autorisation du fabricant, autorisation pour le médicament, autorisation des essais cliniques portant sur des MTI-PP. Ils sont régulés au niveau national.

Cas particulier des médicaments de thérapie génique:

Réglementairement, les MTI de thérapie génique sont également des organismes génétiquement modifiés (OGM). À ce titre, un avis de classement du Haut Conseil des Biotechnologies (HCB) doit être demandé et sera restitué sous forme d'arrêté définissant le niveau de classification du produit : Groupe 1 (risque le plus faible) à Groupe 4 (risque le plus élevé) en fonction du risque d'exposition estimé pour la santé humaine et du risque de dissémination pour l'environnement. Le HCB a adopté un système de quatre niveaux de confinement en fonction du niveau de risque de l'OGM (article D532-3 du Code de l'environnement).

	Correspondance Groupe de danger et Agent pathogène			
	Non pathogènes	Pathogènes		
Selon le Code de l'environnement	Groupe I	Groupe II	Groupe III	Groupe IV
Classes de confinement des OGM	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4

Le classement est différent pour l'étape de production assurée par l'établissement pharmaceutique et pour l'établissement de santé responsable de la délivrance. L'arrêté est valable 5 ans et doit faire l'objet d'un renouvellement.

Ce classement justifie des exigences particulières en termes de sécurité, de locaux (locaux de manipulation du produit et chambre du malade) et d'élimination des déchets telles qu'elles sont définies dans le Manuel d'Utilisation Confinée des OGM en milieu hospitalier (8).

Un dossier DUO doit également être réalisé après classement du HCB et transmis au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR) et sera différent en fonction du classement du produit :

- soit un dossier de déclaration d'utilisation confinée d'organismes génétiquement modifiés à des fins de recherches biomédicales en cas de confinement C1;
- soit un dossier de demande d'autorisation d'utilisation confinée d'organismes génétiquement modifiés à des fins de recherches biomédicales pour les autres classes de confinement.

2) Textes réglementaires relatifs aux MTI expérimentaux

Le règlement (UE) 536/2014 du Parlement Européen et du Conseil (9) abroge la directive 2001/20/CE (10) et concerne tous les essais cliniques qui ont lieu dans l'Union Européenne. Dans ses considérants il introduit le terme de "médicament expérimental de thérapie innovante".

3) Textes réglementaires pour la fabrication des MTI

a. Exigences en termes de locaux et équipements

De par leur statut de médicaments les MTI doivent répondre aux exigences de fabrication des médicaments. La directive 2003/94/CE (11) de la Commission établit les principes et lignes directrices des bonnes pratiques de fabrication concernant les médicaments à usage humain et les médicaments expérimentaux à usage humain. Cette directive donne pouvoir à la Commission de définir des lignes directrices, notamment concernant les locaux et les équipements (Article 8) et la production (Article 10).

Conformément au **règlement 1394/2007/CE (1)**, la Commission Européenne a adopté et édité les **règles de Bonnes Pratiques de Fabrication spécifiques aux médicaments de thérapie innovante** en novembre 2017. Ce document est donc le document de référence pour toute fabrication de MTI dans toute l'Union Européenne (les exigences concernant les locaux de fabrication sont détaillées en partie 2).

b. Exigences en termes d'autorisation

Le décret n°2016-1536 du 15 novembre 2016 (12) relatif aux médicaments de thérapie innovante est la transposition en droit français de la directive 2001/83/CE (5). Ce décret modifie le code de la santé publique dans son article R.4211-53 (13): « établissements

de santé titulaires de l'autorisation mentionnée à l'article L.1243-2 et qui remplissent les conditions pour bénéficier de l'autorisation prévue à l'article L.4211-9-2 (14) pour procéder, dans le cadre de recherches mentionnées au premier alinéa de l'article L.1121-1 (15), aux activités de fabrication, d'importation, d'exportation et de distribution de médicaments de thérapie innovante définies à l'article 2 du règlement (CE) n°1394/2007 (1) relatifs aux médicaments de thérapie innovante ».

L.1243.2 du CSP (16): autorisation de préparation, conservation, distribution et cession, à des fins thérapeutiques autologues ou allogéniques, des tissus et leurs dérivés et des préparations de thérapie cellulaire.

L.4211-9-2 du CSP (14) : Les établissements de santé titulaires de l'autorisation mentionnée à l'article L.1243-2 peuvent assurer la fabrication, l'importation, l'exportation, la distribution et l'exploitation des médicaments de thérapie innovante définis à l'article 2 du règlement (CE) 1394/2007 s'ils disposent pour ces activités d'une autorisation délivrée par l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé.

Particularités des MTI-PP :

Concernant les MTI-PP, **le règlement 1394/2007/CE (1)** du Parlement et du Conseil introduit les spécificités principalement concernant leur autorisation de fabrication : « la fabrication de ces produits est autorisée par l'autorité compétente de l'Etat membre. Les Etat membres veillent à ce que les exigences nationales de traçabilité et de pharmacovigilance, ainsi que les normes de qualité spécifiques mentionnées au présent paragraphe, soient équivalentes à celles prévues au niveau communautaire ».

L'article 28 du règlement **1394/2007/CE (1)** constitue une exemption hospitalière. En effet, il permet aux établissements publics de santé de pouvoir fabriquer ces MTI-PP sans être établissements pharmaceutiques. L'objectif étant de laisser une certaine souplesse pour des médicaments « nationaux » fabriqués en petite série et utilisés dans un seul état membre et sous sa responsabilité.

Le décret 2012-1236 du 6 novembre 2012 (17) relatif aux médicaments de thérapie innovante « fixe les conditions d'autorisation des établissements fabriquant des MTI-PP, utilisés dans un hôpital en France » et « définit les conditions dans lesquelles des

organismes à but non lucratif et des établissements publics autres que les établissements de santé pourront créer des établissements pharmaceutiques en leur sein pour préparer les médicaments de thérapie innovante qui ne peuvent être préparés que dans des établissements pharmaceutiques et dont l'autorisation de mise sur le marché se fait au niveau communautaire. »

L 'arrêté du ministre de la Santé du 4 février 2013 (7) fixe le contenu des demandes d'autorisation initiale, de renouvellement d'autorisation ou de modification d'autorisation des médicaments de thérapie innovante préparés ponctuellement et des établissements ou organismes qui préparent ce produit.

Le décret n°2016-1536 (12) modifie également le code de la santé publique :

Art. R.4211-42 : « les établissements ou organismes qui préparent ou importent des médicaments expérimentaux de thérapie innovante préparés ponctuellement s'assurent que toutes les opérations de préparation sont réalisées conformément à l'information donnée par le promoteur dans le dossier de demande d'autorisation mentionnée à l'article L.1123-8 et acceptée par l'ANSM. L'établissement ou organisme importateur s'assure que les médicaments expérimentaux de thérapie innovante préparés ponctuellement qu'il importe :

- 1) ont été soumis à des normes de bonnes pratiques de fabrication au moins équivalentes à celles que prévoit l'article L.5121-5 ;
- 2) ont été fabriqués par un fabricant autorisé ou, le cas échéant, notifié aux autorités compétentes de l'Etat dans lequel le fabricant est installé, et accepté par elles à cette fin. »

L'article L.5121-5 fait référence aux Bonnes Pratiques de Fabrication des médicaments à usage humain.

Médicaments expérimentaux :

Le règlement (UE) 536/2014 (9) expose à l'article 63 les conditions nécessaires à la fabrication et à l'importation des médicaments expérimentaux « conformément à des pratiques de fabrication garantissant leur qualité afin de protéger la sécurité des participants et de veiller à la fiabilité et à la robustesse des données cliniques obtenues lors de l'essai clinique ».

Le décret n°2016-1536 du 15 novembre 2016 (12) modifie le code de la santé publique dans son article R.4211-53 (section 9 « Autorisation des établissements de santé exerçant des activités portant sur les médicaments de thérapie innovante dans le cadre des recherches biomédicales ») (13). Ce texte explique que les unités de thérapies cellulaires déjà autorisées, par l'article L1243-2 (16), à produire des PTC peuvent être autorisées, dans le cadre de recherches biomédicales, à fabriquer, importer, exporter et distribuer des MTI expérimentaux.

En conclusion, les MTI constituent un groupe complexe de médicaments de nature très variable. C'est le CAT de l'EMA qui est chargé de confirmer le caractère innovant de ces médicaments et de classer les produits au cas par cas afin qu'il soit ensuite possible de se référer au cadre réglementaire qui convient (tableau 2).

Les différences réglementaires entre ces statuts (MTI, MTI-PP et PTC) imposent aux « développeurs » de déterminer le plus rapidement possible la qualification de leurs produits dans le but de se référer aux bons textes pour le développement de leur produit.

	MTI			PTC
	MTI	MTI-PP	MTI exp	
Définition & réglementation	Directive 2003/63/CE Règlement 1394/2007			Directive 2004/23/CE
Fabrication	Directive 2003/94/CE Règlement 1394/2007/CE (GMP spécifiques aux MTI)			
	Réglementation française : Décret 2016-1536	Réglementation française : Décret 2012-1236 Arrêté 4 fev 2013	Réglementation française : Décret 2016-1536	
	Etablissements pharmaceutiques (publics ou privés)	Etablissements pharmaceutiques (publics ou privés) et autres établissements autorisés par l'ANSM	Etablissements de santé autorisés (L.1243-2)	Unité de thérapie cellulaire
	Guidelines on GMP specific to ATMP applicable en mai 2018			BP "tissus-cellules"
Essais cliniques	Règlement 536/2014 Directive 2003/63/CE			Directive 2004/23/CE
AMM	AMM Européenne	AMM Nationale		AMM Nationale
Vigilance	Pharmacovigilance			Biovigilance

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des différents textes réglementaires en fonction du statut du produit (GMP specific to ATMP: Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapy Medicinal Products)

B) CAR-T CELLS

1) Définition et principe

L'injection de lymphocytes T autologues (DLI = Donnor Lymphocytes Infusion) dans le but de moduler l'effet anti-leucémique après une greffe de cellules souches hématopoïétiques est utilisé depuis plus de 20 ans en hématologie. Dans cette utilisation les lymphocytes n'ont subi aucune modification substantielle et sont des Produits de Thérapie Cellulaire.

La technique des CAR-T cells est d'utiliser également les lymphocytes T du patient et de les modifier génétiquement, avant réinjection, pour qu'il exprime un récepteur chimérique à un antigène tumoral (CAR, Chimeric Antigen Receptor).

Deux méthodes de thérapie génique existent : la méthode *in vivo* et la méthode *ex vivo* (figure 1) :

- La thérapie génique *in vivo* consiste en l'injection d'un vecteur viral contenant le gène d'intérêt qui s'intégrera dans les cellules du patient.
Exemple : Imlygic® (Talimogene laherparepvec) le gène thérapeutique codant pour le GM-CSF est contenu dans un Herpes simplex virus modifié et est injecté au patient directement dans les lésions tumorales cutanées.
- La thérapie génique *ex vivo* quant à elle se fait après prélèvement des cellules du patient, les cellules sont modifiées génétiquement *ex vivo* puis cultivées avant d'être réintroduites chez le patient. Les CAR-T cells sont donc une technique de thérapie génique *ex vivo*.

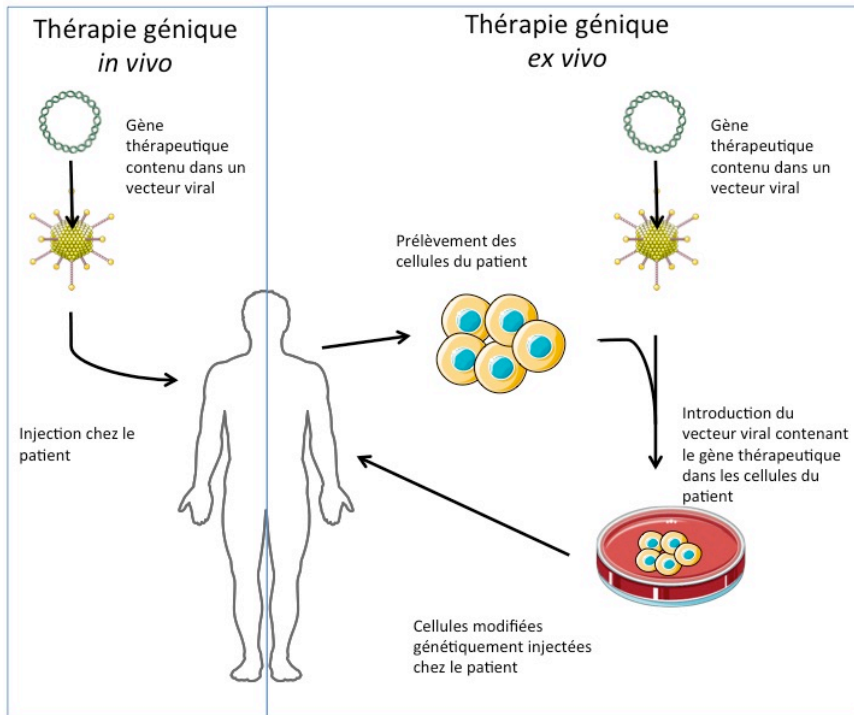


Figure 1 : Schéma du principe de la thérapie génique *in vivo* et *ex vivo*

La spécificité des lymphocytes à cibler les cellules tumorales du patient est réalisée grâce à l'expression à leur surface d'un récepteur chimérique à un antigène des cellules tumorales.

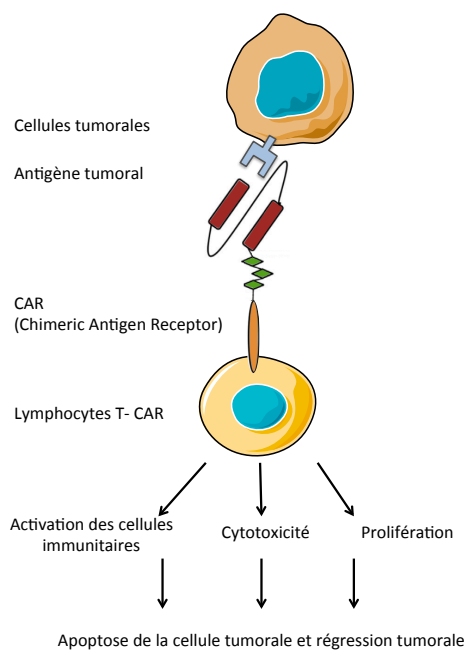


Figure 2 : Action des CAR-T cells sur les cellules tumorales

D'un point de vue réglementaire les CAR-T cells répondent au statut de MTI et en particulier à la définition de médicament de thérapie génique et classés comme tel par le CAT de l'EMA en accord avec le règlement 1394/2007/CE. Les CAR-T cells sont des organismes génétiquement modifiés (OGM) et doivent faire l'objet d'un avis du Haut Conseil des Biotechnologies (HCB). A ce jour, tous les CAR-T cells en développement ont été classés C1 par le HCB (confinement minimal).

2) Composition

Les lymphocytes T-CAR sont constitués de deux parties. La partie extracellulaire est responsable de la reconnaissance de l'antigène à l'aide d'une région variable à simple chaîne et la partie intracellulaire est responsable de la transduction du signal. Afin de maximiser la fonctionnalité (cytotoxicité, prolifération, sécrétion de cytokines, résistance et persistance *in vivo*) des lymphocytes T-CAR, des améliorations de la partie intracellulaire ont été faites donnant lieu à plusieurs générations de CAR (Figure 3).

1^{re} génération : la partie intracellulaire est composée de la chaîne zêta du complexe CD3 (CD3 ζ) conférant au CAR une capacité de sécrétion de cytokines et de lyse des cellules tumorales (18).

2^{ème} génération : une molécule de co-stimulation (CD28, CD27, CD137 (4-1BB) ou CD134 (OX40)) est ajoutée au complexe CD3 ζ de la partie intracellulaire permettant d'augmenter l'expansion et la persistance des CAR-T cells *in vivo* ainsi que leur activité anti-tumorale (19-21).

3^{ème} génération : combinaison de deux domaines de co-stimulation au complexe CD3 ζ induisant une augmentation de la production de cytokines et de l'activité anti-tumorale (22).

4^{ème} génération : combinaison d'un CAR de 2^e ou 3^e génération à l'IL-12 pour former les TRUCKs (T cell Redirected for Universal Cytokine-mediated Killing). Les TRUCKs ont une capacité d'activation des lymphocytes T augmentée et modulent le microenvironnement tumoral en attirant les cellules de l'immunité innée pour aider à l'élimination des cellules cibles (23).

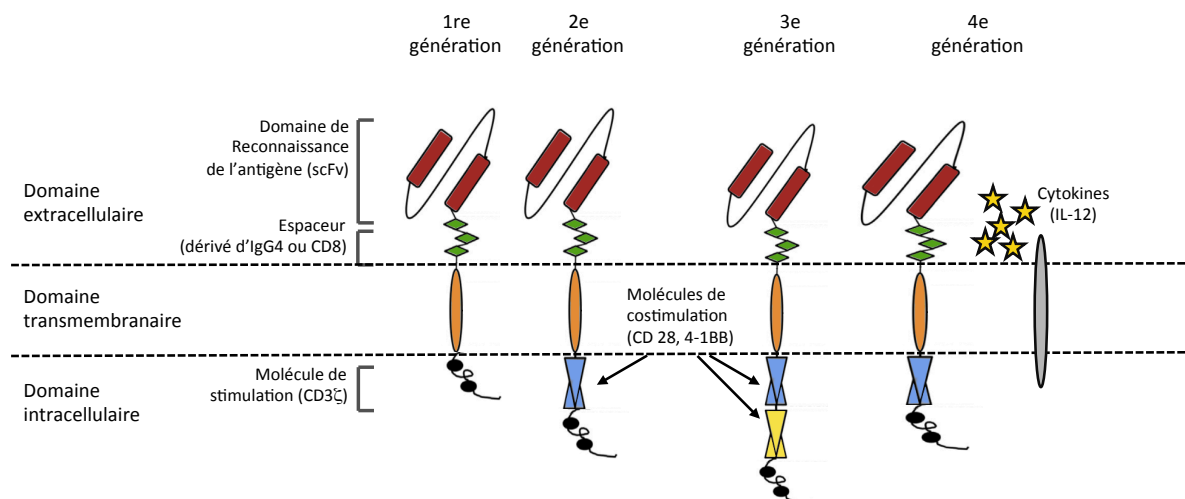


Figure 3 : Les quatre générations de récepteur antigénique chimérique (CAR)

3) Efficacité et résultats scientifiques des études avec des CAR-T cells

Au vu des résultats spectaculaires (tableau 3 et 4) cette technologie crée un grand enthousiasme dans la communauté scientifique notamment pour le traitement de certaines hémopathies malignes mais également dans le traitement de tumeurs solides (carcinome colorectal, cancer du sein, métastases hépatiques)(24) et des maladies auto-immunes.

Les premières études évaluant des CAR-T cells ont été réalisées dans le traitement de la leucémie aigüe lymphoïde de l'enfant et ciblent l'antigène CD19 présent en grande quantité à la surface des cellules tumorales.

Nom de l'étude ou institution	Nom/ caractéristique du CAR	Pathologie	Réponse	Statut de l'étude
MSK	JCAR015	LAL de l'adulte	RC : 95%	En cours
CHOP	CTL019	LAL de l'enfant	RC : 94%	En cours
ZUMA-4	KTE-C19	LAL de l'enfant	RC : 100%	En cours
Seattle Children's Hospital	JCAR017	LAL de l'adulte et de l'enfant	RC : 93%	En cours
NIH/NCI	CD3z-CD28	Lymphome Non Hodgkinien	RC : 55% RP : 18%	En cours
JULIET	CTL019 4-1BB-CD3z	Lymphome diffus à grandes cellules B	RC : 43% RP : 16%	En cours

ZUMA-1	KTE-C19	Lymphome Non Hodgkinien agressifs	RC : 47% RP : 29%	En cours
TRANSCEND	JCAR017 4-1BB-CD3z	Lymphome Non Hodgkinien en rechute/réfractaire	RC : 52%	En cours de recrutement
University of Pennsylvania	CTL019	Leucémie Lymphoïde Chronique	RC : 28% RP : 28%	En cours

Tableau 3 : Résultats des principaux essais cliniques avec des CAR-T cells autologues dans le traitement des hémopathies malignes (LAL : Leucémie Aiguë Lymphoblastique ; RC : Rémission Complète ; RP : Rémission Partielle ; adapté de J. Gauthier et al. Current Research in translationalmedicine 2017 et I. Yakoub-Agha et al. Bulletin du Cancer 2017).

Nom de l'étude ou institution	Antigène cible	Pathologie	Réponse	Statut de l'étude
CRB-401	BCMA	Myélome multiple	RC: 33 %	En cours
LEGEND-2	BCMA	Myélome multiple	RC : 27 %	En cours
University of Pennsylvania	CD19	Myélome multiple		En cours
NIH/NCI	BCMA	Myélome multiple		En cours

Tableau 4 : Résultats des principaux essais cliniques avec des CAR-T cells autologues dans le traitement du myélome multiple (adapté de J. Gauthier et al. Current Research in translationalmedicine 2017)

Les deux premiers médicaments de thérapie innovante composés de CAR-T cells ont été approuvés en 2017 par la FDA et en 2018 par l'EMA. Le premier est le Kymriah® (tisagenlecleucel), indiqué dans le traitement du lymphome B à grandes cellules chez l'adulte et de la leucémie aigüe lymphoblastique de l'enfant et du jeune adulte en troisième ligne de traitement (83% de rémission). Il est produit par Novartis à l'aide d'un lentivirus, administré en dose unique et coûte 465 000 dollars soit 400 000 euros. Le deuxième est le Yescarta® (axicabtagene ciloleucel) dans le traitement des patients adultes atteints de lymphome B à grandes cellules en troisième ligne de traitement. Il est produit par Kite/Gilead à l'aide d'un rétrovirus et coûte 373 000 dollars soit 317 000 euros par traitement. D'autres industriels travaillent activement à la production de CAR-T cells, notamment Collectis, Juno therapeutics ou Celgene que ce soit pour le traitement d'hémopathies ou de tumeurs solides.

4) Effets secondaires des CAR-T cells

Les CAR-T cells présentent certaines complications dont les principales sont:

- Le **syndrome de relargage cytokinique** représente la complication la plus fréquente avec une incidence variable en fonction des études entre 50 et 100% incluant 2 à 50% de formes sévères. Il se manifeste cliniquement par une fièvre élevée, une altération de l'état général, des myalgies, des sueurs, des frissons, une anorexie, une fuite capillaire et survient quelques heures à quelques jours après l'injection des CAR-T cells. Il est dû au relargage massif des cytokines pro-inflammatoires et en particulier de l'Interleukine-6. Les facteurs de risques sont la charge tumorale, le nombre de cellules injectées, la nature et le type de CAR ainsi que les molécules utilisées pour la lymphodéplétion. Sa prise en charge repose principalement sur l'administration d'anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur à l'IL-6 (tocilizumab, siltuximab) ainsi qu'une prise en charge symptomatique. Ce syndrome grave et nécessitant une prise en charge rapide serait le reflet d'une efficacité des CAR-T cells. En effet une relation existerait entre sa survenue et le degré d'activation des lymphocytes T et leur expansion (25).
- Le **syndrome de lyse tumorale** qui peut être dû au conditionnement utilisé ou à la toxicité directe des CAR-T cells.
- La **toxicité neurologique** observée uniquement lors d'essais cliniques avec des CAR-T cells anti-CD19, présente une clinique variable : signes d'encéphalopathie, crises convulsives, syndrome confusionnel, coma, épilepsie, céphalées, tremblements. L'incidence entre les études varie de 12 à 55%.

Ces effets indésirables doivent être anticipés et nécessitent une prise en charge pluridisciplinaire (unité de thérapie cellulaire clinique, unité de soins intensifs et service de neurologie).

5) Production des CAR-T cells

Différentes étapes sont nécessaires pour produire les CAR-T cells :

- Aphérèse et séparation des cellules mononuclées dans le but de conserver uniquement les lymphocytes T (du patient lui même après irradiation si greffe autologue ou d'un donneur sain pour une approche allogénique)

- Activation ex vivo par des cytokines (anti-CD3 seul ou associé à anti-CD8) pour « immuno-sélectionner » les lymphocytes T
- Transduction du CAR dans le lymphocyte T par des vecteurs viraux (gammarétrovirus ou lentivirus) ou par voie non virale (électroporation, transposon sleeping beauty ou transfection d'ARNm)
- Amplification des lymphocytes T transduits
- Contrôles qualités et libération du produit

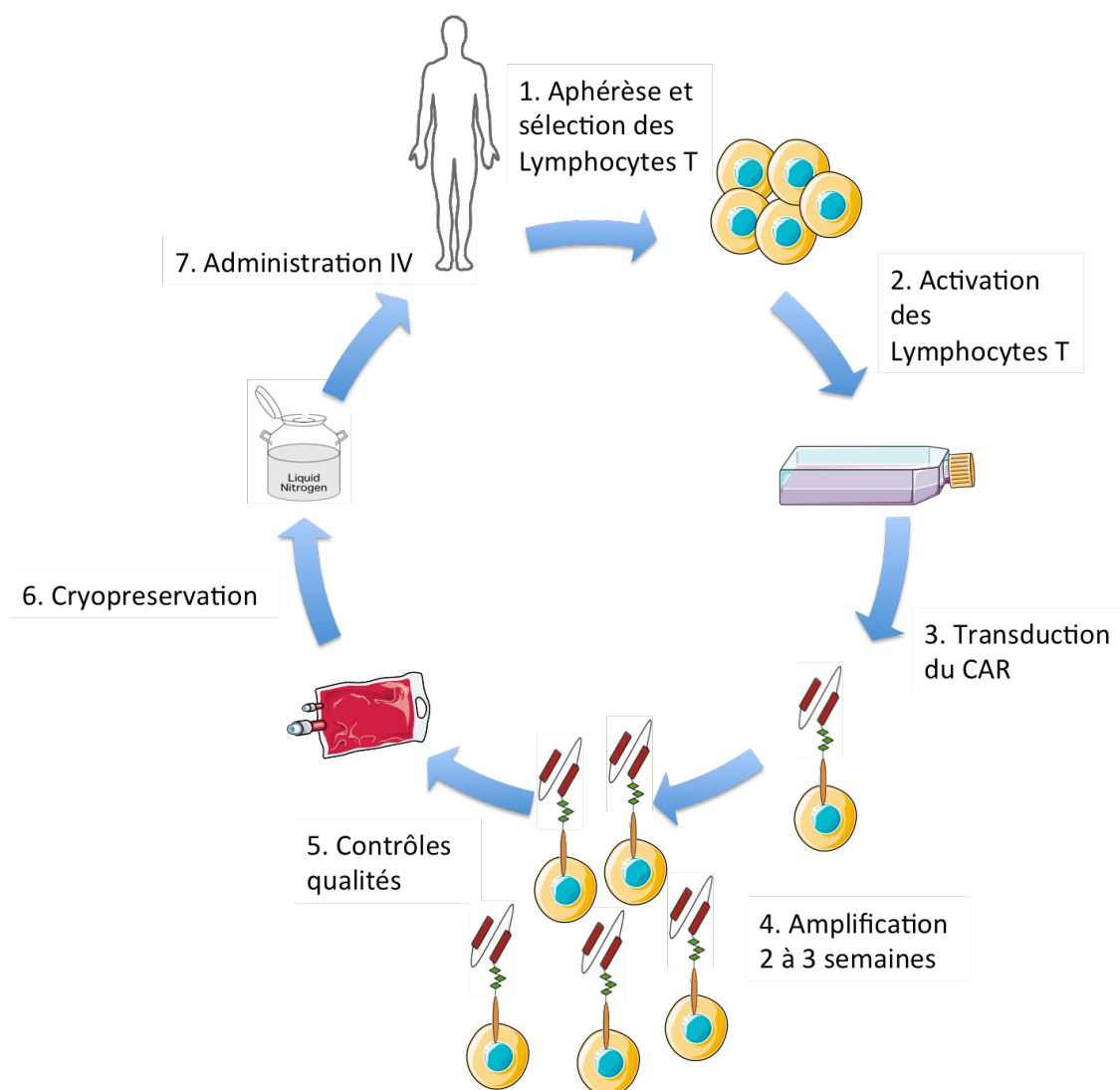


Figure 4 : Schéma des différentes étapes de production des CAR-T cells.

La production de CAR-T cells est excessivement onéreuse en particulier de par leur processus de fabrication long et conforme aux normes BPF. L'utilisation d'approches non virales développées plus récemment permettrait de raccourcir les processus de fabrication et donc la réduction des coûts de production (26). Un autre avantage de la production de CAR-T cells par une méthode n'utilisant pas de vecteurs viraux est la réduction des risques de mutagenèse et de génotoxicité (27). Une telle production

semble être une promesse d'avenir, en particulier dans le but d'ouvrir cette thérapeutique à un plus grand nombre de patients et de pathologies.

6) *Prise en charge des CAR-T cells à l'hôpital*

La Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire a édité des recommandations concernant les prérequis nécessaires pour la mise en place dans les hôpitaux de protocoles de recherche clinique évaluant des CAR-T cells. Ces prérequis concernent les unités cliniques de greffe, les unités de cytophérèse, les unités de thérapie cellulaire et la pharmacie à usage intérieur (25).

De par leur statut de médicament, les CAR-T cells doivent être pris en charge par les Pharmacies à Usage Intérieur (PUI). La manipulation de cellules génétiquement modifiées n'est pas habituelle en PUI et nécessite une réorganisation non négligeable des équipes et des locaux de la pharmacie. Une bonne communication est indispensable entre les différents intervenants du circuit de la réception du médicament en dry-shipper à l'administration dans le service de soins jusqu'au suivi du patient après administration

Une convention peut être réalisée avec les Unités de Thérapie Cellulaire des Centres Hospitaliers, habituées et adaptées à la manipulation des Produits de Thérapie Cellulaire, pour certaines étapes du circuit du médicament notamment le stockage en azote des CAR-T cells ou leur manipulation le cas échéant.

C) PROJET CARAMBA

1) Présentation du produit à l'étude

Le projet CARAMBA est un essai clinique européen utilisant un CAR-T cell anti SLAMF7 dans le traitement du myélome multiple. SLAMF7 est une molécule qui est exprimée uniformément chez les patients atteints de myélome. C'est un essai clinique de phase I/II multicentrique européen. Il s'agit d'un traitement en une seule administration autologue de CAR-T cells.

2) Méthode de production du CAR-T cells anti-SLAMF7

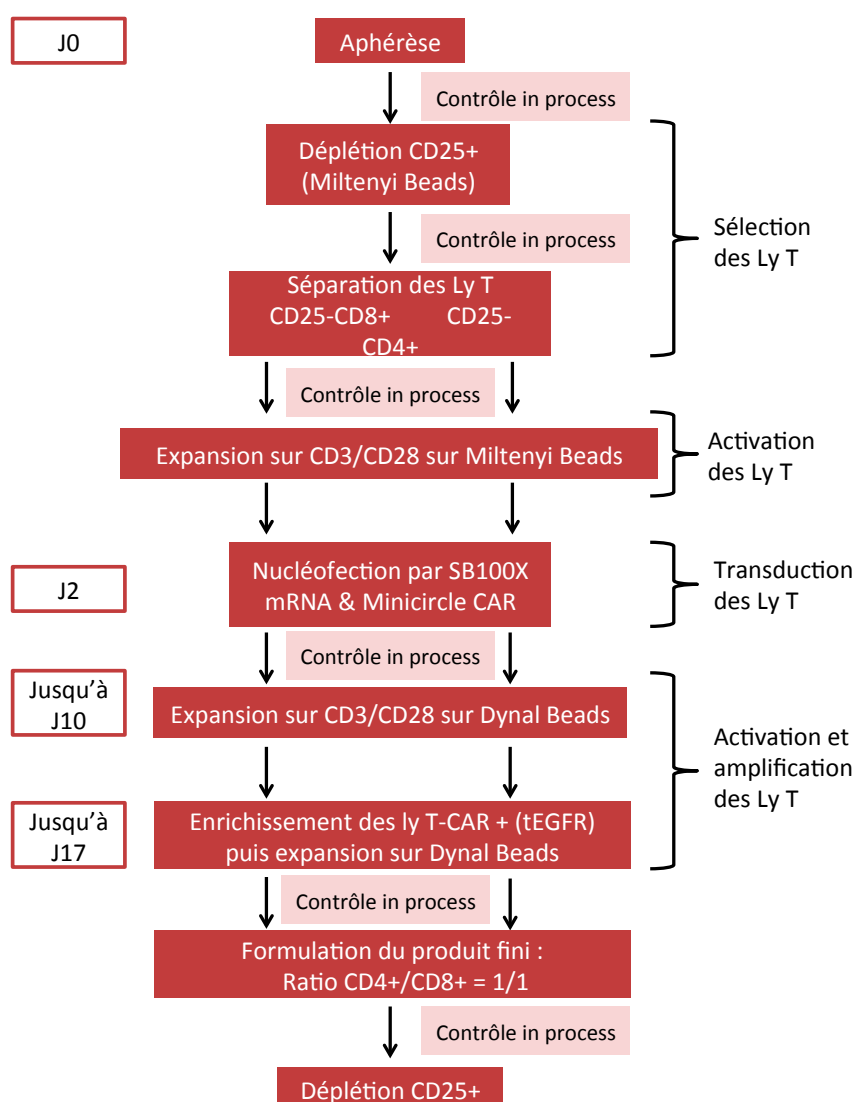


Figure 5 : Schéma de production du lymphocyte T-CAR SLAMF7

Après transfert génique, par nucléofection (technique d'électroporation), le CAR est généré par une méthode non virale à l'aide du transposon « Sleeping Beauty » (SB) et un vecteur ADN minimaliste appelé minicircles. L'électroporation permet de créer une perméabilité membranaire en appliquant un champ électrique sur les membranes cellulaires.

Un transposon est un système de vecteur composé du gène d'intérêt entouré de séquences de nucléotides inversement répétées et du gène de la transposase qui se lie aux répétitions terminales inversées, et mobilise le transposon pour l'intégration dans le génome cible à travers un mécanisme de copier/coller (figure 6). Les minicircles sont des vecteurs d'ADN super-enroulés qui sont une alternative aux plasmides. Ils sont plus stables et ont une expression génique transitoire de plus haut niveau par rapport aux plasmides conventionnels (27).

L'utilisation du transposon Sleeping Beauty permet d'augmenter le rendement de production et de minimiser les risques de mutagenèse et génotoxicité (source projet H2020 CARAMBA). L'électroporation permet une production rapide et économique des CAR-T cells par rapport aux techniques conventionnelles (27). Le transposon SB est un système qui permet un profil d'intégration « proche du hasard » dans le génome. Il est par ailleurs facile à reproduire puisqu'il utilise un plasmide recombinant à ADN. Le transposon SB est issu d'un ancien transposon inactif de génome de poisson modifié pour inclure une transposase hyperactive SB100X qui permet le transfert stable de gène dans différents types cellulaires dont les lymphocytes T (27). Cette stratégie de transfert de gène a les avantages des vecteurs viraux intégratifs (expression à long terme du transgène) et ceux des vecteurs non viraux (moins immunogène, meilleur profil de sécurité, diminution des coûts de production) (27, 28).

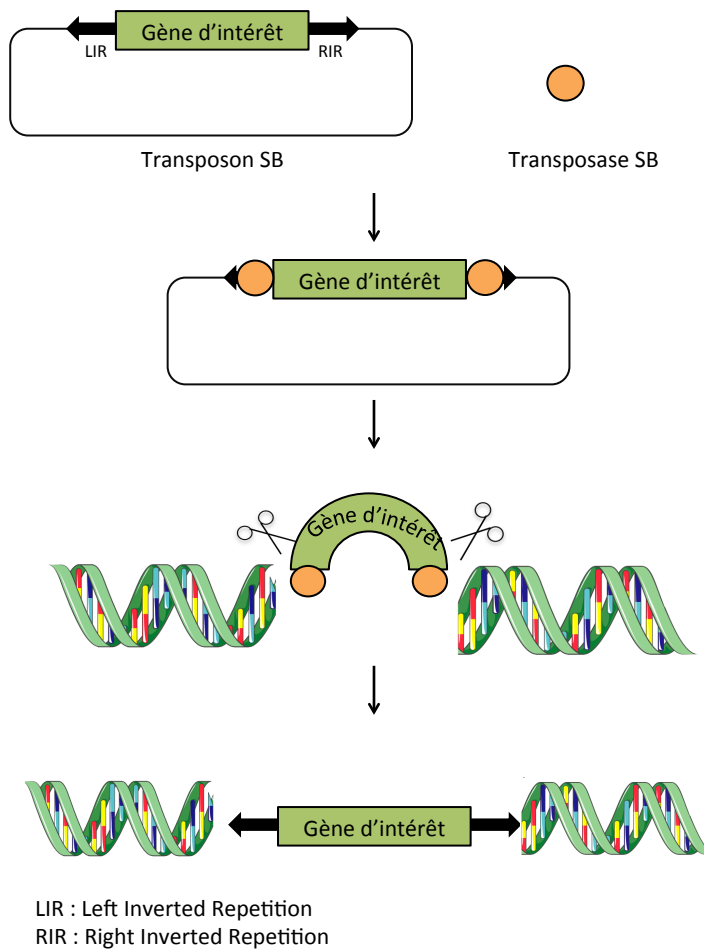


Figure 6 : Système d'intégration du transposon Sleeping Beauty.

3) Etudes pré-cliniques du CAR-T cells anti-SLAMF7

Le tableau ci- dessous (tableau 5) regroupe les différentes études précliniques de thérapie génique réalisées avec le système SB. La société de biotechnologie Ziopharm Oncology qui travaille au développement clinique de CAR-T cells produit à l'aide du système SB prévoit le début d'un essai clinique en 2018 après avoir démontré la sécurité, la tolérance, l'efficacité et la survie à long terme de leurs produits de 1^{re} et 2^e génération (communiqué lors de l'Americian Society of Hematology Annual Meeting en décembre 2017).

Référence	Méthode de transfert	Pathologie	Cellules cibles
Zhu et al. (29)	Transfection	Drépanocytose	<i>In vitro</i> , lignées cellulaires humaines
Latella et al. (30)	Transfection	Epidermolyse bulleuse dystrophique	<i>Ex vivo</i> , kératinocytes humains puis xélogreffe chez la souris
Chen et al. (31)	Transfection	Maladie de Huntington	<i>In vitro</i> , lignées cellulaires humaines
Eyjolfsdottir et al. (32)	Transfection puis encapsulation	Maladie d'Alzheimer	<i>In vitro</i> , lignées cellulaires humaines puis greffe dans le cerveau de patient
Huang et al. (33), Singh et al. (34), Jin et al. (35), Magnani et al. (36)	Electroporation, transfert de CAR	Cancer	<i>Ex vivo</i> , CMN du sang périphérique ou lymphocytes T humains
Ohlfest et al. (37)	Injection intratumoral	Cancer	<i>In vivo</i> , glioblastome humain greffé chez la souris

Tableau 5 : Etudes précliniques utilisant la technique de transfert de gène Sleeping Beauty. (CMN : Cellules Mono Nuclées). Adapté de M. Hudecek et al. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2017)

4) Etude clinique du CAR-T cells anti-SLAMF7 : étude CARAMBA

La phase I aura lieu dans 2 centres sur 4 cohortes de 3 patients pour permettre une escalade de dose de CAR-Tcells : 2×10^4 /kg, 2×10^5 /kg, 2×10^6 /kg et 1×10^7 /kg bien que la dose effective soit anticipée par les études précliniques (2×10^6 /kg).

La phase II est subdivisée en IIa et IIb. La phase IIa est l'ouverture de l'essai à 2 autres centres. Au cours de cette première phase, la production (figure 5) des CAR-T cells se fera dans le centre de Würzburg (Allemagne). Durant la phase IIb la production des CAR-T cells sera étendue aux 3 autres centres : Lille, Milan (Italie) et Navarra (Espagne). La phase I durera 1 an et inclura 21 patients et la phase II inclura 25 patients et durera 1 à 2 ans.

Le CHU de Lille a été sollicité pour participer à cet essai clinique.

D'un point de vue réglementaire nous sommes dans le cas d'un MTI expérimental répondant à la définition d'OGM comme exposé dans la partie I de ce travail (tableau 2). Nous devons nous soumettre aux « Guidelines on GMP specific to ATMP » pour la production de ce MTI et au décret 2016-1536 pour l'autorisation du centre.

Les CAR-T cells du projet CARAMBA n'ont pas encore obtenu, à ce jour, leur classement par le HCB. Bien que nous pensions que ces CAR-T cells soient classés C1 compte tenu de la nature non virale du transposon, nous nous mettrons, dans la partie 2 de ce travail, dans le cas d'une classe de confinement C2 afin de ne pas nous limiter à la classe de confinement minimal pour de futurs essais. .

Nous allons détailler dans la partie 2 les exigences nécessaires à la fabrication de ce MTI et évaluer les différentes solutions possibles permettant la prise en charge de cet essai au CHU de Lille durant la phase IIb.

2^{EME} PARTIE : ÉTUDE DE FAISABILITE DE LA PRODUCTION DE MTI AU CHU DE LILLE

Dans le passé, le CHU de Lille a été sollicité pour participer à des essais cliniques incluant la production de MTI, mais ces propositions ont du être refusées à cause de la non conformité des locaux pour une production de MTI de grade clinique. Le protocole CARAMBA est le premier essai clinique de MTI nécessitant une production de CAR-T cells sur site. Ce protocole a été l'élément déclencheur d'une réflexion pluridisciplinaire quant à l'organisation du circuit des différents MTI au CHU de Lille.

Le CHU de Lille est également un centre impliqué dans de nombreux essais cliniques multicentriques de greffe d'îlots de Langerhans dans le traitement du diabète de type I depuis plus de 10 ans. Ces îlots de Langerhans sont produits par la Plateforme de Biothérapie du CHU de Lille. Ils sont aujourd'hui classés comme produits de thérapie cellulaire mais leur évolution en MTI est à envisager dans un avenir proche en particulier si des modifications sont apportées sur leur procédé de préparation. La plateforme de biothérapie a également accueilli d'autres protocoles de thérapie cellulaire dont un essai clinique multicentrique de greffe intra-striatale de précurseurs neuraux et de neuroblastes striataux dans le traitement de la maladie de Huntington (NCT00190450) et un essai clinique utilisant des cellules dendritiques dans le traitement du mélanome.

Bien que ce travail soit centré sur la faisabilité de la production du CAR-T cells à l'essai dans le protocole CARAMBA au CHU de Lille, les futurs protocoles nécessitant une production de MTI ne peuvent être exclus de cette réflexion.

Pour adapter la production de grade clinique des CAR-T cells du protocole CARAMBA au CHU de Lille, de nombreux points sont à mettre en place et les locaux en sont la première étape.

Cette deuxième partie se place dans la continuité d'un audit demandé à l'agence CDML consulting, nous étudierons donc les solutions possibles au CHU de Lille pour une fabrication de MTI conforme à la réglementation : les structures disponibles, leur possible mise en conformité ou la nécessité d'une construction de nouveaux locaux.

A) MATERIEL ET METHODES

Afin de réfléchir aux solutions possibles en terme de localisation et d'aménagements de la structure qui accueillera cette nouvelle activité au CHU de Lille, nous avons tout d'abord effectué le bilan des besoins actuels et futurs en ce qui concerne les locaux pour la prise en charge de MTI. Nous avons ensuite réalisé un état des lieux des structures existantes sur site (Zones à Atmosphère Contrôlée) et dressé une liste des exigences européennes en matière de locaux de production de MTI et les exigences concernant les OGM. L'objectif est d'évaluer les structures existantes au CHU de Lille et les confronter aux exigences requises pour une production de grade GMP spécifiques aux MTI. Nous définirons ainsi si l'une de ces structures est en capacité de prendre en charge la production du CAR-T cells de l'étude CARAMBA et répondre à nos besoins ou si la conception de nouveaux locaux doit être envisagée.

I. BESOINS ACTUELS ET FUTURS

Bien que notre objectif soit de permettre la production du CAR-T cells du protocole CARAMBA nous ne pouvons exclure de ce travail l'existence des autres protocoles de MTI à la PUI et de produits de thérapie cellulaire à la PBT. Un bilan des différentes salles de production que nous souhaitons posséder pour pouvoir prendre en charge les MTI au CHU de Lille sera dressé avec pour chacune des salles :

- leurs besoins en matière de classe particulière de salle propre,
- leurs besoins en termes de pression de la zone de production,
- les équipements nécessaires,
- les effectifs requis pour chacune des activités,
- la superficie nécessaire et
- la capacité à pouvoir programmer l'activité.

II. ETAT DES LIEUX DES STRUCTURES ET CONFORMITES PAR RAPPORT A LA REGLEMENTATION

a) Etat des lieux des structures

Deux structures existantes comportant des zones à atmosphère contrôlée (ZAC) sont envisagées :

- la pharmacie à usage intérieure (PUI) comportant comme ZAC :
 - o l'Unité de Préparation Centralisée des Cytotoxiques
 - o l'Unité Centralisée de Préparations Aseptiques
 - o la salle blanche du préparatoire
- la plateforme de biothérapie (PBT)

Durant ce travail nous décrirons, pour ces différentes structures leurs activités et leurs locaux de préparation ou de production actuels (leurs surfaces, leurs niveaux de propreté, leurs pressions, leurs agencements (plans) et leurs taux d'occupation).

b) Conformité des structures existantes à la réglementation en ce qui concerne les locaux de production

L'article 5 du règlement européen 1394/2007 mandate la Commission Européenne pour éditer et adopter des recommandations quant aux bonnes pratiques de fabrication spécifiques aux MTI. La Commission Européenne les a adoptées et publiées en novembre 2017 sous le nom de « Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapy Medicinal Products », celles-ci concernent tous les aspects de la production (personnel, locaux, équipements, assurance qualité, procédés de production, étapes de qualification et validation, contrôle qualité, ...). Pour ce travail nous nous sommes intéressés uniquement au chapitre concernant les locaux de production à partir duquel nous avons réalisé une check-list des exigences nécessaires aux locaux de la zone de production d'un MTI, des exigences concernant le monitoring environnemental afin d'être conformes à la réglementation ainsi que des exigences spécifiques pour les Organismes Génétiquement Modifiés afin d'être conformes aux recommandations du HCB.

i) Exigences des locaux de production et de leur monitoring

Les étapes de production doivent être réalisées en conditions aseptiques afin d'éviter toute contamination microbienne. La production doit se faire dans des salles propres de niveau de propreté approprié :

Type de production	Local de production	Zone de production
Système clos (isolateur)	Classe D	A
Système ouvert (hotte à flux d'air laminaire)	Classe B	A
Automate de production avec kits stériles à usage unique (expl : CliniMACS Prodigy® de Miltenyi Biotec)	Classe C si contrôles et mesures adéquats pour éviter les risques de contamination (en particulier concernant les flux de personnes et de matériels ainsi que des procédures de nettoyage)	A

Le protocole de production CARAMBA tel que décrit par le promoteur est une méthode de production en système ouvert sous hotte à flux d'air laminaire.

Zone de production

PRESSIONS ET AGENCEMENT

- Zones agencées dans un ordre logique (correspondant à la séquence des opérations et aux différentes classes de "propreté" des salles)
- Arrangement de l'environnement de travail et des équipements adéquates pour minimiser les risques de confusion entre les différents produits et leurs composants, les risques de contamination croisée et les risques d'oubli ou d'erreurs pendant la production ou le contrôle (cf Annexe II : mesures préventives des contaminations croisées)
- Disposition permettant la séparation des flux non stériles et stériles (matériels et équipements)
 - Si séparation non possible : le maniement du matériel et équipements doit être séparé dans le temps et des mesures appropriées doivent être mises en place

L'élément essentiel de la prévention des contaminations est la séparation adéquate des zones de production

- Maintien de la qualité de l'air : flux approprié des zones de plus grande propreté vers les zones adjacentes moins propres
- Cascades de pression entre les pièces de différentes propreté doivent être définies
- Cascades de pression entre les pièces de différentes propreté doivent être surveillées par des méthodes appropriées
- Des pièces adjacentes de différentes classes doivent avoir un différentiel de pression de 10-15Pa (valeurs indicatives)
- Les pièces dont la pureté de l'air est plus élevée présentent une différence de pression positive importante par rapport aux pièces adjacentes dont la pureté de l'air est plus faible
 - Si pour des raisons de confinement (utilisation de vecteurs répliatifs, bactéries pathogènes) : travail dans zone à pression négative et entourée de zone propre à pression positive et de classe appropriée

SAS ET VESTIAIRES

- L'accès aux zones propres doit se faire par un sas muni de portes verrouillées
- Les deux portes ne peuvent pas s'ouvrir simultanément
- Les vestiaires doivent être conçus comme des sas
- Les vestiaires doivent être utilisés pour séparer physiquement les différentes étapes de l'habillage et réduire au maximum la contamination microbienne et particulaire des vêtements de protection
- L'utilisation de vestiaires séparés pour entrer et sortir de zone est parfois souhaitable

ENVIRONNEMENT ASEPTIQUE - SALLE PROPRE

Objectifs : Les locaux doivent permettre d'assurer un environnement aseptique (mesures adéquates par rapport aux procédés de fabrication). Une attention particulière doit être accordée quand il n'y a pas de stérilisation terminale du produit fini

- Niveau approprié de classification de l'air devrait être déterminé en tenant compte des risques spécifiques dus à la nature du produit, du procédé de fabrication et en particulier si la transformation a lieu dans un système ouvert

Monitoring environnemental permet d'évaluer l'efficacité des contrôles de contaminations et d'identifier les menaces spécifiques

- Système de surveillance des particules en suspension dans l'air pour évaluer les risques potentiels de contamination et assurer un environnement aseptique (y compris dans les isolateurs et les PSM)

Classe	Mesure des particules non viables			
	Limites maximales recommandées pour des particules $\geq 0,5\mu\text{m}/\text{m}^3$		Limites maximales recommandées pour des particules $\geq 5\mu\text{m}/\text{m}^3$	
	En activité	Au repos	En activité	Au repos
A	3 520	3 520	20	20
B	352 000	3 520	2 900	29
C	3 520 000	3 520 000	29 000	2 900
D	limite fixée en fonction du risque	3 520 000	limite fixée en fonction du risque	29 000

Pour les zones de classes A : surveillance des particules pendant toute la production sauf si dûment justifié (expl : contaminants dans le processus endommageant le compteur de particules)
 Pour les zones de classe B : surveillance des particules en continu en cours de production.
 Pour les zones de classe C et D : stratégie de contrôle à établir en fonction des risques et de la nature des opérations à effectuer

- Surveillance des micro-organismes (y compris pour les isolateurs et PSM)

Classe	Mesures de la charge microbienne en activité		
	Echantillon d'air CFU/m ³	Plaque de sédimentation (90mm de diamètre) CFU/4h	Gélose de contact (55mm de diamètre) CFU / gélose
A	<1	<1	<1
B	10	5	5
C	100	50	25
D	200	100	50

Surveillance continue pendant les opérations critiques où le produit est exposé à l'environnement

PARTICULES NON VIBLES

PARTICULES VIBLES

ii) Exigences concernant les OGM

Les OGM nécessitent un confinement particulier lors de la manipulation, celui-ci dépend directement de leur classement par le HCB.

	Correspondance Groupe de danger et Agent pathogène			
	Non pathogènes	Pathogènes		
Selon le Code de l'environnement	Groupe I	Groupe II	Groupe III	Groupe IV
Classes de confinement des OGM	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4

Le HCB décrit les confinements pour l'utilisation d'OGM en laboratoire de recherche dans l'annexe III.1 du manuel du HCB. Ci-dessous ne seront détaillées que les exigences des confinements C1 et C2 concernant les équipements de confinement et l'agencement spécial des locaux (pour rappel, comme mentionné dans la première partie de ce travail, nous considérerons que les CAR-T cells du CARAMBA sont classés GII).

Les Guidelines spécifiques aux MTI ajoutent également quelques mesures concernant l'utilisation d'OGM : en particulier des mesures pour prévenir les risques de contamination croisée et des restrictions concernant le déplacement du personnel au sein de la structure.

Par ailleurs, en Avril 2015, la Société Française de Pharmacie Oncologique (SFPO) a édité des recommandations sur le circuit hospitalier des MTI dont certaines concernent directement les locaux de préparation des MTI. Bien qu'elles soient relatives à la préparation des MTI on peut légitimement penser qu'elles sont également applicables aux activités de production.

Exigences du HCB	
Confinement C1	
Equipements de confinement	
	Non requis
Agencement spécial du laboratoire	
	Non requis
Confinement C2	
Equipements de confinement	
<input type="checkbox"/>	Travail sous PSM / isolateur
<input type="checkbox"/>	PSM et isolateur doivent être certifiés par le LNE et testés selon les normes en vigueur
Agencement spécial des locaux	
<input type="checkbox"/>	Ventilation des salles dédiées aux activités techniques est assurée par un dispositif de ventilation mécanique
<input type="checkbox"/>	Un autoclave pour la stérilisation des déchets et des matériels contaminés doit être disponible à proximité du lieu où sont manipulés des OGM
<input type="checkbox"/>	Les conduites de vide doivent être protégées par des filtres afin de ne pas risquer de contaminer le système générateur de vide en cas de rupture de vide ou de reflux
Exigences Guidelines spécifiques aux MTI	
<input type="checkbox"/>	Pas de passage du personnel d'une zone de production OGM à une zone de production non OGM, ni d'une zone OGM à l'autre
<input type="checkbox"/>	Flux unidirectionnels à considérer
Recommandations de la SFPO	
<input type="checkbox"/>	ZAC avec gradient de pression adapté au risque des produits manipulés
<input type="checkbox"/>	Si OGM classé au moins G2 : pièce de préparation en dépression par rapport à un sas en pression positive est à privilégier
<input type="checkbox"/>	Préparation des MTI sous PSM de type IIB ou III avec dispositif d'évacuation relié à l'extérieur

c) Faisabilité d'une production de MTI selon le protocole CARAMBA dans les structures existantes

Nous dresserons le bilan des non conformités relevées par rapport à la check-list ci-dessus des différentes ZAC existantes.

B) RESULTATS

I. BESOINS ACTUELS ET FUTURS

Pour permettre de couvrir les besoins actuels et anticiper les besoins futurs sans se restreindre à un seul procédé de fabrication, nous pouvons résumer les besoins du CHU de Lille comme ceci :

- une salle de production de MTI expérimentaux de thérapie cellulaire et génique (CAR-T cells) type CARAMBA de confinement C2
- une salle de production de MTI expérimentaux de thérapie cellulaire somatique
- une salle de production consacrée à la production d'îlots de Langerhans humains que nous considérerons classés comme MTI de thérapie cellulaire somatique, qui par sa dépendance au prélèvement multi-organe nécessite une disponibilité permanente et donc une salle dédiée.

Nous avons exclu de cette réflexion les protocoles de production de MTI de thérapie génique pure car le CHU de Lille n'a, pour l'instant, aucune sollicitation pour la production de cette catégorie de MTI. Ce type de protocole nécessiterait des compétences en termes de manipulation virale et des équipements supplémentaires que ni la PUI ni la PBT ne possèdent actuellement.

Les différentes contraintes inhérentes à chaque type de production que nous nous sommes fixées sont détaillées dans le tableau ci-dessous (Tableau 6).

Activités	Classification par le CAT	Classe minimum de la zone de production	Pressions	Equipements nécessaires	Nombre de personnes nécessaires	Estimation du nombre de m2 nécessaires
Production CAR-T cells (CARAMBA)	MTI de thérapie cellulaire et génique	A dans B	-15Pa	1 hotte à flux d'air laminaire (HFAL) + 1 centrifugeuse +1 nucléofactor Lonza + Microscope + Incubateur	2	15m ²
Production des Ilots de Langerhans	Considérés comme MTI de thérapie cellulaire somatique	A dans B	+45Pa	2 hottes à flux d'air laminaire + 2 centrifugeuses + Microscope + Incubateur	3	35m ²
		A dans D		Isolateur de culture		
Production de MTI de thérapie cellulaire	MTI de thérapie cellulaire somatique	A dans B	+45Pa	1 hotte à flux d'air laminaire + 1 centrifugeuse + Microscope + Incubateur	2	15m ³
		A dans D		Isolateur de culture		

Tableau 6 : Besoins actuels et futurs du CHU de Lille (PMO : Prélèvement Multi Organes).

Les « Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapy Medicinal Products » autorisent la production de MTI expérimentaux en système ouvert A dans C au lieu de A dans B à certaines conditions (Annexe III). Nous n'avons pas considéré que le protocole CARAMBA puisse remplir ces conditions et avons maintenu la contrainte de la classe A dans B.

II. ETAT DES LIEUX DES STRUCTURES EXISTANTES ET CONFORMITES PAR RAPPORT A LA REGLEMENTATION ACTUELLE

Les structures envisagées sont les zones à atmosphère contrôlée de la PUI et celle de la plateforme de biothérapie (PBT), la figure 7 ci-dessous montre l'implantation des deux sites au sein du CHU de Lille.

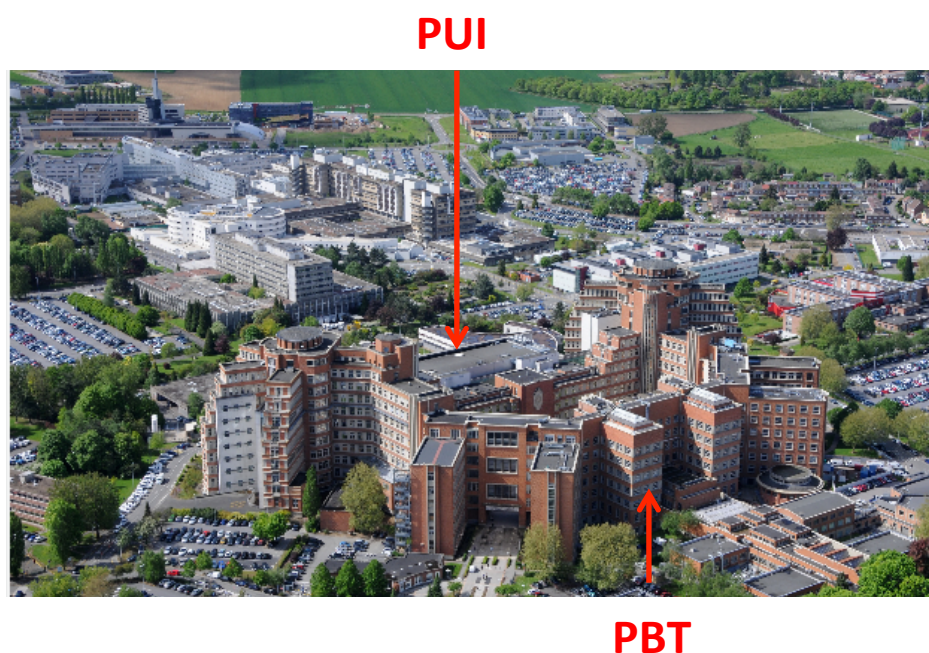


Figure 7 : Implantation de la pharmacie à usage intérieur et de la plateforme de biothérapie au CHU de Lille.

La Pharmacie à Usage Intérieur

Etant donné que la production du CAR-T cells du protocole CARAMBA nécessite une manipulation en Zone à Atmosphère Contrôlée, nous ne décrivons donc ici que les ZAC présentes à la PUI et servant à accueillir aujourd'hui les préparations stériles magistrales et hospitalières :

- l'UPCC (Unité de Préparation Centralisée des Cytotoxiques),
- l'UCPA (Unité Centralisée des Préparations Aseptiques) et
- la salle blanche du préparatoire.

La figure 8 ci- dessous montre le plan de la PUI avec l'implantation de l'UPCC et de l'UCPA.

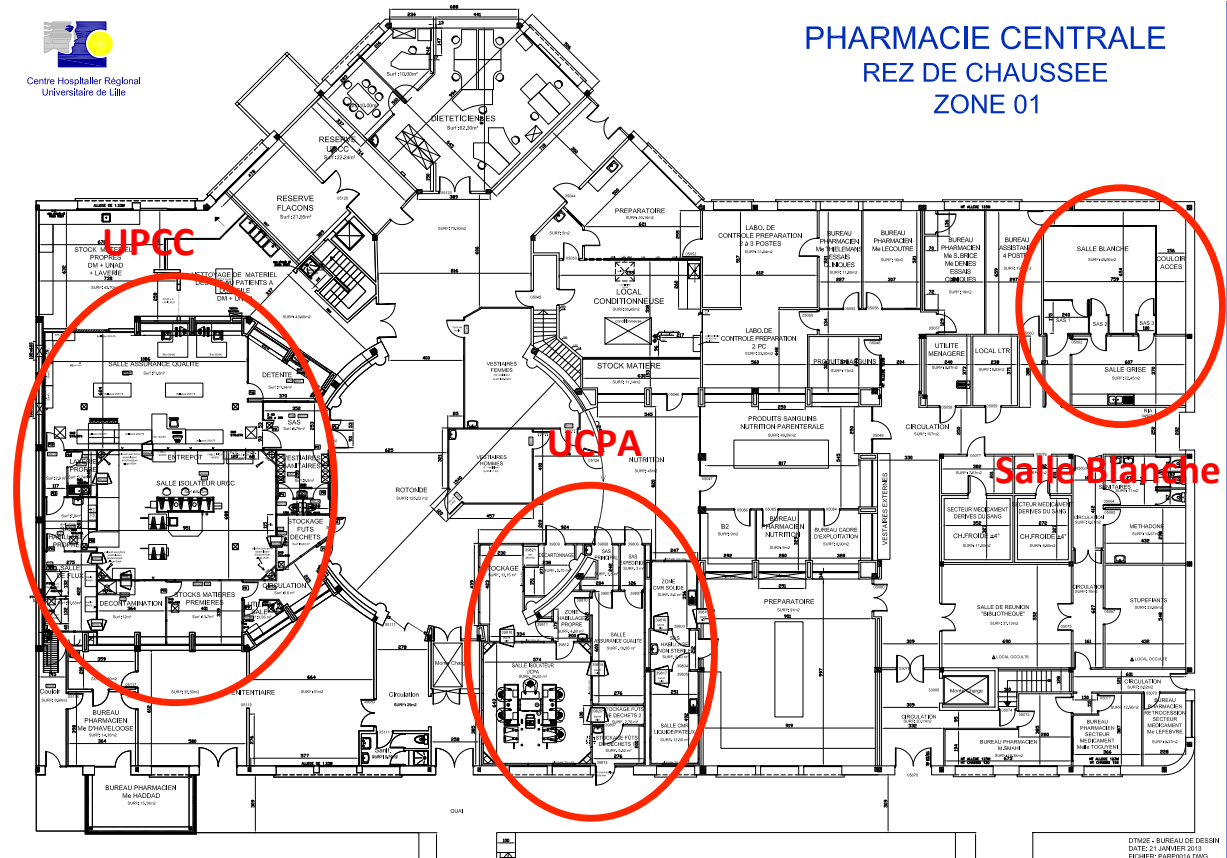


Figure 8 : Plan global de la PUI (source : document interne à la pharmacie)

1) L'Unité de Préparation Centralisée des Cytotoxiques (UPCC)

a) Etat des lieux

Description de l'activité :

La préparation des cytotoxiques au CHU de Lille n'a cessé de croître durant la dernière décennie pour atteindre en 2017 le nombre de 43 824 préparations (dont 3067 préparations pour 80 protocoles de recherche, soit 7% de l'activité) avec une répartition de 75% pour les cytotoxiques et de 18% pour les préparations de thérapie ciblée (anticorps monoclonaux). Cette activité croissante a nécessité une mise en conformité de l'ancienne structure (Unité de Reconstitution Centralisée des Cytotoxiques) en 2016. Afin de pouvoir continuer l'activité de préparation des anticancéreux au CHU de Lille pendant les travaux, une unité provisoire a été créée : l'Unité Centralisée de Préparations Aseptiques.

A ce jour, l'activité de préparation des anticancéreux est réalisée à l'UPCC, cette activité a lieu du lundi au vendredi de 7h à 17h. Le personnel est constitué de 3

pharmaciens, 9 préparateurs, 2 internes en pharmacie, 2 externes en pharmacie et un agent de pharmacie. `

Description des locaux :

L'UPCC est l'Unité de Production Centralisée des Cytotoxiques (Figure 9). La surface de la ZAC est d'environ 220m² dont une salle de production classée C (salle isolateur sur la figure 9) de 70 m² contenant 4 isolateurs en dépression : 2 isolateurs bipostes pour la préparation des cytotoxiques et 2 isolateurs monopostes : un pour la préparation des anticorps monoclonaux, l'autre pour la préparation des médicaments expérimentaux d'anticancéreux, soit un total de 6 postes de préparation. Une salle de décartonnage permet l'entrée des matières premières une fois décartonnées et sont transférées en salle de stockage par un sas de décontamination au peroxyde d'hydrogène. La salle de stockage permet de stocker les flacons de principe actifs et les dispositifs médicaux nécessaires à la préparation. Une salle Assurance Qualité permet le contrôle des préparations avant envoi par le sas expédition. La structure répond aux Bonnes Pratiques de Préparation.

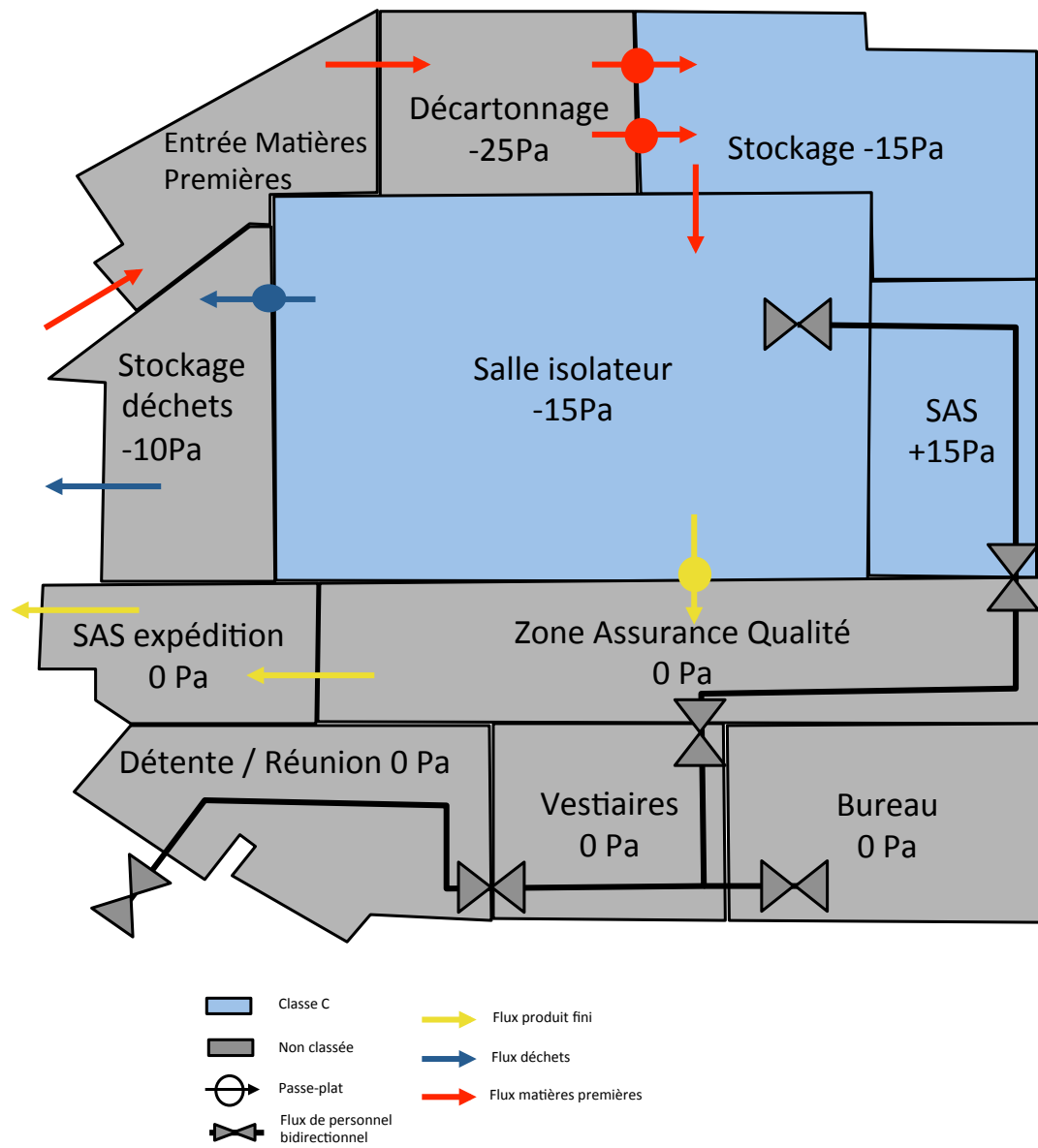


Figure 9 : Caractéristiques aérauliques et flux de l'UPCC (source : document interne à la pharmacie)

b) Conformité à la réglementation actuelle

i) Conformité des locaux de production et de leur monitoring

Zone de production

PRESSIONS ET AGENCEMENT

- Zones agencées dans un ordre logique (correspondant à la séquence des opérations et aux différentes classes de "propreté" des salles)
- Arrangement de l'environnement de travail et des équipements adéquates pour minimiser les risques de confusion entre les différents produits et leurs composants, les risques de contamination croisée et les risques d'oubli ou d'erreurs pendant la production ou le contrôle (cf Annexe II : mesures préventives des contaminations croisées)
- Disposition permettant la séparation des flux non stériles et stériles (matériels et équipements)
 - Si séparation non possible : le maniement du matériel et équipements doit être séparé dans le temps et des mesures appropriées doivent être mises en place

L'élément essentiel de la prévention des contaminations est la séparation adéquate des zones de production

- Maintien de la qualité de l'air : flux approprié des zones de plus grande propreté vers les zones adjacentes moins propres
- Cascades de pression entre les pièces de différentes propreté doivent être définies
- Cascades de pression entre les pièces de différentes propreté doivent être surveillées par des méthodes appropriées
- Des pièces adjacentes de différentes classes doivent avoir un différentiel de pression de 10-15Pa (valeurs indicatives)
- Les pièces dont la pureté de l'air est plus élevée présentent une différence de pression positive importante par rapport aux pièces adjacentes dont la pureté de l'air est plus faible
 - Si pour des raisons de confinement (utilisation de vecteurs réplicatifs, bactéries pathogènes) : travail dans zone à pression négative et entourée de zone propre à pression positive et de classe appropriée

SAS ET VESTIAIRES

- L'accès aux zones propres doit se faire par un sas muni de portes verrouillées
- Les deux portes ne peuvent pas s'ouvrir simultanément
- Les vestiaires doivent être conçus comme des sas
- Les vestiaires doivent être utilisés pour séparer physiquement les différentes étapes de l'habillage et réduire au maximum la contamination microbienne et particulaire des vêtements de protection
- L'utilisation de vestiaires séparés pour entrer et sortir de zone est parfois souhaitable

ENVIRONNEMENT ASEPTIQUE - SALLE PROPRE

Objectifs : Les locaux doivent permettre d'assurer un environnement aseptique (mesures adéquates par rapport aux procédés de fabrication). Une attention particulière doit être accordée quand il n'y a pas de stérilisation terminale du produit fini

- Niveau approprié de classification de l'air devrait être déterminé en tenant compte des risques spécifiques dus à la nature du produit, du procédé de fabrication et en particulier si la transformation a lieu dans un système ouvert

Monitoring environnemental permet d'évaluer l'efficacité des contrôles de contaminations et d'identifier les menaces spécifiques

- Système de surveillance des particules en suspension dans l'air pour évaluer les risques potentiels de contamination et assurer un environnement aseptique (y compris dans les isolateurs et les PSM)

PARTICULES NON VIABLES

Mesure des particules non viables en ambiance				
Classe	Limites maximales recommandées pour des particules $\geq 0,5\mu\text{m}^3$		Limites maximales recommandées pour des particules $\geq 5\mu\text{m}^3$	
	En activité	Au repos	En activité	Au repos
C	3 520 000	3 520 000	29 000	2 900

Pour les zones de classe C et D : stratégie de contrôle à établir en fonction des risques et de la nature des opérations à effectuer

Contrôle 1 fois par an en activité

Mesure des particules non viables dans l'isolateur				
Classe	Limites maximales recommandées pour des particules $\geq 0,5\mu\text{m}^3$		Limites maximales recommandées pour des particules $\geq 5\mu\text{m}^3$	
	En activité	Au repos	En activité	Au repos
A	3 520	3 520	20	20

Pour les zones de classes A : surveillance des particules pendant toute la production sauf si dûment justifié (expl : contaminants dans le processus endommageant le compteur de particules)

Non fait en activité

- Surveillance des micro-organismes (y compris pour les isolateurs et PSM)

Mesures de la charge microbienne en activité en ambiance			
Classe	Echantillon d'air CFU/m ³	Plaque de sédimentation (90mm de diamètre) CFU/4h	Gélose de contact (55mm de diamètre) CFU /gélose
C	100	NON FAIT	25

Gélose contact : 1 fois par mois en activité, 1 fois par mois au repos soit tous les 15 jours

Echantillon d'air : 1 fois par an en activité et 4 fois par an au repos

Surveillance continue pendant les opérations critiques où le produit est exposé à l'environnement

Mesures de la charge microbienne en activité dans l'isolateur			
Classe	Echantillon d'air CFU/m ³	Plaque de sédimentation (90mm de diamètre) CFU/4h	Gélose de contact (55mm de diamètre) CFU /gélose
A	<1	<1	<1

Pas de gélose contact mais des écouvillons dans les isolateurs : 1 fois par semaine en activité

Echantillon d'air : 1 fois par an au repos

Surveillance continue pendant les opérations critiques où le produit est exposé à l'environnement

ii) Conformités spécifiques aux OGM

Exigences du HCB	
Confinement C1	
Equipements de confinement	
<input type="checkbox"/>	Non requis
Agencement spécial du laboratoire	
<input type="checkbox"/>	Non requis
Confinement C2	
Equipements de confinement	
<input checked="" type="checkbox"/>	Travail sous PSM / isolateur
<input checked="" type="checkbox"/>	PSM et isolateur doivent être certifiés par le LNE et testés selon les normes en vigueur
Agencement spécial des locaux	
<input checked="" type="checkbox"/>	Ventilation des salles dédiées aux activités techniques est assurée par un dispositif de ventilation mécanique
<input checked="" type="checkbox"/>	Un autoclave pour la stérilisation des déchets et des matériels contaminés doit être disponible à proximité du lieu où sont manipulés des OGM
<input checked="" type="checkbox"/>	Les conduites de vide doivent être protégées par des filtres afin de ne pas risquer de contaminer le système générateur de vide en cas de rupture de vide ou de reflux
Exigences Guidelines spécifiques aux MTI	
<input type="checkbox"/>	Pas de passage du personnel d'une zone de production OGM à une zone de production non OGM, ni d'une zone OGM à l'autre
<input type="checkbox"/>	Flux unidirectionnels à considérer
Recommandations de la SFPO	
<input checked="" type="checkbox"/>	ZAC avec gradient de pression adapté au risque des produits manipulés
<input checked="" type="checkbox"/>	Si OGM classé au moins G2 : pièce de préparation en dépression par rapport à un sas en pression positive est à privilégier
<input type="checkbox"/>	Préparation des MTI sous PSM de type IIB ou III avec dispositif d'évacuation relié à l'extérieur

c) Faisabilité d'une production de MTI selon le protocole CARAMBA à l'UPCC

En résumé pour l'UPCC bien que la structure réponde en certains points aux exigences, ses principaux manquements sont pour la production du protocole CARAMBA :

- l'absence de zone de classe B pour une production en système ouvert A dans B.
- l'absence de contrôle environnemental des particules non viables en continu pendant toute la production sous isolateur et en ambiance

Ces deux items sont obligatoires pour la production de grade GMP

- l'absence de vestiaires séparés pour entrer et sortir de la zone classée
 - l'absence de flux de personnel unidirectionnel
- l'absence de PSM dans la zone, obligatoire pour le protocole CARAMBA

Nous considérons ces items comme des non conformités bien qu'ils ne soient pas des obligations réglementaires mais des recommandations.

2) L'Unité Centralisée de Préparations Aseptiques

a) Etat des lieux

Description de l'activité :

L'UCPA était une salle de préparation des cytotoxiques pendant les travaux de l'ancienne salle. Elle constitue aujourd'hui une ZAC de secours pour les préparations stériles toxiques et non toxiques en cas de problème rendant inutilisable l'UPCC ou la salle blanche du préparatoire. Elle est actuellement utilisée en routine pour les préparations stériles non dangereuses. Il est prévu qu'elle soit utilisée pour la préparation des poches de nutrition parentérale dans un futur proche.

Description des locaux :

L'UCPA est l'Unité Centralisée de Préparations Aseptiques (figure 10). La ZAC possède une surface d'environ 150m². Elle possède une salle blanche de préparation (salle isolateur) classée C composée de 2 isolateurs bipostes en dépression soit 4 postes de travail. Deux sas d'habillage permettent l'entrée dans la salle de préparation (un 1^{er} sas non classé puis un 2^{ème} sas classé C). La structure répond aux Bonnes Pratiques de Préparation.

Une zone de décartonnage permet l'entrée des matières premières une fois décartonnées et sont transférées en salle de stockage par un sas de décontamination au peroxyde d'hydrogène. La salle de stockage permet de stocker les flacons de principe actifs et les dispositifs médicaux nécessaires à la préparation. Une salle Assurance Qualité permet le contrôle des préparations avant envoi par le sas expédition.

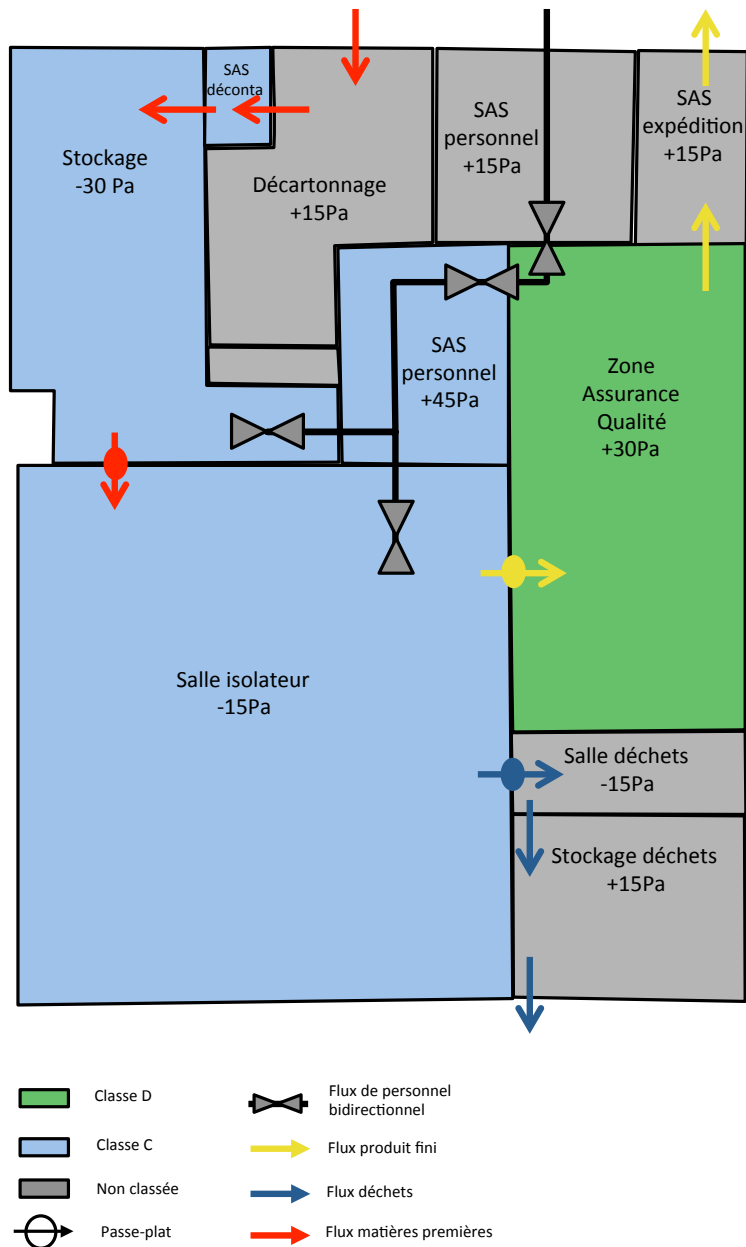


Figure 10 : Caractéristiques aérauliques et flux de l'UCPA (source : document interne à la pharmacie)

b) Conformité à la réglementation

i) Conformité des locaux de production et de leur monitoring

Zone de production

PRESSIONS ET AGENCEMENT

- Zones agencées dans un ordre logique (correspondant à la séquence des opérations et aux différentes classes de "propreté" des salles)
- Arrangement de l'environnement de travail et des équipements adéquates pour minimiser les risques de confusion entre les différents produits et leurs composants, les risques de contamination croisée et les risques d'oubli ou d'erreurs pendant la production ou le contrôle (cf Annexe II : mesures préventives des contaminations croisées)
- Disposition permettant la séparation des flux non stériles et stériles (matériels et équipements)
 - Si séparation non possible : le maniement du matériel et équipements doit être séparé dans le temps et des mesures appropriées doivent être mises en place

L'élément essentiel de la prévention des contaminations est la séparation adéquate des zones de production

- Maintien de la qualité de l'air : flux approprié des zones de plus grande propreté vers les zones adjacentes moins propres
- Cascades de pression entre les pièces de différentes propreté doivent être définies
- Cascades de pression entre les pièces de différentes propreté doivent être surveillées par des méthodes appropriées
- Des pièces adjacentes de différentes classes doivent avoir un différentiel de pression de 10-15Pa (valeurs indicatives)
- Les pièces dont la pureté de l'air est plus élevée présentent une différence de pression positive importante par rapport aux pièces adjacentes dont la pureté de l'air est plus faible
 - Si pour des raisons de confinement (utilisation de vecteurs réplicatifs, bactéries pathogènes) : travail dans zone à pression négative et entourée de zone propre à pression positive et de classe appropriée

SAS ET VESTIAIRES

- L'accès aux zones propres doit se faire par un sas muni de portes verrouillées
- Les deux portes ne peuvent pas s'ouvrir simultanément
- Les vestiaires doivent être conçus comme des sas
- Les vestiaires doivent être utilisés pour séparer physiquement les différentes étapes de l'habillage et réduire au maximum la contamination microbienne et particulaire des vêtements de protection
- L'utilisation de vestiaires séparés pour entrer et sortir de zone est parfois souhaitable

ENVIRONNEMENT ASEPTIQUE - SALLE PROPRE

Objectifs : Les locaux doivent permettre d'assurer un environnement aseptique (mesures adéquates par rapport aux procédés de fabrication). Une attention particulière doit être accordée quand il n'y a pas de stérilisation terminale du produit fini

- Niveau approprié de classification de l'air devrait être déterminé en tenant compte des risques spécifiques dus à la nature du produit, du procédé de fabrication et en particulier si la transformation a lieu dans un système ouvert

Monitoring environnemental permet d'évaluer l'efficacité des contrôles de contaminations et d'identifier les menaces spécifiques

- Système de surveillance des particules en suspension dans l'air pour évaluer les risques potentiels de contamination et assurer un environnement aseptique (y compris dans les isolateurs et les PSM)

PARTICULES NON VIABLES

Mesure des particules non viables en ambiance				
Classe	Limites maximales recommandées pour des particules $\geq 0,5\mu\text{m}^3$		Limites maximales recommandées pour des particules $\geq 5\mu\text{m}^3$	
	En activité	Au repos	En activité	Au repos
C	3 520 000	3 520 000	29 000	2 900

Pour les zones de classe C et D : stratégie de contrôle à établir en fonction des risques et de la nature des opérations à effectuer

Contrôle 1 fois par an en activité

Mesure des particules non viables dans l'isolateur				
Classe	Limites maximales recommandées pour des particules $\geq 0,5\mu\text{m}^3$		Limites maximales recommandées pour des particules $\geq 5\mu\text{m}^3$	
	En activité	Au repos	En activité	Au repos
A	3 520	3 520	20	20

Pour les zones de classes A : surveillance des particules pendant toute la production sauf si dûment justifié (expl : contaminants dans le processus endommageant le compteur de particules)

Non fait en activité

- Surveillance des micro-organismes (y compris pour les isolateurs et PSM)

Mesures de la charge microbienne en activité en ambiance			
Classe	Echantillon d'air CFU/m ³	Plaque de sédimentation (90mm de diamètre) CFU/4h	Gélose de contact (55mm de diamètre) CFU /gélose
C	100	NON FAIT	25

Gélose contact : 1 fois par mois en activité, 1 fois par mois au repos soit tous les 15 jours

Echantillon d'air : 1 fois par an en activité et 4 fois par an au repos

Surveillance continue pendant les opérations critiques où le produit est exposé à l'environnement

Mesures de la charge microbienne en activité dans l'isolateur			
Classe	Echantillon d'air CFU/m ³	Plaque de sédimentation (90mm de diamètre) CFU/4h	Gélose de contact (55mm de diamètre) CFU /gélose
A	<1	<1	<1

Pas de gélose contact mais des écouvillons dans les isolateurs : 1 fois par semaine en activité

Echantillon d'air : 1 fois par an au repos

Surveillance continue pendant les opérations critiques où le produit est exposé à l'environnement

ii) Conformités spécifiques aux OGM

Exigences du HCB	
Confinement C1	
Equipements de confinement	
<input type="checkbox"/>	Non requis
Agencement spécial du laboratoire	
<input type="checkbox"/>	Non requis
Confinement C2	
Equipements de confinement	
<input checked="" type="checkbox"/>	Travail sous PSM / isolateur
<input checked="" type="checkbox"/>	PSM et isolateur doivent être certifiés par le LNE et testés selon les normes en vigueur
Agencement spécial des locaux	
<input checked="" type="checkbox"/>	Ventilation des salles dédiées aux activités techniques est assurée par un dispositif de ventilation mécanique
<input checked="" type="checkbox"/>	Un autoclave pour la stérilisation des déchets et des matériels contaminés doit être disponible à proximité du lieu où sont manipulés des OGM
<input checked="" type="checkbox"/>	Les conduites de vide doivent être protégées par des filtres afin de ne pas risquer de contaminer le système générateur de vide en cas de rupture de vide ou de reflux
Exigences Guidelines spécifiques aux MTI	
<input type="checkbox"/>	Pas de passage du personnel d'une zone de production OGM à une zone de production non OGM, ni d'une zone OGM à l'autre
<input type="checkbox"/>	Flux unidirectionnels à considérer
Recommandations de la SFPO	
<input checked="" type="checkbox"/>	ZAC avec gradient de pression adapté au risque des produits manipulés
<input checked="" type="checkbox"/>	Si OGM classé au moins G2 : pièce de préparation en dépression par rapport à un sas en pression positive est à privilégier
<input type="checkbox"/>	Préparation des MTI sous PSM de type IIB ou III avec dispositif d'évacuation relié à l'extérieur

c) Faisabilité d'une production de MTI selon le protocole CARAMBA à l'UCPA

En résumé pour l'UCPA bien que la structure réponde en certains points aux exigences, ses principaux manquements sont pour la production du protocole CARAMBA :

- l'absence de zone de classe B pour une production en système ouvert A dans B.
- l'absence de contrôle environnemental des particules non viables en continu pendant toute la production sous isolateur et en ambiance

Ces deux items sont obligatoires pour la production de grade GMP.

- l'absence de vestiaires séparés pour entrer et sortir de la zone classée
- l'absence de flux de personnel unidirectionnel
- l'absence de PSM dans la zone, obligatoire pour le protocole CARAMBA.

Nous considérons ces items comme des non conformités bien qu'ils ne soient pas des obligations réglementaires.

3) *Salle blanche*

a) **Etat des lieux**

Description de l'activité :

La salle blanche est dédiée aux préparations stériles non toxiques (collyres, préparations d'essais cliniques nécessitant des conditions aseptiques de préparation...). La salle blanche du préparatoire a également une activité croissante avec en 2016 : 110 000 préparations (augmentation de 9% en 2016).

L'activité de préparation de la salle blanche est réalisée du lundi au vendredi de 9h à 17h. Le personnel est constitué de 1,6 équivalent temps plein pharmacien, 5,1 équivalent temps plein préparateurs en pharmacie, 1 interne en pharmacie et un externe en pharmacie.

Description des locaux :

La salle blanche du préparatoire est constituée d'une salle de préparation classée B composée d'une hotte à flux d'air laminaire et d'un plafond soufflant ainsi qu'une salle classée D de stockage et préparation avant entrée en salle blanche (Figure 11). Deux sas d'habillage, le premier classé D puis le deuxième classé C, permettent l'accès à la salle blanche. Un sas d'entrée du matériel avec décontamination de surface existe entre la salle de préparation du matériel et la salle blanche ainsi qu'un sas de sortie du matériel, de produits finis et de déchets.

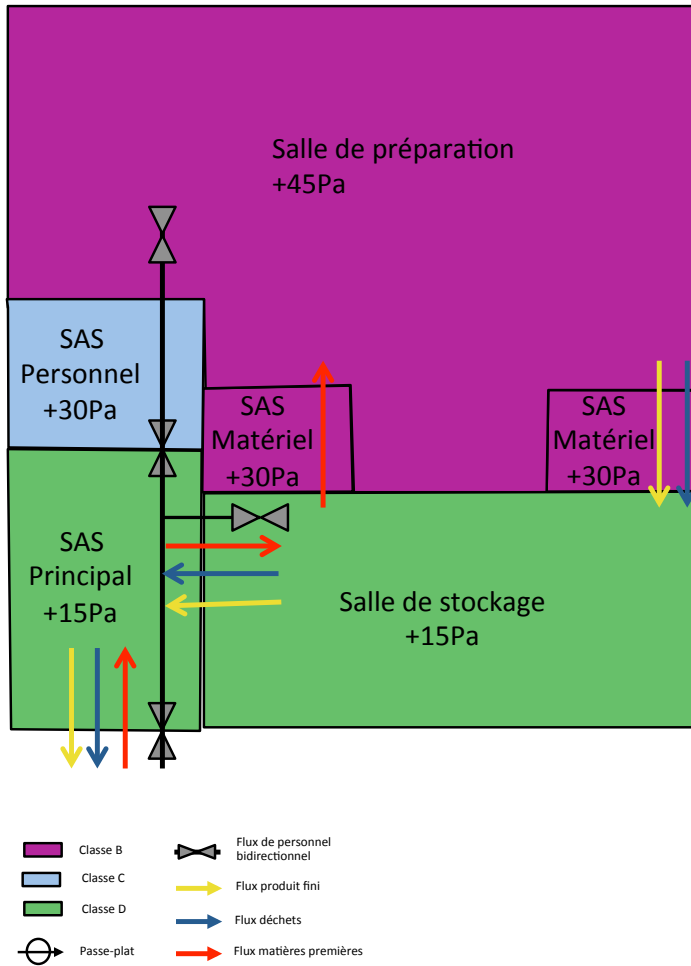


Figure 11 : Caractéristiques aérauliques et flux de la salle blanche du préparatoire (source : document interne à la pharmacie)

b) Conformité à la réglementation

i) Conformités des locaux de production et de leur monitoring

Zone de production

PRESSIONS ET AGENCEMENT

- Zones agencées dans un ordre logique (correspondant à la séquence des opérations et aux différentes classes de "propreté" des salles)
- Arrangement de l'environnement de travail et des équipements adéquates pour minimiser les risques de confusion entre les différents produits et leurs composants, les risques de contamination croisée et les risques d'oublis ou d'erreurs pendant la production ou le contrôle (cf Annexe II : mesures préventives des contaminations croisées)
- Disposition permettant la séparation des flux non stériles et stériles (matériels et équipements)
 - Si séparation non possible : le maniement du matériel et équipements doit être séparé dans le temps et des mesures appropriées doivent être mises en place

L'élément essentiel de la prévention des contaminations est la séparation adéquate des zones de production

- Maintien de la qualité de l'air : flux approprié des zones de plus grande propreté vers les zones adjacentes moins propres
- Cascades de pression entre les pièces de différentes propreté doivent être définies
- Cascades de pression entre les pièces de différentes propreté doivent être surveillées par des méthodes appropriées
- Des pièces adjacentes de différentes classes doivent avoir un différentiel de pression de 10-15Pa (valeurs indicatives)
- Les pièces dont la pureté de l'air est plus élevée présentent une différence de pression positive importante par rapport aux pièces adjacentes dont la pureté de l'air est plus faible
 - Si pour des raisons de confinement (utilisation de vecteurs réplicatifs, bactéries pathogènes) : travail dans zone à pression négative et entourée de zone propre à pression positive et de classe appropriée

SAS ET VESTIAIRES

- L'accès aux zones propres doit se faire par un sas muni de portes verrouillées
- Les deux portes ne peuvent pas s'ouvrir simultanément
- Les vestiaires doivent être conçus comme des sas
- Les vestiaires doivent être utilisés pour séparer physiquement les différentes étapes de l'habillage et réduire au maximum la contamination microbienne et particulaire des vêtements de protection
- L'utilisation de vestiaires séparés pour entrer et sortir de zone est parfois souhaitable

ENVIRONNEMENT ASEPTIQUE - SALLE PROPRE

Objectifs : Les locaux doivent permettre d'assurer un environnement aseptique (mesures adéquates par rapport aux procédés de fabrication). Une attention particulière doit être accordée quand il n'y a pas de stérilisation terminale du produit fini

- Niveau approprié de classification de l'air devrait être déterminé en tenant compte des risques spécifiques dus à la nature du produit, du procédé de fabrication et en particulier si la transformation a lieu dans un système ouvert

Monitoring environnemental permet d'évaluer l'efficacité des contrôles de contaminations et d'identifier les menaces spécifiques

- Système de surveillance des particules en suspension dans l'air pour évaluer les risques potentiels de contamination et assurer un environnement aseptique (y compris dans les isolateurs et les PSM)

PARTICULES NON VIABLES

Mesure des particules non viables en ambiance				
Classe	Limites maximales recommandées pour des particules $\geq 0,5\mu\text{m}/\text{m}^3$		Limites maximales recommandées pour des particules $\geq 5\mu\text{m}/\text{m}^3$	
	En activité	Au repos	En activité	Au repos
B	352 000	3 520	2 900	29

Pour les zones de classe B : surveillance des particules en continu en cours de production

Contrôle 1 fois par an au repos. Non fait en cours de production

Mesure des particules non viables sous PSM				
Classe	Limites maximales recommandées pour des particules $\geq 0,5\mu\text{m}/\text{m}^3$		Limites maximales recommandées pour des particules $\geq 5\mu\text{m}/\text{m}^3$	
	En activité	Au repos	En activité	Au repos
A	3 520	3 520	20	20

Pour les zones de classes A : surveillance des particules pendant toute la production sauf si dûment justifié (expl : contaminants dans le processus endommageant le compteur de particules)

Contrôle 1 fois par an au repos

Surveillance des micro-organismes (y compris pour les isolateurs et PSM)

Mesures de la charge microbienne en ambiance				
Classe	Echantillon d'air CFU/m ³	Plaque de sédimentation (90mm de diamètre) CFU/4h	Gélose de contact (55mm de diamètre) CFU /gélose	
B	10	NON FAIT	5	

Réalisé 1 fois par semaine au repos

Surveillance continue pendant les opérations critiques où le produit est exposé à l'environnement

Mesures de la charge microbienne sous PSM				
Classe	Echantillon d'air CFU/m ³	Plaque de sédimentation (90mm de diamètre) CFU/4h	Gélose de contact (55mm de diamètre) CFU /gélose	
A	<1	<1	<1	

En activité à chaque production + empreinte de gants (Echantillon d'air non fait)

Surveillance continue pendant les opérations critiques où le produit est exposé à l'environnement

ii) Conformités spécifiques aux OGM

Exigences du HCB	
Confinement C1	
Equipements de confinement	
<input type="checkbox"/>	Non requis
Agencement spécial du laboratoire	
<input type="checkbox"/>	Non requis
Confinement C2	
Equipements de confinement	
<input checked="" type="checkbox"/>	Travail sous PSM / isolateur
<input checked="" type="checkbox"/>	PSM et isolateur doivent être certifiés par le LNE et testés selon les normes en vigueur
Agencement spécial des locaux	
<input checked="" type="checkbox"/>	Ventilation des salles dédiées aux activités techniques est assurée par un dispositif de ventilation mécanique
<input checked="" type="checkbox"/>	Un autoclave pour la stérilisation des déchets et des matériels contaminés doit être disponible à proximité du lieu où sont manipulés des OGM
<input checked="" type="checkbox"/>	Les conduites de vide doivent être protégées par des filtres afin de ne pas risquer de contaminer le système générateur de vide en cas de rupture de vide ou de reflux
Exigences Guidelines spécifiques aux MTI	
<input type="checkbox"/>	Pas de passage du personnel d'une zone de production OGM à une zone de production non OGM, ni d'une zone OGM à l'autre
<input type="checkbox"/>	Flux unidirectionnels à considérer
Recommandations de la SFPO	
<input type="checkbox"/>	ZAC avec gradient de pression adapté au risque des produits manipulés
<input type="checkbox"/>	Si OGM classé au moins G2 : pièce de préparation en dépression par rapport à un sas en pression positive est à privilégier
<input type="checkbox"/>	Préparation des MTI sous PSM de type IIB ou III avec dispositif d'évacuation relié à l'extérieur

c) Faisabilité d'une production de MTI selon le protocole CARAMBA dans la salle blanche du préparatoire

La salle blanche du préparatoire possède, contrairement aux autres ZAC présentées ci-dessus, une zone de production classée B mais il existe certains manquements, qui sont :

- l'absence de contrôle environnemental des particules non viables en continu pendant toute la production
- l'absence de séparations des flux stériles et non stériles

Ces items sont obligatoires pour la production au grade GMP.

- l'absence d'une zone de production en dépression.
- l'absence de vestiaires séparés pour entrer et sortir de la zone classée.
- l'absence d'évacuation de l'air du PSM vers l'extérieur

Nous considérons ces trois items comme des non conformités bien qu'ils ne soient pas des obligations réglementaires.

4) La plateforme de biothérapie

a) Etat des lieux

La plateforme de biothérapies fabriquée en 2007 et ouverte en 2008, appartient à l'unité mixte de recherche U1190. Trois ingénieurs hospitaliers (biomédical, thérapie cellulaire et assurance qualité) travaillent à plein temps sur la structure.

Description de l'activité :

Actuellement la plateforme est principalement utilisée pour la production des îlots de Langerhans humains. Depuis son ouverture, 5 essais cliniques et 2 protocoles compassionnels ont été menés, 637 pancréas ont été isolés et 128 injections ont été réalisées chez des patients diabétiques de type 1. Le centre de greffe d'îlots lillois a une réputation internationale (38). L'essai clinique actuellement en cours est un essai médico-économique visant la prise en charge de la greffe d'îlots par l'Assurance Maladie d'ici 2020 (39). La préparation d'îlots de Langerhans est actuellement classifiée par le CAT comme une préparation de thérapie cellulaire. Cependant, toute modification substantielle du procédé de préparation entraînerait une reclassification des îlots de Langerhans en MTI. Les modifications substantielles peuvent être une co-culture des îlots avec un autre type cellulaire (exemple : cellules souches mésenchymateuses), l'utilisation de vésicules extracellulaires ou d'exosomes, l'utilisation de matrice décellularisée ou la dissociation complète du pancréas et la formation de pseudoîlots.

La plateforme possède diverses autorisations dont une autorisation des locaux pour la production des produits de thérapie cellulaire (article L.1243-2 du CSP), une autorisation pour les essais cliniques (article L.1123-8 du CSP) ainsi que des autorisations pour le prélèvement et l'importation ou l'exportation de tissus et de cellules à finalité scientifique (article L.1232-3 du CSP).

En moyenne la PBT réalise une préparation par semaine, la production d'îlots de Langerhans étant dépendante des PMO (Prélèvement Multi-Organe), le personnel reste disponible 24h/24 et 7j/7 en cas d'isolement de pancréas.

Description des locaux :

La structure est une zone à atmosphère contrôlée (figure 12) de 240m² comprenant 3 salles blanches de production classées D (une salle contenant 2 hottes à flux d'air laminaires biplaces et une salle contenant 2 hottes à flux d'air laminaire monoplaces)

ainsi que des salles de stockage (azote, -80°C , -26°C , $+4^{\circ}\text{C}$ et $+15^{\circ}\text{C}$ à $+25^{\circ}\text{C}$). La plateforme répond règlementairement aux Bonnes Pratiques Tissus Cellules (BPTC) qui est actuellement le cadre réglementaire des produits de thérapie cellulaire tels que les îlots de Langerhans.

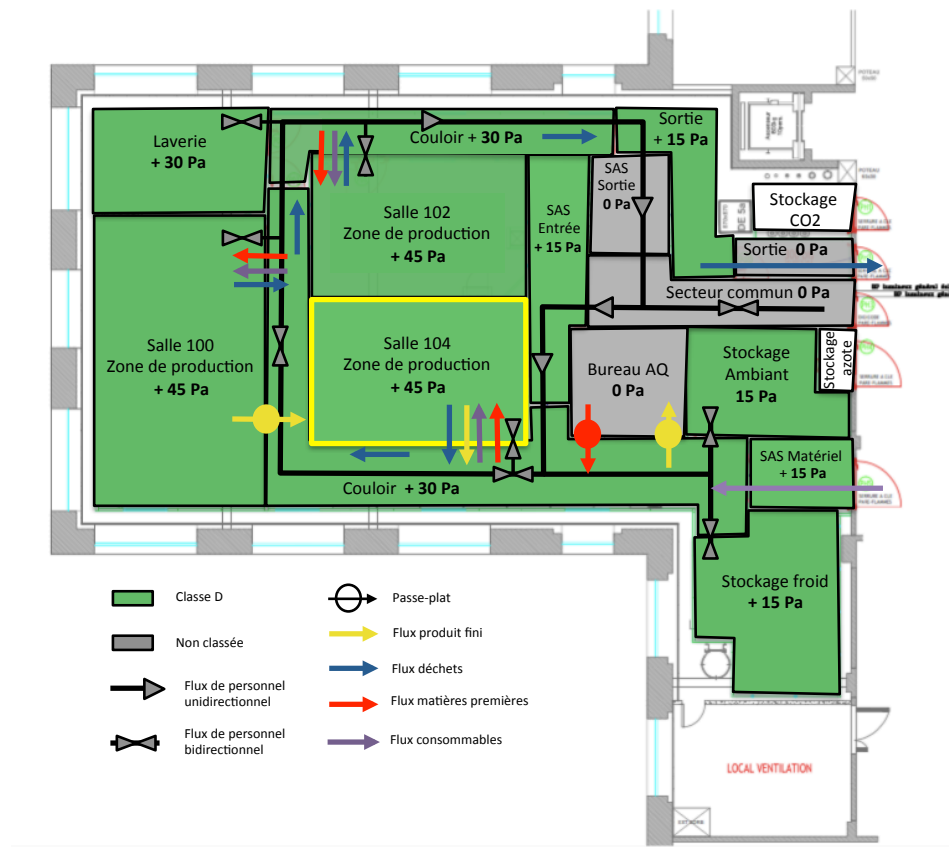


Figure 12 : Caractéristiques aérauliques et flux de la plateforme de biothérapie.

b) Conformité à la réglementation

i) Conformité des locaux de production et de leur monitoring

Zone de production

PRESSIONS ET AGENCEMENT	<input checked="" type="checkbox"/>	Zones agencées dans un ordre logique (correspondant à la séquence des opérations et aux différentes classes de "propreté" des salles)
	<input checked="" type="checkbox"/>	Arrangement de l'environnement de travail et des équipements adéquates pour minimiser les risques de confusion entre les différents produits et leurs composants, les risques de contamination croisée et les risques d'oubli ou d'erreurs pendant la production ou le contrôle (cf Annexe II : mesures préventives des contaminations croisées)
	<input checked="" type="checkbox"/>	Disposition permettant la séparation des flux non stériles et stériles (matériels et équipements)
	<input type="checkbox"/>	Si séparation non possible : le maniement du matériel et équipements doit être séparé dans le temps et des mesures appropriées doivent être mises en place
		L'élément essentiel de la prévention des contaminations est la séparation adéquate des zones de production
	<input checked="" type="checkbox"/>	Maintien de la qualité de l'air : flux approprié des zones de plus grande propreté vers les zones adjacentes moins propres
	<input checked="" type="checkbox"/>	Cascades de pression entre les pièces de différentes propreté doivent être définies
	<input checked="" type="checkbox"/>	Cascades de pression entre les pièces de différentes propreté doivent être surveillées par des méthodes appropriées
	<input checked="" type="checkbox"/>	Des pièces adjacentes de différentes classes doivent avoir un différentiel de pression de 10-15Pa (valeurs indicatives)
	<input checked="" type="checkbox"/>	Les pièces dont la pureté de l'air est plus élevée présentent une différence de pression positive importante par rapport aux pièces adjacentes dont la pureté de l'air est plus faible
	<input type="checkbox"/> Si pour des raisons de confinement (utilisation de vecteurs répliatifs, bactéries pathogènes) : travail dans zone à pression négative et entourée de zone propre à pression positive et de classe appropriée	

SAS ET VESTIAIRES	<input checked="" type="checkbox"/>	L'accès aux zones propres doit se faire par un sas muni de portes verrouillées
	<input checked="" type="checkbox"/>	Les deux portes ne peuvent pas s'ouvrir simultanément
	<input checked="" type="checkbox"/>	Les vestiaires doivent être conçus comme des sas
	<input checked="" type="checkbox"/>	Les vestiaires doivent être utilisés pour séparer physiquement les différentes étapes de l'habillage et réduire au maximum la contamination microbienne et particulaire des vêtements de protection
	<input type="checkbox"/>	L'utilisation de vestiaires séparés pour entrer et sortir de zone est parfois souhaitable

ENVIRONNEMENT ASEPTIQUE - SALLE PROPRE		Objectifs : Les locaux doivent permettre d'assurer un environnement aseptique (mesures adéquates par rapport aux procédés de fabrication). Une attention particulière doit être accordée quand il n'y a pas de stérilisation terminale du produit fini
	<input checked="" type="checkbox"/>	Niveau approprié de classification de l'air devrait être déterminé en tenant compte des risques spécifiques dus à la nature du produit, du procédé de fabrication et en particulier si la transformation a lieu dans un système ouvert

Monitoring environnemental permet d'évaluer l'efficacité des contrôles de contaminations et d'identifier les menaces spécifiques

- Système de surveillance des particules en suspension dans l'air pour évaluer les risques potentiels de contamination et assurer un environnement aseptique (y compris dans les isolateurs et les PSM)

Mesure des particules non viables en ambiance				
Classe	Limites maximales recommandées pour des particules $\geq 0,5\mu\text{m}/\text{m}^3$		Limites maximales recommandées pour des particules $\geq 5\mu\text{m}/\text{m}^3$	
	En activité	Au repos	En activité	Au repos
C	3 520 000	3 520 000	29 000	2 900

Pour les zones de classe C et D : stratégie de contrôle à établir en fonction des risques et de la nature des opérations à effectuer

Contrôle 4 fois par an en activité et 2 fois par an au repos

Mesure des particules non viables sous PSM				
Classe	Limites maximales recommandées pour des particules $\geq 0,5\mu\text{m}/\text{m}^3$		Limites maximales recommandées pour des particules $\geq 5\mu\text{m}/\text{m}^3$	
	En activité	Au repos	En activité	Au repos
A	3 520	3 520	20	20

Pour les zones de classes A : surveillance des particules pendant toute la production sauf si dûment justifié (expl : contaminants dans le processus endommageant le compteur de particules)

Non réalisé en continu. Contrôle 4 fois par an au repos et 4 fois par an en activité

- Surveillance des micro-organismes (y compris pour les isolateurs et PSM)

Mesures de la charge microbienne en activité en ambiance			
Classe	Echantillon d'air CFU/m ³	Plaque de sédimentation (90mm de diamètre) CFU/4h	Gélose de contact (55mm de diamètre) CFU/gélose
C	100	50	25

Echantillon d'air et gélose : 2 fois par an au repos et 2 fois par an en activité.

Plaque de sédimentation : 4 fois par an

Surveillance continue pendant les opérations critiques où le produit est exposé à l'environnement

Mesures de la charge microbienne en activité sous PSM			
Classe	Echantillon d'air CFU/m ³	Plaque de sédimentation (90mm de diamètre) CFU/4h	Gélose de contact (55mm de diamètre) CFU/gélose
A	<1	<1	<1

Contrôle 1 fois par an au repos et 4 fois par an en activité

Surveillance continue pendant les opérations critiques où le produit est exposé à l'environnement

ii) Conformités spécifiques aux OGM

Exigences du HCB	
Confinement C1	
Equipements de confinement	
<input type="checkbox"/>	Non requis
Agencement spécial du laboratoire	
<input type="checkbox"/>	Non requis
Confinement C2	
Equipements de confinement	
<input checked="" type="checkbox"/>	Travail sous PSM / isolateur
<input checked="" type="checkbox"/>	PSM et isolateur doivent être certifiés par le LNE et testés selon les normes en vigueur
Agencement spécial des locaux	
<input checked="" type="checkbox"/>	Ventilation des salles dédiées aux activités techniques est assurée par un dispositif de ventilation mécanique
<input checked="" type="checkbox"/>	Un autoclave pour la stérilisation des déchets et des matériels contaminés doit être disponible à proximité du lieu où sont manipulés des OGM
<input checked="" type="checkbox"/>	Les conduites de vide doivent être protégées par des filtres afin de ne pas risquer de contaminer le système générateur de vide en cas de rupture de vide ou de reflux
Exigences Guidelines spécifiques aux MTI	
<input type="checkbox"/>	Pas de passage du personnel d'une zone de production OGM à une zone de production non OGM, ni d'une zone OGM à l'autre
<input type="checkbox"/>	Flux unidirectionnels à considérer
Recommandations de la SFPO	
<input type="checkbox"/>	ZAC avec gradient de pression adapté au risque des produits manipulés
<input type="checkbox"/>	Si OGM classé au moins G2 : pièce de préparation en dépression par rapport à un sas en pression positive est à privilégier
<input type="checkbox"/>	Préparation des MTI sous PSM de type IIB ou III avec dispositif d'évacuation relié à l'extérieur

c) Faisabilité d'une production de MTI selon le protocole CARAMBA dans la structure de la PBT

En résumé pour la PBT, bien que la structure réponde en certains points aux exigences, ses principaux manquements sont pour la production du protocole CARAMBA :

- l'absence de zone de classe B pour une production en système ouvert A dans B.
- l'absence de contrôle environnemental des particules non viables en continu pendant toute la production.
- l'absence de séparations des flux stériles et non stériles

Ces items sont obligatoires pour la production de grade GMP.

- l'absence de zone de production en dépression.
- l'absence de flux de personnel unidirectionnel

Nous considérons ces deux items comme des non conformités bien qu'ils ne soient pas des obligations réglementaires.

Les différents manquements des salles par rapport aux exigences réglementaires et aux recommandations nécessaires pour une production du CAR-T cells CARAMBA sont résumés, respectivement en rouge et en vert, dans le tableau ci-dessous.

	UPCC	UCPA	Salle Blanche du Préparatoire	PBT
Classe de la zone de production	C	C	B	D
Monitoring environnemental conforme à une salle de classe B	non	non	non	non
Autoclave à proximité	oui	oui	oui	oui
Séparation des flux stériles et non stériles	oui	oui	non	non
Vestiaires séparés pour l'entrée et la sortie	non	non	non	oui
Flux de personnel unidirectionnel	non	non	non	non
Travail sous PSM de type IIB ou III avec évacuation vers l'extérieur	non	non	non	non
Salle en dépression	oui	oui	non	non

Tableau 7 : Résumé des non conformités des différentes structures pour une production CARAMBA

C) DISCUSSION :

Les récentes propositions de participation à des essais cliniques de production de MTI exigent une réflexion importante quant à leur prise en charge au niveau local de par leur caractère innovant, leur statut de médicament et leurs exigences réglementaires. La production de thérapie cellulaire, en particulier la production d'îlots de Langerhans, est réalisée au CHU de Lille depuis de nombreuses années. Il est apparu logique de rapprocher la PUI de la plateforme de biothérapie pour la production des CAR-T cells.

En terme de production, nous avons identifié trois principaux procédés qui comportent chacun leur contraintes :

La production de CAR-T cells (protocole CARAMBA). Bien que le processus de production soit décrit théoriquement sa mise en place reste encore à définir. Parce qu'il s'agit d'un essai clinique multicentrique, les centres de productions impliqués doivent tous avoir la même méthode et l'on sait que le processus de production est en système ouvert, sous hotte à flux d'air laminaire. Ce type de production A dans B nécessite une

salle de production de classe B. Deux personnes sont nécessaires pour cette production afin de permettre un double contrôle. La production peut être réalisée par campagnes et est programmable étant donné le faible nombre de patients prévu, le prélèvement autologue de la matière première et la réinjection programmée. La SFPO recommande le travail en dépression pour la préparation des MTI, bien que non requis par le HCB pour des OGM du groupe I et II. Nous choisissons de produire ces CAR-T cells dans une salle en dépression ($\Delta P = -15\text{Pa}$) par rapport aux salles voisines afin de maintenir le confinement du produit manipulé dans la salle.

Les aménagements nécessaires et indispensables à la production du protocole CARAMBA dans chacune des salles seraient :

- A l'UPCC : bien qu'un monitoring continu des particules non viables en cours de production puisse être mis en place, l'absence de zone de classe B et d'une hotte à flux d'air laminaire sont les principaux éléments bloquants pour cette production. Pour permettre à la salle de préparation d'être de classe B, un sas supplémentaire serait nécessaire pour le passage de la classe C à la classe B avec respect de la cascade de pression ainsi que des vestiaires séparés pour entrer et sortir de la zone. Par ailleurs, l'UPCC est utilisée quotidiennement pour la préparation des cytotoxiques et est donc aujourd'hui non disponible.
- A l'UCPA : contrairement à l'UPCC, cette ZAC est actuellement disponible pour accueillir une nouvelle activité, bien que celle-ci soit à l'avenir potentiellement impliquée dans un projet de préparation des poches de nutrition parentérale. En admettant qu'un monitoring continu des particules non viables en cours de production puisse être mis en place, l'absence de zone de classe B est l'élément bloquant principal à cette production en système ouvert. Pour avoir une zone de classe B, il faudrait également construire un sas supplémentaire pour passer d'une classe C à une classe B en ayant une cascade de pression conforme. Il faudrait également installer une hotte à flux d'air laminaire avec rejet de l'air vers l'extérieur pour cette production.
- Dans la salle blanche du préparatoire : si nous considérons uniquement les obligations à la réglementation, la production du protocole CARAMBA pourrait être effectuée dans cette salle si cette dernière y était dédiée et si un monitoring continu des particules non viables était mis en place ainsi qu'une réorganisation des flux afin de séparer les flux stériles et non stériles (en particulier le produit fini des déchets). Nous pourrions imaginer un déplacement des activités du préparatoire dans la ZAC de l'UCPA si celle-ci restait libre afin de consacrer la

salle blanche à la production des CAR-T cells. Cependant, les recommandations de travail en dépression, d'extraction de l'air du PSM vers l'extérieur ne sont pas présentes sur cette structure, et compte tenu du caractère OGM des CAR-T cells du protocole CARAMBA nous souhaitons que ces recommandations soient respectées.

- A la plateforme de biothérapie : une des salles de production est disponible (entourée en jaune sur la figure 12) pour accueillir la production du protocole CARAMBA. Cependant cette structure présente différents éléments bloquants à la production des CAR-T cells dont l'absence de zone de production de classe B, l'absence de monitoring continu des particules non viables ainsi que l'absence de séparation des flux stériles et non stériles (existence d'un couloir de circulation bidirectionnelle qui implique le passage des déchets de la salle 104 devant l'entrée des salles 100 et 102, et des déchets de la salle 100 devant l'entrée de la salle 102). Au vu du classement des ZAC de la PBT en classe D il paraît compliqué, à court terme, de réussir à obtenir une classe B. De plus, les salles de production de la PBT ne sont pas en dépression ce que nous souhaitons pour la production du protocole CARAMBA.

A terme, pour la production d'autres types de CAR-T cells nous pouvons imaginer une production à l'aide d'un automate de production comme le CliniMACS Prodigy® de Miltenyi Biotec avec des kits à usage unique. Toute la production s'effectue au sein de cet appareil en système fermé incluant une chambre de culture et permettant de produire jusqu'à 3×10^9 CAR-T cells. Une telle méthode de production permettrait des exigences de classe moins importantes de classe A dans C et serait donc envisageable dans la salle de l'UCPA dans la mesure où celle-ci resterait disponible. Cet automate coûte environ 160 000 euros et certains centres français en sont déjà équipés dont Necker, Nantes, le Gënëton, Cell for Cure, Marseille et l'EFS de Besançon.

La production d'îlots de Langerhans. Le processus de production est connu et maîtrisé par l'équipe de la plateforme de biothérapie. Actuellement il dure 4 à 8 heures et nécessite trois personnes qui travaillent sous hotte à flux d'air laminaire (classe A). La production d'îlots est dépendante du prélèvement multi-organes ce qui oblige une disponibilité permanente d'une salle de production. A ce jour, les îlots de Langerhans sont classés « produit de thérapie cellulaire » mais une classification en MTI est à envisager à court ou moyen terme, c'est pourquoi nous avons décidé de nous imposer

les contraintes inhérentes aux MTI en particulier une salle de production de classe B, pour un travail en système ouvert A dans B. Dans un tel cas, une adaptation des locaux de production de la plateforme de biothérapie sera alors nécessaire. Une proposition d'aménagement est proposée ci-après (figure 13).

Un travail sous isolateur de culture en système fermé permettrait de réduire le niveau de contrainte de classe de la zone de production à une classe D et éviterait ainsi des adaptations coûteuses. Cependant, une modification du protocole de production en système fermé n'est pas simple et nécessite au préalable de nombreux essais, une analyse de risque ainsi qu'une adaptation du personnel à cette nouvelle méthode. Un isolateur de culture coûte environ 650 000 euros et doit être réfléchi et construit pour un protocole donné.

La production de médicament de thérapie cellulaire somatique pure. A l'heure actuelle le CHU de Lille n'est pas encore inclus dans un tel essai clinique de production mais des sollicitations ont déjà eu lieu. En l'absence de protocole de production précis il est aujourd'hui difficile d'établir avec précision les besoins d'une telle activité. Néanmoins une salle de production d'au moins 15m² en surpression serait nécessaire pour empêcher l'entrée de contaminants dans la zone de préparation. En fonction de la méthode de production établie, la contrainte de classe ne sera pas la même. En effet, si la production peut être réalisée en système fermé nous pourrions utiliser, comme évoqué pour les îlots de Langerhans, un isolateur de culture et donc une exigence de classe A dans D. Si tel était le cas, la plateforme de biothérapie pourrait accueillir un protocole de production de thérapie cellulaire somatique grâce à sa salle disponible (classe D en surpression) entourée en jaune sur la figure 12. Au contraire, si la production est mise au point en système ouvert sous hotte à flux d'air laminaire, alors une salle de classe B est requise et une adaptation des locaux de la plateforme de biothérapie est nécessaire.

Aménagement de la plateforme de biothérapie :

La structure de la plateforme de biothérapie a une surface de plus de 200m² et l'une des salles n'est actuellement pas occupée. Afin d'optimiser au maximum cette surface et parce que la menace de changement de statut des îlots de Langerhans en MTI est réelle, nous proposons un aménagement important de cette structure. Actuellement, c'est une structure de production de PTC qui ne permet pas, en l'état, la production de MTI au grade BPF et en particulier du protocole CARAMBA qui nécessite une production en système ouvert (A dans B). De même, sans adaptation du protocole de

production des îlots de Langerhans, celui-ci a lieu en système ouvert. Avec la restructuration de la surface il faudra également l'ajout ou le remplacement de centrale de traitement d'air (CTA) dans le but d'obtenir des zones de production de classe B. Il faudra également créer des sas supplémentaires pour avoir une cascade de pression conforme entre les différentes zones et permettre l'obtention de flux unidirectionnels. Il faut au moins deux zones de production de classe B, une en surpression dédiée à la production d'îlots de Langerhans et une en dépression, pour la production des CAR-T cells du protocole CARAMBA. Des sorties différentes pour la gestion des déchets OGM et non OGM doivent être mises en place ainsi que des zones d'entrées et de stockages communes. Cet aménagement permettrait d'avoir deux salles de production qui pourraient accueillir les deux procédés de fabrication les plus urgents en termes de délais à l'heure actuelle.

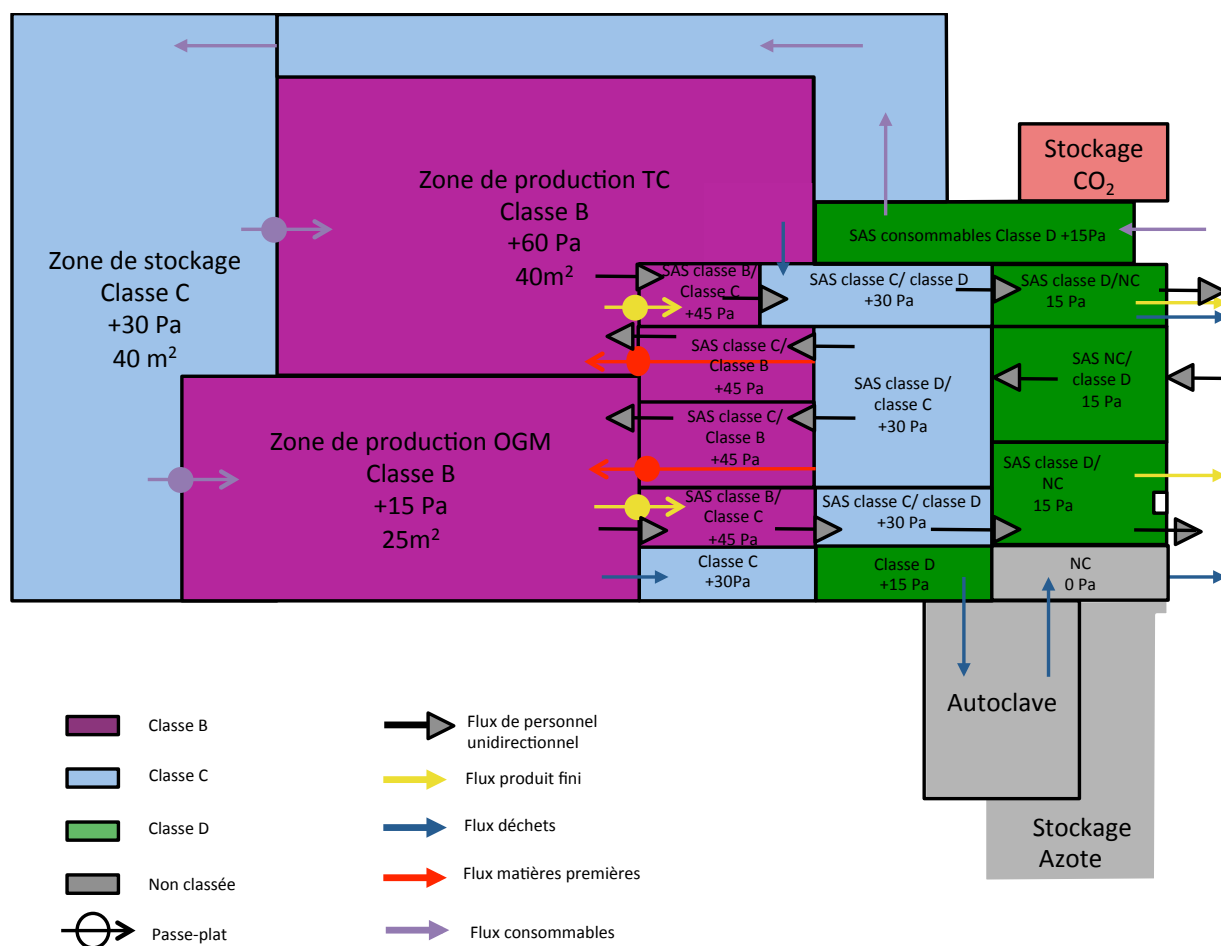


Figure 13 : Proposition d'aménagement de la surface de la plateforme de biothérapie.

Compte tenu de l'agencement de la structure, nous n'avons réussi à intégrer que deux salles sur les trois que nous souhaiterions. Cependant une solution est possible pour accueillir un futur protocole de thérapie cellulaire somatique. En effet les Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapy Medicinal Products (40) définissent des conditions pour l'existence d'une salle de multiproduction. A partir de celles-ci, nous avons établi un algorithme décisionnel (figure 14) afin d'identifier quels protocoles peuvent être réalisés au sein de cette même salle.

En effet, si un MTI de thérapie cellulaire somatique devait être produit sur site nous pourrions éventuellement produire ce nouveau MTI dans la même salle (en dépression) que le protocole CARAMBA après mise en place de mesures opérationnelles et techniques pour prévenir les risques de contamination croisée, selon les recommandations des GMP. Il y aurait alors une production par campagne, le protocole CARAMBA pourrait se faire sous hotte à flux d'air laminaire et le nouveau protocole sous hotte à flux d'air laminaire ou sous isolateur, dans un équipement différent et jamais simultanément. Cette configuration est possible car la production du CAR-T cells CARAMBA est réalisé sans vecteurs viraux infectieux.

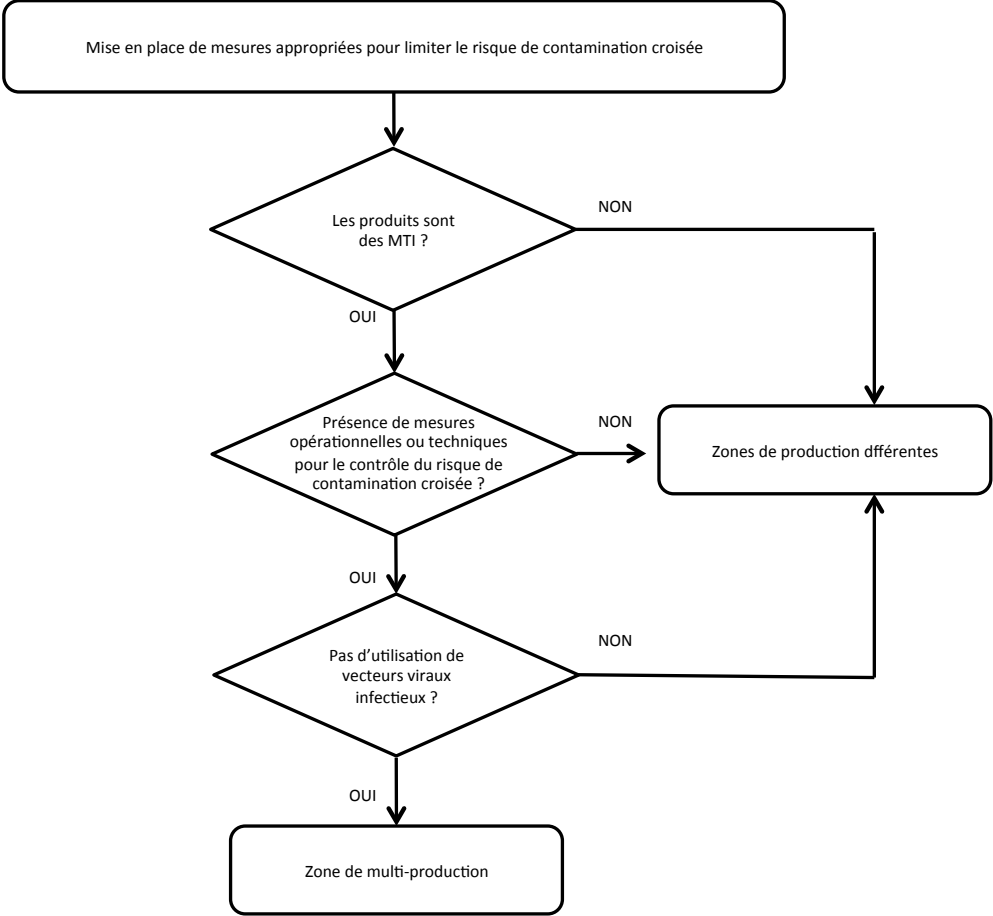
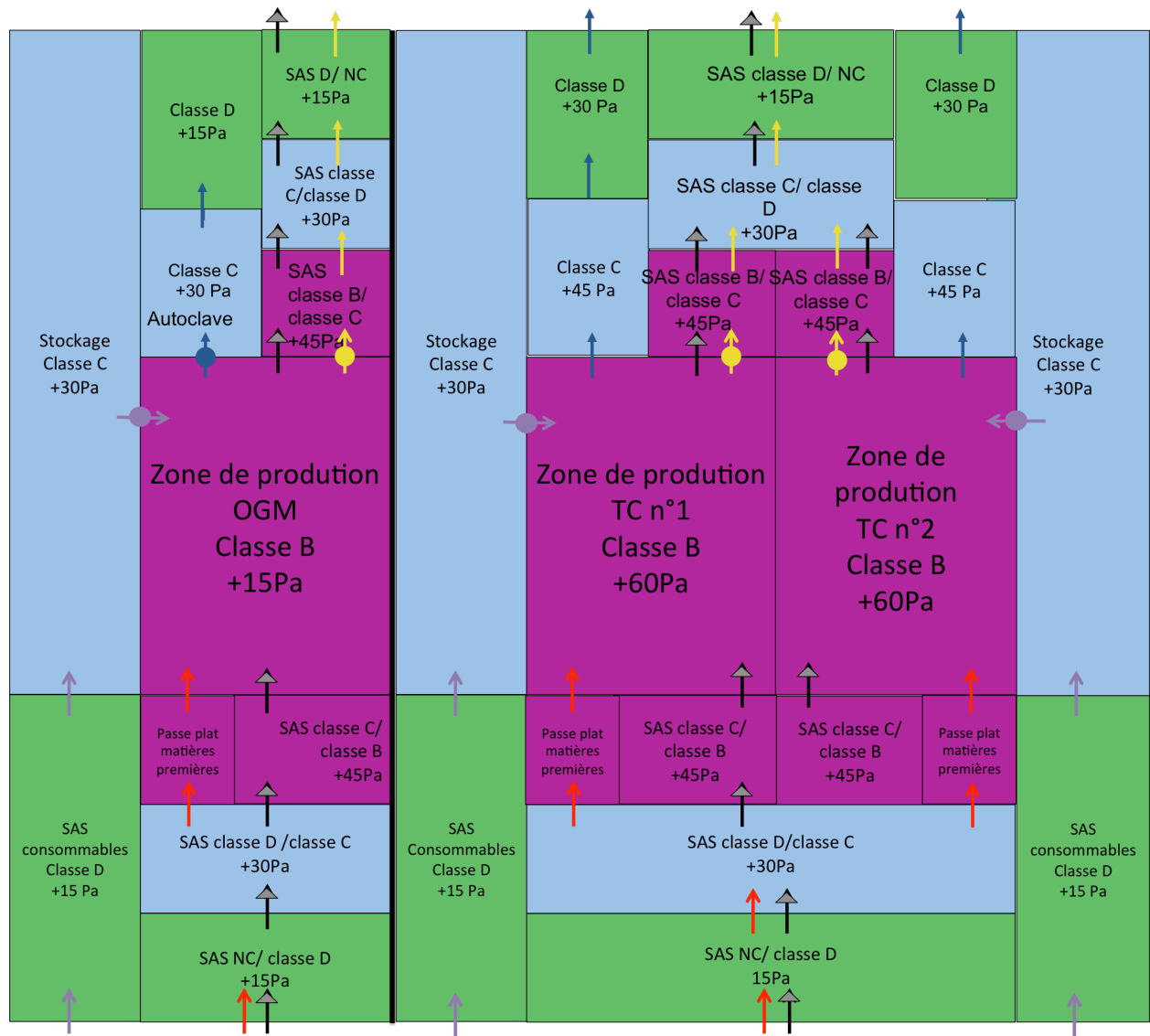


Figure 14 : algorithme décisionnel de cohabitation de différents produits au sein d'une zone multi-production.

Construction d'une nouvelle plateforme dédiée à la production des MTI

La dernière solution permettant une plateforme comprenant les trois salles de production que nous souhaitons serait la construction d'une nouvelle structure entièrement dédiée à la production de MTI. La figure 15 ci-dessous est une proposition d'agencement de structure idéale pouvant permettre la production simultanée de MTI OGM et non OGM ainsi qu'une salle dédiée à la production d'îlots de Langerhans lorsque ceux-ci seront classés MTI (zone de production n°1 sur la figure 15).



ZONE OGM

ZONE NON OGM

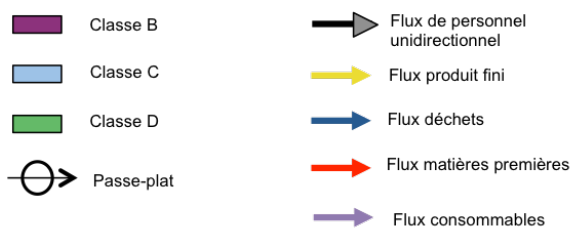


Figure 15 : schéma d'agencement d'une « structure idéale »

CONCLUSION :

Au vu des différentes possibilités que nous avons étudiées, la plateforme de biothérapie semble être, après aménagement, une solution pouvant accueillir la production du protocole CARAMBA en y optimisant la surface dévolue et en y mutualisant les moyens humains et matériels. Cependant, si cet aménagement devait avoir lieu il faudrait alors envisager une relocalisation temporaire de l'activité de la plateforme de biothérapie pendant la durée des travaux. Par ailleurs il serait également nécessaire de déposer une demande d'autorisation pour les locaux auprès de l'ARS afin qu'ils deviennent une annexe de la PUI ainsi qu'une demande d'essai clinique auprès de l'ANSM. L'aménagement proposé tient compte des contraintes des procédés de production du protocole CARAMBA et de celles du procédé de préparation des îlots de Langerhans. Toutefois, il est difficile de se projeter concernant la production d'autres protocoles puisque que chaque procédé est spécifique à son type cellulaire. Une autre solution serait de concevoir une nouvelle structure plus polyvalente susceptible d'accueillir un plus grand nombre de protocoles MTI. Afin de choisir l'une de ces solutions, une analyse de risque, une étude économique et un accompagnement par des experts devront être mise en place.

Ce travail de thèse constitue une première partie de l'étude de faisabilité pour la réalisation de la production sur site du protocole CARAMBA. En effet, la production de MTI au grade GMP comporte de nombreuses contraintes réglementaires autres que celles liées à la production en conditions aseptiques qu'il faudra également prendre en compte afin de mener à bien ce projet.

BIBLIOGRAPHIE :

1. Règlement (CE) n° 1394/2007 du Parlement européen et du Conseil du 13 novembre 2007 concernant les médicaments de thérapie innovante et modifiant la directive 2001/83/CE ainsi que le règlement (CE) n° 726/2004, (2007).
2. Directive 2003/63/CE de la Commission, du 25 juin 2003, modifiant la directive 2001/83/CE du Parlement européen et du Conseil instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain.
3. Directive 93/42/CEE du Conseil, du 14 juin 1993, relative aux dispositifs médicaux.
4. Directive 90/385/CEE du Conseil, du 20 juin 1990, concernant le rapprochement des législations des États membres relatives aux dispositifs médicaux implantables actifs.
5. Directive 2001/83/CE du Parlement européen et du Conseil du 6 novembre 2001 instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain.
6. Directive 2004/23/CE du Parlement Européen et du Conseil du 31 mars 2004 relative à l'établissement de normes de qualité et de sécurité pour le don, l'obtention, le contrôle, la transformation, la conservation, le stockage et la distribution des tissus et cellules humains.
7. Arrêté du 4 février 2013 fixant le contenu des demandes d'autorisation initiale, de renouvellement d'autorisation ou de modification d'autorisation des médicaments de thérapie innovante préparés ponctuellement et des établissements ou organismes qui préparent ces produits
8. Biotechnologies HCd. Manuel du HCB pour l'utilisation confinée d'organismes génétiquement modifiés. 2015.
9. Règlement (UE) n° 536/2014 du Parlement européen et du Conseil du 16 avril 2014 relatif aux essais cliniques de médicaments à usage humain et abrogeant la directive 2001/20/CE Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE.
10. Directive 2001/20/CE du Parlement Européen et du Conseil du 4 avril 2001 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à l'application de bonnes pratiques cliniques dans la conduite d'essais cliniques de médicaments à usage humain.
11. Directive 2003/94/CE de la Commission du 8 octobre 2003 établissant les principes et lignes directrices de bonnes pratiques de fabrication concernant les médicaments à usage humain et les médicaments expérimentaux à usage humain.
12. Décret n° 2016-1536 du 15 novembre 2016 relatif aux médicaments de thérapie innovante.
13. Code de la santé publique - Article R4211-53.
14. Code de la santé publique - Article R4211.
15. Code de la santé publique - Article L1121-1.
16. Code de la santé publique - Article L1243-2.
17. Décret n° 2012-1236 du 6 novembre 2012 relatif aux médicaments de thérapie innovante.
18. Pule MA, Savoldo B, Myers GD, Rossig C, Russell HV, Dotti G, et al. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nature medicine*. 2008 Nov;14(11):1264-70. PubMed PMID: 18978797. Pubmed Central PMCID: 2749734.

19. Brentjens RJ, Santos E, Nikhamin Y, Yeh R, Matsushita M, La Perle K, et al. Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007 Sep 15;13(18 Pt 1):5426-35. PubMed PMID: 17855649.
20. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2011 Aug 25;365(8):725-33. PubMed PMID: 21830940. Pubmed Central PMCID: 3387277.
21. Kochenderfer JN, Wilson WH, Janik JE, Dudley ME, Stetler-Stevenson M, Feldman SA, et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood*. 2010 Nov 18;116(20):4099-102. PubMed PMID: 20668228. Pubmed Central PMCID: 2993617.
22. Zhang C, Liu J, Zhong JF, Zhang X. Engineering CAR-T cells. *Biomarker research*. 2017;5:22. PubMed PMID: 28652918. Pubmed Central PMCID: 5482931.
23. Chmielewski M, Abken H. TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert opinion on biological therapy*. 2015;15(8):1145-54. PubMed PMID: 25985798.
24. D'Aloia MM, Zizzari IG, Sacchetti B, Pierelli L, Alimandi M. CAR-T cells: the long and winding road to solid tumors. *Cell death & disease*. 2018 Feb 15;9(3):282. PubMed PMID: 29449531. Pubmed Central PMCID: 5833816.
25. Yakoub-Agha I, Ferrand C, Chalandon Y, Ballot C, Castilla Llorente C, Deschamps M, 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)]. *Bulletin du cancer*. 2017 Dec;104(12S):S43-S58. PubMed PMID: 29174320. Prerequis 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 (CAR T-cells) : recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC).
26. Kebriaei P, Singh H, Huls MH, Figliola MJ, Bassett R, Olivares S, et al. Phase I trials using Sleeping Beauty to generate CD19-specific CAR T cells. *The Journal of clinical investigation*. 2016 Sep 1;126(9):3363-76. PubMed PMID: 27482888. Pubmed Central PMCID: 5004935.
27. Monjezi R, Miskey C, Gogishvili T, Schleef M, Schmeer M, Einsele H, et al. Enhanced CAR T-cell engineering using non-viral Sleeping Beauty transposition from minicircle vectors. *Leukemia*. 2017 Jan;31(1):186-94. PubMed PMID: 27491640.
28. Hudecek M, Izsvak Z, Johnen S, Renner M, Thumann G, Ivics Z. Going non-viral: the Sleeping Beauty transposon system breaks on through to the clinical side. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2017 Aug;52(4):355-80. PubMed PMID: 28402189.
29. Zhu J KB, Park CW, et al. Erythroid-specific expression of beta-globin by the sleeping beauty transposon for Sickle cell disease. *Biochemistry* 2007;46:6844-58.
30. Latella MC CF, De Rosa L, et al. Correction of recessive dystrophic epidermolysis bullosa by transposon-mediated integration of COL7A1 in transplantable patient-derived primary keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2016.
31. Chen ZJ KB, Wong PY, et al. Sleeping Beauty-mediated down-regulation of huntingtin expression by RNA interference. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;329:646-52.
32. Eyjolfssdottir H EM, Linderöth B, et al. Targeted delivery of nerve growth factor to the cholinergic basal forebrain of Alzheimer's disease patients: application of a second-generation encapsulated cell biodelivery device. *Alzheimers Res Ther* 2016;8:30.

33. Huang X GH, Kang J, et al. . Sleeping beauty trans- poson-mediated engineering of human primary T cells for therapy of CD19 β lymphoid malignancies. *Mol Ther*. 2008;16:580–9.
34. Singh H MP, Olivares S, et al. Redirecting spe- cificity of T-cell populations for CD19 using the sleeping beauty system. *Cancer Res*. 2008;68:2961–71.
35. Jin Z MS, Huls H, et al. . The hyperactive sleeping beauty transposase SB100X improves the genetic modifica- tion of T cells to express a chimeric antigen receptor. *Gene Ther* 2011;18:849–56.
36. Magnani CF TN, Benedicenti F, et al. Immunotherapy of acute leukemia by chimeric antigen receptor-modified lymphocytes using an improved sleeping beauty transposon platform. *Oncotarget*. 2016;7:51581–97.
37. Ohlfest JR DZ, Motooka Y, et al. Combinatorial antiangiogenic gene therapy by nonviral gene transfer using the sleeping beauty transposon causes tumor regression and improves survival in mice bearing intracranial human glioblastoma. *Mol Ther* 2005;12:778–88.
38. Vantghem MC, Defrance F, Quintin D, Leroy C, Raverdi V, Prevost G, et al. Treating diabetes with islet transplantation: lessons from the past decade in Lille. *Diabetes & metabolism*. 2014 Apr;40(2):108-19. PubMed PMID: 24507950.
39. Lablanche S VM, Kessier L, Wojtuszczyzn A, Borot S, Thivolet C, Bosco D, Bosson JL, Colin C, Tetaz R, Logerot S, Kerr-Conte J, Renard E, Penfornis A, Morelon E, Buron F, Skaare K, Grguric G, Camillo-Brault C, Egelhofer H, Benomar K, Badet L, Berney T, Pattou F, Benhamou PY. Islet transplantation versus insulin therapy in patients with type 1 diabetes with severe hypoglycaemia or poorly controlled glycaemia after kidney transplantation (TRIMECO): a multicentre, randomised controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinology*. 2018;6(7):527-37.
40. commission E. guidelines on good manufacturing practice specific to advanced therapy medicinal products. *Eudralex The Rules Governing Medicinal Products in the European Union*. 2017;4.

ANNEXES :

Annexe I : Annexe I du Règlement Européen (CE) n°1394/2007 du Parlement Européen et du Conseil. Liste des manipulations non substantielles.

ANNEXE I

Manipulations visées à l'article 2, paragraphe 1, point c), premier tiret

- découpage,
- broyage,
- façonnage,
- centrifugation,
- trempage dans des solutions antibiotiques ou antimicrobiennes,
- stérilisation,
- irradiation,
- séparation, concentration ou purification de cellules,
- filtration,
- lyophilisation,
- congélation,
- cryoconservation,
- vitrification.

*Annexe II : Mesures préventives contre les contaminations croisées (Chapitre 9.4
Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapy Medicinal
Products)*

- 9.35. Measures to prevent cross-contamination appropriate to the risks identified should be put in place. Measures that can be considered to prevent cross-contamination include, among others:
- (i) Segregated premises.
 - (ii) Dedicating the whole manufacturing facility or a self-contained production area on a campaign basis (separation in time) followed by a cleaning process of validated effectiveness.
 - (iii) Use of “closed systems” for processing and material/product transfer between equipment.
 - (iv) Use of air-locks and pressure cascade to confine potential airborne contaminant within a specified area.
 - (v) Utilisation of single use disposable technologies.
 - (vi) Adequate cleaning procedures. The cleaning procedure (technique, number of sanitation steps, *etc.*) should be adapted to the specific characteristics of the product and of the manufacturing process. A risk-assessment should be used to determine the cleaning/decontamination procedures that are necessary, including the frequency thereof. As a minimum, there should be appropriate cleaning/decontamination between each batch. The cleaning/decontamination procedures should be validated as explained in Section 10.2.
 - (vii) Other suitable technical measures, such as the dedication of certain parts of equipment (*e.g.* filters) to a given type of product with a specific risk profile.
 - (viii) Other suitable organizational measures, such as keeping specific protective clothing inside areas where products with high-risk of contamination are processed, implementing adequate measures to handling waste, contaminated rinsing water and soiled gowning, or imposing restrictions on the movement of personnel.

2.3.4. Additional considerations relevant for investigational ATMPs

- 2.48. While additional adaptations in the application of GMP may be justified in the case of investigational ATMPs, it is stressed that the quality, safety and traceability of the product should be ensured also in a clinical trial setting.
- 2.49. The following are examples of additional possible adaptations that may be acceptable in the case of investigational ATMPs:
- 2.50. • While investigational ATMPs should be manufactured in a facility with air quality requirements in accordance with the requirements set out in Sections 4.3.2 and 9.5, in case of investigational ATMPs in very early phase/proof of concept trials, it may be exceptionally possible to manufacture the product in an open system in a critical clean area of grade A with a background clean area of grade C if the following (cumulative) conditions are met:
- (i) A risk-assessment has been performed and demonstrated that the implemented control measures are adequate to ensure manufacture of the product of appropriate quality. In addition, the control strategy should be described in the investigational medicinal product dossier.
 - (ii) The product is intended to treat a life threatening condition where no therapeutic alternatives exist.
 - (iii) The relevant competent authorities agree (agreement of both the assessors of the clinical trial and the inspectors of the site).
- 2.51. • In early phases of clinical research (clinical trial phases I and I/II) when the manufacturing activity is very low, calibration, maintenance activities, inspection or checking of facilities and equipment should be performed at appropriate

intervals, which may be based on a risk-analysis. The suitability for use of all equipment should be verified before it is used.

- 2.52. • The level of formality and detail for the documentation can be adapted to the stage of development. The traceability requirements should however be implemented in full.
- 2.53. • During early phases of clinical development (clinical trial phases I and I/II) specifications can be based on wider acceptance criteria taking due account of the current knowledge of the risks and as approved by the competent authority that authorises the clinical trial.
- 2.54. • Possible adaptations regarding qualification of premises and equipment, cleaning validation, process validation, and validation of analytical methods are described in Section 10.

Certaines figures ont été réalisées à l'aide de Servier Medical Art « [Servier Medical Art by Servier is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License](#) »

Système d'intégration du transposon Sleeping Beauty (LIR : left inverted repetition ; RIR : Right inverted repetition sont des séquences de répétition inversées où se lie la transposase)

Schéma de production des lymphocytes T-CAR

Action des CAR-T cells sur les cellules tumorales



Faculté de Pharmacie
de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
☎ 03.20.98.40.40 - Télécopie : 03.20.98.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr/>



DEMANDE D'AUTORISATION DE SOUTENANCE

Nom et Prénom de l'étudiant : Voissié Awo INE : 23.0003.313.1.M

Date, heure et lieu de soutenance :

Le 31 08 2018 à 17 h. 00 Amphithéâtre ou salle : Curie

Avis du conseiller (directeur) de thèse

Nom : PINTURCHU Prénom : DARINE

Favorable

Défavorable

Motif de l'avis défavorable :

Date : 07/07/2018

Signature: [Signature]

Avis du Président de Jury

Nom : D. P. D. U. Prénom :

Favorable

Défavorable

Motif de l'avis défavorable :

Date : 15/07/2018

Signature: [Signature]

Décision de Monsieur le Doyen

Favorable

Défavorable

Le Doyen

D. DECALDIN

NB : La faculté n'entend donner aucune approbation ou improbation aux opinions émises dans les thèses, qui doivent être regardées comme propres à leurs auteurs.

NA/ 2018

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2017/2018

Nom : Vaissié

Prénom : Alix

Titre de la thèse : Etude de faisabilité d'un essai clinique européen de fabrication de médicament de thérapie cellulaire et génique au CHU de Lille conformément à la réglementation

Mots-clés : Médicament de Thérapie Innovante ; Thérapie cellulaire et génique ; Réglementation ; Guidelines on Good Manufacturing Practice; CAR-T cells ; Zone à Atmosphère Contrôlée

Résumé : Les CAR-T cells appartiennent à une nouvelle classe de médicaments, les Médicaments de Thérapie Innovante (MTI), tels que définis par le règlement européen 1394/2007, et plus particulièrement à la catégorie des médicaments de thérapie génique. Les essais cliniques incluant ces CAR-T cells ne cessent de se multiplier à l'heure actuelle. Le CHU de Lille est sollicité pour participer à un essai clinique européen multicentrique de CAR-T cells nécessitant une production sur site. Confrontés à cette nouvelle demande, le but de ce travail est d'analyser les différentes solutions permettant une production de ces CAR-T cells au CHU de Lille conformément à la réglementation spécifique. Pour cela, nous avons, dans la première partie de ce travail, détaillé le contexte réglementaire encadrant les MTI et leur production, puis nous avons décrit la composition, l'efficacité, les effets secondaires et le processus de production des CAR-T cells et en particulier du protocole CARAMBA pour lequel nous sommes sollicités. La deuxième partie de ce travail consiste à établir les besoins actuels et futurs en matière de MTI au CHU de Lille. Nous avons ensuite dressés le bilan des différentes structures existantes sur site susceptibles d'accueillir la production de cet essai clinique. Ces structures ont ensuite été comparées à une check-list (centrée sur les locaux de production) élaborée à partir des « guidelines on Good Manufacturing Practice » spécifiques à la production des MTI afin d'établir leurs points de conformité. Enfin, nous discuterons des solutions disponibles quant à la prise en charge de la production de cet essai clinique au CHU de Lille.

Membres du jury :

Président : **Monsieur le Professeur Pascal ODOU**
Pharmacien, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Asseseurs : **Monsieur le Professeur Guillaume DECOCQ**
Pharmacien, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens

Madame le Professeur Julie KERR-CONTE
Professeur des Universités
Faculté de Médecine de Lille

Madame le Docteur Marine PINTURAUD
Pharmacien, Assistant Hospitalier
Centre Hospitalier Universitaire de Lille