

**THESE  
POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenu publiquement le 21 octobre 2021  
Par Thibault Pajot**

---

**Mise en place des contrôles qualité nécessaires à une production  
académique de cellules CAR-T autologues.**

---

**Membres du jury :**

**Président :**

Madame le Professeur Annabelle Dupont, PU-PH, CHU de Lille

**Directeurs, conseillers de thèse :**

Madame le Docteur Pauline Varlet, PH, CHU de Lille

Madame le Docteur Alix Vaissié, AHU, CHU de Lille

**Assesseurs :**

Madame le Professeur Myriam Labalette, PU-PH, CHU de Lille

Monsieur le Docteur David Beauvais, CCU-AH, CHU de Lille





### Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Nicolas POSTEL
Vice-présidente formation :	Lynne FRANJIÉ
Vice-président recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président relations internationales :	François-Olivier SEYS
Vice-président stratégie et prospective	Régis BORDET
Vice-présidente ressources	Georgette DAL
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 aux relations avec le monde professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la vie de la Faculté :	Claire PINÇON
Assesseur à la pédagogie :	Benjamin BERTIN
Responsable des Services :	Cyrille PORTA
Représentant étudiant :	Victoire LONG

### Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	DEPREUX	Patrick	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL

M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire

### Liste des Professeurs des Universités

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences Végétales et Fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences Végétales et Fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique et application de RMN
Mme	DEPREZ	Rebecca	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DEPREZ	Benoît	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences Végétales et Fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie industrielle
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique

M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Éric	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

### Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie

### Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
------	-----	--------	-------------

M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale
Mme	CHARTON	Julie	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire

M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	FLIPO	Marion	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences Végétales et Fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation et Déontologie pharmaceutique

Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / service innovation pédagogique
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	WELTI	Stéphane	Sciences Végétales et Fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

### Professeurs Certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

### Professeur Associé - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
------	-----	--------	-------------

M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DHANANI	Alban	Législation et Déontologie pharmaceutique

### Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

I.	Civ.	II. Nom	III. Prénom	IV. Laboratoire
	Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
	M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques
	M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
	M.	GILLOT	François	Législation et Déontologie pharmaceutique
	M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
	M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

### AHU

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

### ATER

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	GHARBI	Zied	Biomathématiques
Mme	FLÉAU	Charlotte	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale

M.	RUEZ	Richard	Hématologie
M.	SAIED	Tarak	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
Mme	VAN MAELE	Laurye	Immunologie

### Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

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



## **Remerciements**

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury :

À ma présidente de jury de thèse

**Madame la Professeur, Annabelle Dupont.**

Vous me faites l'honneur d'avoir accepté de présider ce jury de thèse et d'avoir accepté de juger ce travail. Je vous remercie de l'intérêt que vous avez porté à ce travail, ainsi que pour votre écoute et votre disponibilité tout au long de mon internat. Soyez assurée de ma reconnaissance et de mon plus profond respect.

Au jury,

**Madame la Professeur, Myriam Labalette**

Vous me faites l'honneur d'avoir accepté de participer à ce jury et d'apporter votre regard expérimenté sur ce travail, je vous en suis très reconnaissant. Je vous remercie de m'avoir encadré dans votre institut au cours de deux stages d'internat. Vos conseils et votre soutien a été très précieux.

**Monsieur le Docteur, David Beauvais**

Vous me faites l'honneur d'avoir accepté d'évaluer cette thèse et je vous en remercie. Soyez assuré de ma considération.

À mes directrices de thèse,

**Madame la Docteur, Pauline Varlet et à Madame la Docteur, Alix Vaissié**

Vous m'avez fait l'honneur de me proposer de réaliser une thèse sous votre direction conjointe. Je vous remercie toute les deux pour votre grande implication dans ce travail, votre soutien et votre disponibilité.

À toutes les personnes croisées à Clermont-Ferrand au début de mes études. Pour tous les amis de la fac : Nastia, Tiphaine, Maxime, Claire, Vincent, Tessie, Mélissa. Merci pour tous les moments partagés ensemble et pour ces années de fac qui resteront parmi les plus belles.

A Thomas et Victor-Alexandre pour avoir toujours été là, d'abord au cours de ces cinq ans d'études et encore maintenant même si nos trajectoires respectives entre Paris, Roanne et Lille nous éloignent. Merci aux Berthom pour nous avoir si souvent rassemblé.

A Valentin, pour avoir traversé la PACES ensemble puis s'être retrouvé à partir de la 2<sup>e</sup> année.

Aux amis connus avant la fac et qui le sont toujours même avec l'éloignement, et notamment à Arthur et Clément.

Merci à l'équipe de la pharmacie de la Bégude-de-Mazenc et aux docteurs Christian et Guillaume Fabre pour m'avoir permis de travailler en officine. J'ai choisi une autre voie mais ces quelques mois furent très enrichissants.

Merci à toutes les personnes connues à Lille. Mention spéciale à mes anciens colocataires Adeline, Paul et Anne pour avoir été mes premiers contacts lillois. Pour Thomas, Sebastian et Estelle, mes colocataires actuels, également merci.

Merci à l'ensemble des techniciens, internes et biologistes, croisés au fur et à mesure des stages et avec lesquels mes rapports furent aussi divers qu'enrichissant. Merci à Maxime de m'avoir éveillé d'abord à l'immunologie puis à l'expérience associative. Tous tes conseils auront été très précieux. Merci à l'équipe, techniciens et biologistes, du laboratoire d'hématologie du CH de Valenciennes.

Merci à toute l'équipe du laboratoire d'immunologie du CHU de Lille, aux techniciennes des secteurs cellulaires et humorales pour leur expérience, et à tous les biologistes dont la porte est toujours ouverte. A mes co-internes actuels, Clément, Céline, Quentin, Mathieu et Pauline pour tous les moments partagés ensemble, les cafés, les validations.

Bien évidemment, merci aux co-internes de ma promotion. Merci à Malo, Camille, Marie, Claire pour votre avoir partagés votre expérience lors du stage de bactériologie. Merci à Lucie et Caroline au PTI de biochimie, et à Victoria et KJ pour m'avoir formé au prélèvement de myélogrammes.

Merci à tous les internes qui seront devenus avec les années de véritables amis, et qui sont trop nombreux pour être cités, et merci à Quentin pour ces 5 (!) stages passés ensemble et qui vont bientôt se terminer. Si je suis ravi d'être venu à Lille c'est aussi grâce à vous tous.

Merci à Mathilde d'être là tous les jours et de m'avoir apporté ton soutien pendant cette période de travail qui n'était pas toujours facile.

A ma grande famille, trop nombreuse pour être citée entièrement. Un grand merci à sœurs et mon frère : merci à Marie-Noëlle, Camille, François et Annette. Merci à mes parents sans qui rien de tout ça n'aurait été possible.

## Abréviations

**7-AAD** : 7-aminoactinomycin D

**AICD** : Activation-Induced Cell Death

**ADN** : Acide Desoxyribo Nucléique

**AMM** : Autorisation de Mise sur le Marché

**ANSM** : Agence Nationale de Sûreté du Médicament

**Bcl-XL** : B cell Lymphome Extra Large

**BCMA** : B-Cell Maturation Antigen

**CAR** : Chimeric Antigen Receptor

**CCR7** : C-C chemokine receptor type 7

**CD** : Cluster de Différenciation

**CE** : Communauté Européenne

**CFSE** : Carboxyfluorescein succinimidyl ester

**CM** : Centrale Mémoire

**CMF** : Cytométrie en Flux

**CMH** : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

**CMN** : Cellule Mononucléé

**CPA** : Cellule Présentatrice de l'Antigène

**CSH** : Cellule Souche Hématopoïétique

**CXCR** : C-X-C chemokine Receptor

**EBMT** : European society for Blood and Marrow Transplantation

**Eff** : Effecteur

**EGFR** : Epidermal Growth Factor Receptor

**ELISA** : Enzyme-linked immunosorbent assay

**ELISPOT** : enzyme-linked immunospot

**EM** : Effecteur Mémoire

**EMA** : European Medicines Agency

**FACT** : Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy

**FDA** : Food and Drug Administration

**GvHD** : Graft versus Host Disease

**HLA** : Human Leukocyte Antigen

**IFN $\gamma$**  : Interféron Gamma

**IL** : Interleukine

**ISCT** : International Society for Cell and Gene Therapy

**JACIE** : Join Accreditation Committee os ISCT-Europe and EBMT

**LAG3** : Lymphocyte Activation Gene 3

**LAL** : Leucémie Aigüe Lymphoblastique

**LLC** : Leucémie Lymphoïde Chronique

**LNH** : Lymphome Non Hodgkinien

**MAP** : Mitogen Activated Protein

**MRD** : Minimal Residual Disease

**MTI** : Médicament de Thérapie Innovante

**mTOR** : mechanistic Target Of Rapamycine

**NfκB** : Nuclear Factor κ B

**NK** : Natural Killer

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**PD-1** : Program cell Death protein

**PDGF** : Platelet Derived Growth Factor

**PS** : Phosphatidyl Sérine

**PTC** : Préparation de Thérapie Cellulaire

**RCV** : Replication Competent Viruses

**ScFv** : Single Chain Variable Fragment

**SCM** : Souche Central Mémoire

**TCR** : T-Cell Receptor

**TGFβ** : Tumor Growth Factor

**TIM-3** : T-Cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3

**VCN** : Vector Copy Number

**VIH** : Virus de l'Immunodéficience Humaine

**VH** : Variable Heavy

**VL** : Variable Legere



# SOMMAIRE

Sommaire .....	19
Index des illustrations .....	21
Index des Tableaux .....	23
Introduction.....	25
Généralités et perspectives sur les cellules CAR-T .....	29
I. Rappel sur les lymphocytes T .....	29
1. Etape d'activation .....	29
2. Système immunitaire et cancer .....	30
II. Structure d'un CAR.....	31
III. Ingénierie des CAR .....	33
1. Générations de CAR et perspectives .....	33
2. Stratégies d'intégration du transgène .....	36
Mise en place d'une production .....	39
I. Production académique de cellules CAR-T autologues.....	39
1. Comparaison d'une production académique à une production industrielle..	39
2. Les étapes d'une production de cellules CAR-T .....	41
i. Aphérèse.....	42
ii. Production académique avec Miltenyi .....	43
II. Contrôles qualité .....	46
1. Libération du lot.....	46
i. Sécurité microbiologique .....	46
ii. Caractérisation du produit cellulaire .....	50
iii. Capacités fonctionnelles des cellules CAR-T.....	56
2. Contrôles recommandés .....	57
i. Evaluation de la cytotoxicité des cellules CAR-T <i>in vitro</i> .....	57
ii. Caractériser le profil cytokinique des cellules CAR-T après activation.....	62
iii. Caractérisation du produit cellulaire en CMF .....	62

III.	Exemples déjà existant.....	69
1.	Production détaillée par une équipe espagnole.....	69
i.	Production.....	69
ii.	Contrôles mis en œuvre.....	70
2.	Production détaillée par une équipe américaine.....	75
i.	Production.....	76
ii.	Contrôles réalisés.....	77
iii.	Résultats cliniques.....	80
3.	Comparaison des productions espagnole et américaine.....	80
IV.	Transposition au CHU de Lille.....	83
1.	Expérience lilloise en thérapie cellulaire.....	83
i.	Expérience en service clinique.....	83
ii.	Expertise en contrôles microbiologiques de thérapies cellulaires.....	83
iii.	Expertise au laboratoire de virologie.....	84
iv.	Expérience au laboratoire d'immunologie.....	85
2.	Applicabilité au CHU de Lille et mise en œuvre.....	88
i.	Réglementation.....	88
ii.	Contraintes techniques.....	89
iii.	Contrôles réalisables.....	90
iv.	Perspectives à long terme.....	93
	Références bibliographiques.....	95

## INDEX DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Les différentes étapes de la production de cellules CAR-T. ....	27
Figure 2 : Les trois signaux d'activation du lymphocyte T, .....	30
Figure 3 : Structure d'un récepteur chimérique à l'antigène de 2 <sup>nd</sup> e génération.....	32
Figure 4 : Différentes générations de CAR.....	33
Figure 5 : Comparaison des deux constructions de cellules CAR-T industrielles.....	34
Figure 6 : Les différents modèles de Smart T cells,.....	36
Figure 7 Deux méthodes de transfection appliquées aux cellules CAR-T. ....	37
Figure 8 CliniMACS Prodigy ®, .....	43
Figure 9 Protocole de fabrication des cellules CAR-T avec l'utilisation du CliniMACS Prodigy ®.....	45
Figure 10 Chronologie des différents contrôles à mettre en place selon Miltenyi ®.	49
Figure 11 Différentes techniques de marquages du CAR .....	51
Figure 12 : Exemple de marquage en CMF d'une poche de cellules CAR-T industrielles.....	53
Figure 13 Chronologie des différents contrôles à mettre en place selon Miltenyi.....	54
Figure 14 Schématisation du fonctionnement d'un ELISPOT.....	56
Figure 15 : Chronologie des différents contrôles à mettre en place selon Miltenyi...	57
Figure 16 Schéma du protocole d'évaluation de la cytotoxicité par relargage de chrome 51. ....	60
Figure 17 Différents marqueurs d'apoptose pouvant être ciblés en CMF : .....	61
Figure 18 Décalage de l'intensité de fluorescence du CFSE selon la division cellulaire. ....	64
Figure 19 Marqueurs phénotypiques des sous-types lymphocytaires. ....	65
Figure 20 Différences entre les sous-types lymphocytaires T entre les CMN de patients et les CMN de donneurs sains.....	65
Figure 21 Différents capacités des lymphocytes T CD4+ ou CD8+.....	67
Figure 22 Résultats de cytotoxicité obtenus avec les cellules ARI-0001 .....	71
Figure 23 Expansion des ARI-0001 au sein du CliniMACS Prodigy ® .....	72
Figure 24 Caractérisation des lymphocytes T entre CD4+ et CD8+.....	73
Figure 25 Caractérisation des sous-populations des cellules ARI-0001.....	73
Figure 26 Prolifération in vitro des cellules ARI-0001.....	74
Figure 27 Dosage des cytokines par ELISA dans le surnageant.....	74

Figure 28 : Marquage de l'IFN $\gamma$ intracellulaire des cellules CAR-T obtenues pour un patient, après différentes co-incubation.....	78
Figure 29 : Phénotypes des sous-populations T entre le début et la fin de la culture. .....	80
Figure 30 : Résultats cliniques avec courbe d'estimation de Kaplan-Meier.....	80
Figure 31 : Proportion (%) des différentes spécialités réinjectées aux patients du CHU de Lille.....	83
Figure 32 : Exemple de résultat obtenu lors du suivi de trois patients pendant le développement de la méthode. ....	85
Figure 33 : Viabilité des cellules CAR-T .....	86
Figure 34 Composition lymphocytaire des poches de cellules CAR-T .....	87
Figure 35 Exemple de marquage obtenu avec la technique développée au CHU de Lille .....	88
Figure 36 Contrôles intermédiaires de la production des cellules CAR-T.....	91
Figure 37 Contrôles finaux de la production des cellules CAR-T.....	92
Figure 38 Les différents acteurs impliqués dans la production académique de cellules CAR-T .....	92

## INDEX DES TABLEAUX

Tableau I : Récapitulatif des caractéristiques des deux modes de production. ....	41
Tableau II Récapitulatif des contrôles microbiologiques .....	50
Tableau III : Récapitulatif de la caractérisation obligatoire du produit cellulaire.....	54
Tableau IV Présentation des deux panels d'anticorps proposés par Miltenyi. ....	55
Tableau V Résumé des contrôles existant pour le contrôle de la cytotoxicité des cellules CAR-T.....	58
Tableau VI : Résumé des caractérisations des cellules CAR-T recommandées lors de la production. ....	63
Tableau VII Résumé des étapes la production de cellules CAR-T par l'équipe espagnole.....	70
Tableau VIII Spécification et critères d'acceptation des cellules CAR-T ARI-0001 produites par l'équipe de l'Hospital Clinic de Barcelona. ....	75
Tableau IX : Résumé de la production américaine .....	76
Tableau X : Contrôle du relargage de Chrome 51 par les cellules cibles lors de leur co-incubation avec les cellules CAR-T bispécifiques.....	78
Tableau XI : Données de la production des cellules CAR-T bi-spécifiques anti-CD19/CD20 .....	79
Tableau XII Comparaison des résultats obtenus lors des deux productions, espagnole et américaine. ....	81
Tableau XIII : Difficultés de mise en place et réponses pouvant y être apportées....	90



## INTRODUCTION

Les lymphocytes T ont un rôle important dans la réponse anti-cancéreuse. Ils reconnaissent par leur TCR les antigènes tumoraux apprêtés sur le CMH des cellules présentatrices de l'antigène, conditionnant ainsi la reconnaissance de la cellule tumorale. Malheureusement, ce système de réponse anti-tumorale n'est pas parfait puisqu'il existe toujours un échappement des tumeurs au système immunitaire.

Avec les progrès de la génétique, les lymphocytes T ont pu être modifiés pour améliorer leurs réponses anti-tumorales. Les cellules CAR-T (Chimeric-Antigen-Receptor), ou *CAR T-cells*, représentent depuis leur découverte un avenir de l'immunothérapie anti-cancéreuse. Leur première mention dans la littérature remonte à 1987 par l'équipe de Kuwana *et al.*(1), avec uniquement un récepteur extracellulaire composé d'une simple chaîne de fragment variable. Le CAR a été amélioré en 1993 (2), par le couplage de la partie variable avec les sous-unités du TCR intracellulaire médiant le signal cellulaire. C'est cet assemblage d'une immunoglobuline de lymphocyte B et de sous-parties du TCR qui donne le terme « chimérique » au gène, puis au récepteur.

Entre 2017 et 2018, deux spécialités sont rapidement approuvées aux États-Unis par la FDA (*Food and Drug Administration*). Il s'agit du tisagenlecleucel et de l'axicabtagen ciloleucel, respectivement commercialisés sous les noms de Kymriah® et Yescarta® par Novartis et Gilead/Kite pharma, deux entreprises pharmaceutiques (3,4). Ces traitements ont pu recevoir, pour le Kymriah®, une AMM en 3<sup>e</sup> ligne de traitement du lymphome B diffus à grandes cellules et dans la LAL B, et pour le Yescarta®, une AMM dans le traitement de 3<sup>e</sup> ligne du DLBCL et du lymphome médiastinal primitif à grandes cellules B. Les récents essais cliniques (ELIANA, JULIET, ZUMA) ont montré des résultats exceptionnels dans le traitement de ces hémopathies malignes à cellules B (5–8).

Les cellules CAR-T sont pour l'instant indiquées dans les hémopathies lymphoïdes B, mais il y a de plus en plus d'essais cliniques dans d'autres pathologies hématologiques comme le myélome. En effet, l'idecabtagene vicleucel Abecma® (ciblant le BCMA), a obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) par les instances américaines dans le traitement du myélome multiple réfractaire en 2021 à la suite des études KarMMA (9). Elles sont également à l'étude dans le traitement d'autres maladies comme les tumeurs solides (10,11), les infections virales (12), ou encore les maladies

auto-immunes (13). L'utilisation de cellules CAR-T ciblant des tumeurs solides reste limitée car plus complexe. Les principaux obstacles sont de mettre en évidence des antigènes spécifiques des tumeurs exprimés à la surface des cellules tumorales et d'arriver à obtenir une migration suffisante des cellules CAR-T vers la tumeur où il existe un micro environnement tumoral immunosuppresseur défavorable à la survie des cellules CAR-T (14,15). Pour essayer de pallier à ce problème, des tentatives de productions de cellules infiltrant plus facilement les tumeurs solides ont eu lieu, ce qui a donné des productions de cellules CAR-NK (16) ou de cellules CAR-macrophages (17). Des stratégies permettant d'influencer favorablement le micro-environnement tumoral sont également étudiées (18).

En France, les lymphocytes T génétiquement modifiés ont le statut de Médicaments de Thérapie Innovante MTI, définis dans le règlement européen 1394/2007 CE. Dans la mesure où l'effet thérapeutique est le résultat de l'insertion d'une séquence d'acide désoxyribonucléique ADN recombinant, les cellules CAR-T sont également considérées comme des médicaments de thérapie génique. Les exigences réglementaires de ces thérapies sont régies par l'*European Medicines Agency* (EMA) au sein de l'Union Européenne ainsi que par les autorités nationales des états membres, soit l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) en France. En ce qui concerne les États-Unis, c'est la *Food and Drug Administration* (FDA) qui régit ces traitements.

Les procédés de fabrication des cellules comportent de multiples étapes présentées figure 1. La première étape consiste à l'aphérèse des lymphocytes du patient. Les étapes suivantes consistent à sélectionner les lymphocytes T CD3+, à les activer, puis à les transfecter avec un transgène porté par un vecteur. Lorsque le transgène est inséré dans le génome des lymphocytes T, ils synthétisent alors un récepteur chimérique reconnaissant un antigène cible exprimé sur la membrane cellulaire. Les cellules sont ensuite mises en culture, où a lieu l'expansion jusqu'à atteindre un nombre suffisant de cellules CAR-T. Leur capacité à reconnaître cette cible via le CAR provoquera l'apoptose de la cellule cible pathologique.

Aujourd'hui, les seules cellules CAR-T autorisées par les agences et remboursées sont des cellules CAR-T autologues, c'est à dire que les lymphocytes T modifiés proviennent du patient lui-même, et ils seront réinjectés après intégration et expression du récepteur chimérique à la surface des lymphocytes T. Ces approches autologues

peuvent être limitées par les traitements préalablement reçus ou lorsque le patient est fortement lymphopénique.

Ainsi, des approches allogéniques sont expérimentées en clinique (19,20). Dans ce cas de figure, les cellules allogéniques proviennent de donneurs volontaires sains non HLA identique avec le patient. Pour l'instant, ces approches n'ont pas montré autant d'efficacité que les produits cellulaires autologues (21), mais l'intérêt serait de proposer des cellules CAR-T plus rapidement au patient, à partir de banques provenant de donneurs sains, sans limitation par les échecs d'aphérèse parfois observés dans les approches autologues.

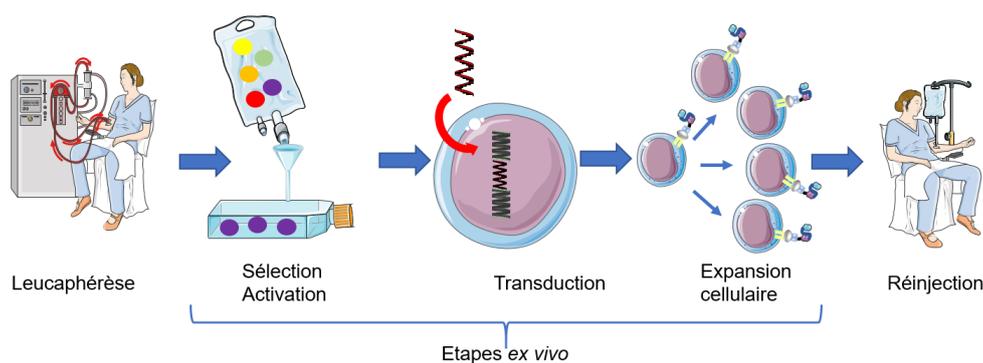


Figure 1 : Les différentes étapes de la production de cellules CAR-T.

*Le produit de leucaphérèse subit une sélection positive des lymphocytes T CD3+ CD4/CD8, qui sont transduits à l'aide d'un vecteur viral. S'en suit une phase d'expansion des lymphocytes T transduits, avant réinjection au patient.*

Au CHU de Lille, un projet de production académique de cellules CAR-T est en cours de développement. Ce travail de thèse a pour objectif de définir les contrôles qualité nécessaires à la future production académique de cellules CAR-T autologues au sein du CHU de Lille, réalisée à l'aide d'un semi automate et d'un vecteur viral.

Après avoir présenté l'ensemble du processus de fabrication d'un traitement par cellules CAR-T, nous allons détailler des contrôles qualités obligatoires et recommandés à mettre en place dans le cadre d'une production académique. En se basant sur des retours d'expérience d'autres équipes, nous allons identifier l'ensemble des procédés à mettre en œuvre localement pour débiter une activité de production académique.



# GENERALITES ET PERSPECTIVES SUR LES CELLULES CAR-T

## I. Rappel sur les lymphocytes T

### 1. Etape d'activation

Le bon déroulement de la réponse immunitaire implique une activation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T effecteurs et mémoires après trois signaux successifs (22).

Dans les organes lymphoïdes secondaires, un antigène est présenté par une molécule du *Human Leucocyte Antigen* (HLA) également appelé Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) à la surface d'une cellule présentatrice de l'antigène (CPA), comme une cellule dendritique par exemple, tel que présenté sur la figure 2. Lorsque cet antigène est reconnu par le *T-Cell Receptor* (TCR) du lymphocyte, le lymphocyte T naïf enclenche son activation via le complexe TCR/CD3 (signal 1).

Les CPA permettent parallèlement au signal 1 la costimulation (signal 2) par le cluster de différenciation (CD) CD80 et le CD86 avec leur récepteur (CD28) exprimé sur la membrane du lymphocyte T. Sans le second signal médié par le CD28, le lymphocyte T ne peut pas s'activer entièrement et restera en anergie (23). Le signal de stimulation et le signal de costimulation permettent d'activer trois voies de signalisation : la voie calcium-calcineurine, la voie MAP kinase, et la voie NFκB. Ces trois voies de signalisation vont déclencher l'expression de l'interleukine 2 (IL-2), du CD25 (récepteur de l'IL2) et du CD154 par le lymphocyte T.

La CPA régule la polarisation des lymphocytes T activés à travers les cytokines qu'elle sécrète. L'IL-2 activera la protéine mTOR par l'intermédiaire de son récepteur, qui déclenche la prolifération des lymphocytes T activés. Le système est auto-entraîné, les lymphocytes T sécrétant l'IL-2 leur permettant de proliférer. La prolifération conduit à un grand nombre de lymphocytes T activés dirigés contre l'antigène, qui était initialement reconnu par un seul lymphocyte T naïf.

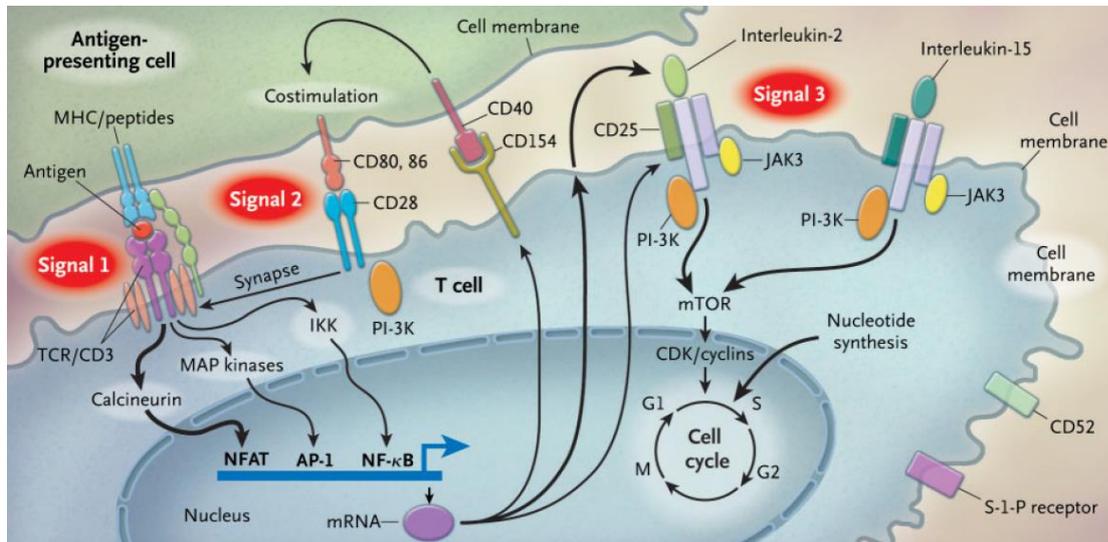


Figure 2 : Les trois signaux d'activation du lymphocyte T,

Le signal 1 permet d'activer le lymphocyte T via le TCR. Le signal 2 de costimulation est une interaction entre la CPA et le lymphocyte T, puis le signal 3 est un auto-entraînement du système via la sécrétion de cytokines, aboutissant à la prolifération du lymphocyte T. Schéma d'après PF Halloran, N Engl J Med, 2004

Selon la polarisation prise par le lymphocyte T, il sécrètera différentes cytokines lors de son activation au contact de son antigène cible. Au contact d'un antigène tumoral, le lymphocyte T aura une activité cytotoxique sur la cellule porteuse de l'antigène.

## 2. Système immunitaire et cancer

### Réponse anti-tumorale

Le lymphocyte T activé par l'antigène tumoral pourra exercer une activité antitumorale. Au cours de cette phase, le système immunitaire contrôle le développement de la tumeur, voir parvient à l'éliminer. Le lymphocyte T cytotoxique va permettre la lyse des cellules tumorales, par le système perforine/granzyme tout d'abord. La perforine forme des pores dans la membrane de la cellule en se polymérisant, permettant l'entrée du granzyme, une sérine protéase, dans la cellule tumorale qui provoquera l'apoptose cellulaire (24).

Les lymphocytes T vont aussi sécréter de l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ). L'IFN $\gamma$  va inhiber la croissance des cellules tumorales en induisant l'arrêt de leur cycle cellulaire et le début de leur apoptose (25).

L'IFN $\gamma$  sécrété va activer les CPA qui augmenteront leur expression du CMH, et favoriseront la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes T cytotoxiques. Ainsi, la reconnaissance de l'antigène tumoral par les lymphocytes T sera favorisée (25,26).

## *Échappement au système immunitaire*

Au fur et à mesure du temps la tumeur initialement contrôlée va évoluer (27). Les cellules tumorales vont exprimer davantage d'inhibiteurs de l'apoptose (Bcl-XL, FLIP), des inhibiteurs de lymphocytes T (PD-L1, Fas ligand) et perdre l'expression des molécules du CMH. Le micro-environnement tumoral va être modifié avec la sécrétion de cytokine immunosuppressive (TGF $\beta$ , IL-10, PDGF) qui vont inhiber la survie et la prolifération des lymphocytes T.

L'échec du système immunitaire à éliminer les cellules mutées entraîne donc l'échappement de la tumeur. La survie de cellules tumorales est donc possible et elles vont croître sans restriction.

La réinjection de cellules CAR-T dirigées contre les antigènes tumoraux va théoriquement restaurer l'immunité anti-tumorale. Les lymphocytes T modifiés peuvent à nouveau reconnaître et lyser les cellules tumorales, et avoir une influence sur la restauration de l'immunité adaptative en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires.

## II. Structure d'un CAR

Le mode d'activation des lymphocytes T modifiés est différent de celui des lymphocytes standards. En effet, les CAR transduits ont été élaborés afin que le lymphocyte T soit activé par une autre voie que le TCR. La reconnaissance de l'antigène se fait via la partie variable de l'immunoglobuline transduite sans intervention du CMH. Ainsi, l'antigène ciblé par le *single chain variable fragment* (ScFv) n'a pas à être présenté par une molécule du CMH et n'a donc pas à être pris en charge par une CPA. C'est cette construction, associant une partie d'immunoglobuline de lymphocyte B et une sous unité du TCR de lymphocyte T, qui donne l'appellation « chimérique » au récepteur. Le signal 1 d'activation lymphocytaire est reproduit par le CAR, puis les signaux suivants s'enchaînent dans la cellule CAR-T sans le recours initial au TCR. En outre, la liaison CAR/antigène est plus forte que la liaison TCR/antigène. Le seul désavantage de cette liaison est la possibilité de cibler uniquement des antigènes exprimés en surface de la cellule tumorale.

La construction globale (figure 3) d'un récepteur chimérique à l'antigène comprend différents domaines, de la partie extracellulaire à la partie intracellulaire (28):

- Le domaine ScFv, cible spécifiquement l'antigène d'intérêt. Il est composé des chaînes variables lourde et légère (*Variable Heavy* VH et *Variable Legere* VL)

relié par une chaîne d'acides aminés. De lui dépend l'affinité pour la cellule tumorale et l'immunogénicité du CAR.

- Le domaine charnière, qui fournit la flexibilité et détermine la longueur du CAR. Il favorise le ciblage de l'antigène par le CAR.
- Le domaine transmembranaire, qui stabilise la construction.
- Le domaine de costimulation, qui optimise l'activation, la survie et la fonctionnalité *in vivo* des cellules CAR-T. Certaines propriétés des cellules dépendront de ce domaine, telles que la persistance chez le patient ou la cytotoxicité sur les cellules cibles.
- Le domaine intracellulaire CD3 $\zeta$ , qui permet l'activation puis la prolifération des lymphocytes T, et qui participe à la survie et à la persistance des lymphocytes T.

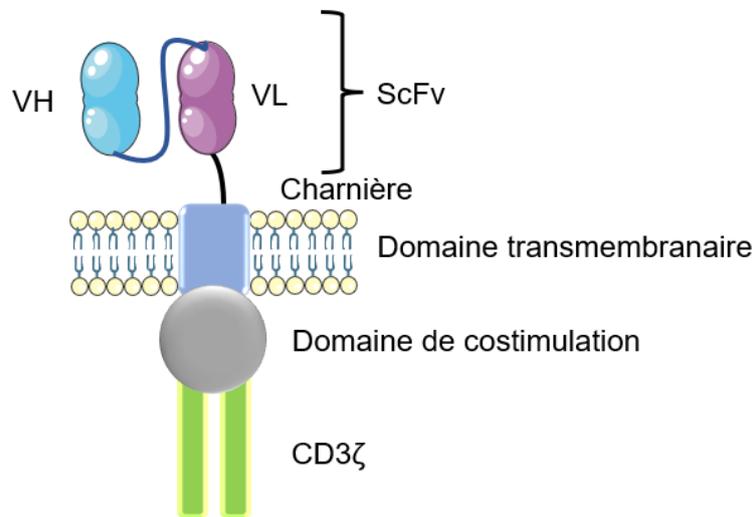


Figure 3 : Structure d'un récepteur chimérique à l'antigène de 2<sup>nd</sup>e génération.

Le domaine ScFv permet de cibler l'antigène par les chaînes VH et VL qui le compose et permet l'activation de la cellule CAR-T en transmettant le signal jusqu'aux domaines de costimulation et le CD3 $\zeta$ .

Cette construction globale a été améliorée au fil du temps et des recherches, et on retrouve aujourd'hui plusieurs générations de cellules CAR-T.

### III. Ingénierie des CAR

#### 1. Générations de CAR et perspectives

Les cellules CAR-T sont des thérapies innovantes en perpétuelle évolution, afin d'optimiser les effets thérapeutiques en diminuant les effets indésirables. De nouvelles cibles n'étant idéalement exprimées que par des cellules pathologiques sont privilégiées. Ainsi, les effets indésirables liés à la destruction de cellules non pathologiques porteuses de l'antigène cible, (effet « *on target / off tumour* ») seront limités. Les autres axes de développement des cellules CAR-T consistent à :

- Améliorer la prolifération et la persistance *in vivo*
- Diminuer l'épuisement
- Améliorer la cytotoxicité
- Améliorer l'activation des lymphocytes modifiés
- Améliorer la migration vers la tumeur

De nouveaux CAR ne ciblant plus des récepteurs tumoraux mais des signaux immunosuppresseurs peuvent aussi être envisagés, leur permettant ainsi d'induire un signal activateur de lymphocyte T (13).

En suivant ces pistes d'améliorations, différentes générations de cellules CAR-T ont été développées ces dernières années, présentées sur la figure 4.

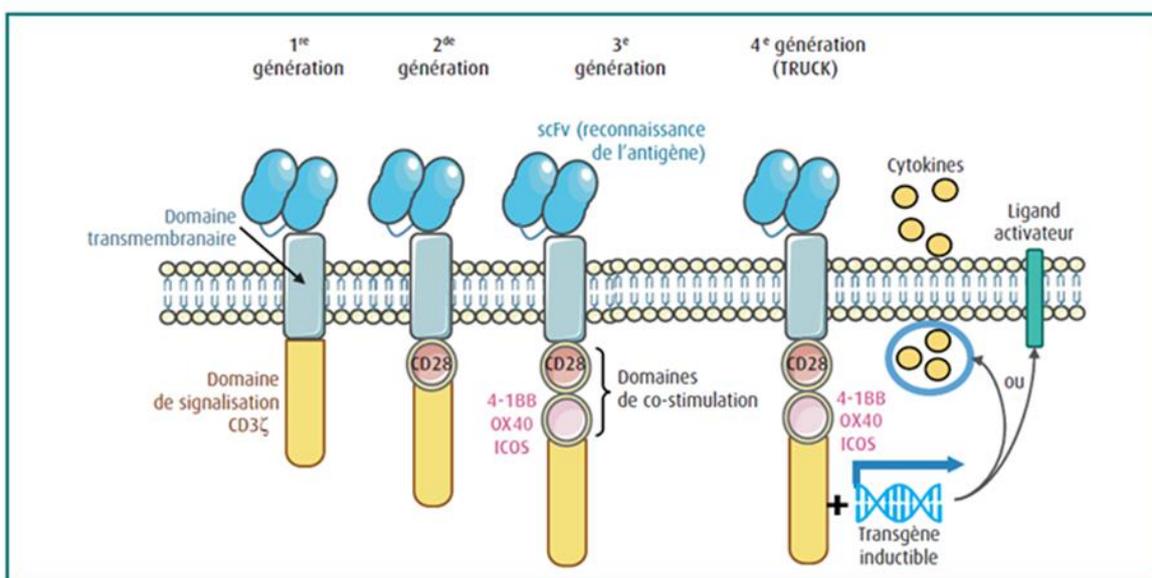


Figure 4 : Différentes générations de CAR

La première génération ne montrant pas suffisamment d'activité *in vivo*, un domaine de costimulation a été introduit dans la 2<sup>e</sup> génération, puis un deuxième dans les cellules CAR-T de 3<sup>e</sup> génération. La 4<sup>e</sup> génération induit l'expression de corécepteurs ou la sécrétion de cytokines. D'après MT Rubio et al., (35)

La **première génération** de cellules CAR-T comprend la partie variable d'un anticorps spécifique (ScFv), reliée au domaine transmembranaire et aux domaines de signalisation intracellulaire du CD3 $\zeta$  (2,29). Testée dans des modèles animaux, cette construction de CAR n'avait pas montré une efficacité suffisante (30) due à la trop faible sécrétion d'IL-2 par les cellules CAR-T. Devant l'efficacité modérée de cette construction, d'autres modèles de récepteurs chimériques ont été développés. Ces modèles ont au fur et à mesure intégré des domaines de costimulation dans la structure du récepteur, permettant ainsi une meilleure activation. La survie et la fonctionnalité des lymphocytes T modifiés en ont été grandement améliorées.

Ainsi, la **deuxième génération** de cellules CAR-T conserve la construction initiale de la première génération, mais en ajoutant au domaine CD3 $\zeta$  un domaine de costimulation, le plus souvent 4-1BB ou CD28, chacune de ces constructions ayant leur spécificité (31,32). En effet, on observe une moindre cytotoxicité mais une meilleure longévité avec la construction comprenant 4-1BB. Le lymphocyte exprimant le CAR comprenant CD28 a un meilleur effet cytotoxique. La cytotoxicité et le métabolisme des cellules CAR-T sont donc influencés par la construction du CAR. Il a même été montré que la conformation de la zone charnière entre le domaine transmembranaire et le domaine ScFv est susceptible d'influencer l'activité, en jouant sur la distance entre la cellule cible et la cellule CAR-T (33). Ainsi, les deux spécialités de cellules CAR-T industrielles n'intègrent pas les mêmes domaines de costimulation et leurs propriétés sont différentes, comme présenté sur la figure 5.

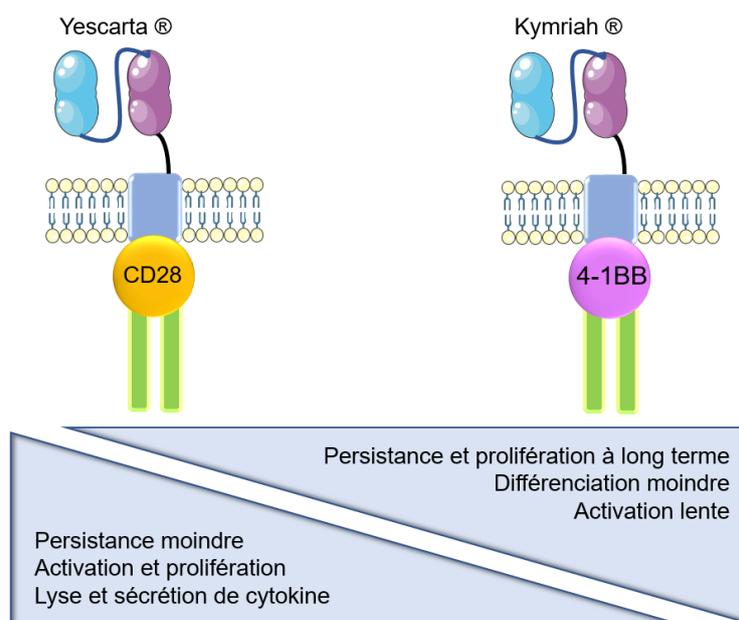


Figure 5 : Comparaison des deux constructions de cellules CAR-T industrielles

Les propriétés des deux spécialités industrielles changent selon le domaine de costimulation incorporé.

La **troisième génération** de cellules CAR-T inclut un second domaine de costimulation appartenant à la famille des TNF récepteurs (le plus souvent 4-1BB ou OX40). En théorie, cette nouvelle construction permettrait d'éviter l'anergie cellulaire et de retarder l'apoptose après l'activation cellulaire. Ces cellules devraient donc montrer une plus grande expansion cellulaire (34). Cependant, en pratique, il n'a pas été montré à ce jour d'avantage *in vivo* des constructions de 3<sup>e</sup> génération par rapport à la deuxième génération.

Récemment, une **quatrième génération** de cellules CAR-T a été conçu pour induire l'expression de corécepteurs ou la sécrétion de cytokines lors de l'activation du CAR. L'activation du CAR va en effet provoquer l'expression d'un transgène, qui aboutira à l'expression de ces molécules.

Le futur des cellules CAR-T est aussi représenté par les smart T-cells (figure 6). L'activation et la sélectivité des cellules seraient mieux contrôler, limitant ainsi la toxicité des traitements et l'échappement tumoral.

Il est en effet possible d'améliorer leur sélectivité en combinant la reconnaissance de deux antigènes différents dans deux constructions entières de CAR appelées dual-CAR ou multi-CAR (36). Cette double reconnaissance peut aussi être possible en assemblant 2 paires de VH et VL, dans une construction appelée CAR en tandem. Cette construction a été expérimentée dans le cancer du sein avec les récepteurs HER-2 et MUC-1 (37), pour mieux cibler les cellules tumorales. Il est aussi possible de séparer les domaines intracellulaires dans deux CAR ayant une spécificité différente, rendant obligatoire la reconnaissance de deux antigènes pour l'activation du lymphocyte et permettant un effet « *off tumor* » moindre (dual CAR conditionnel). Sur le même exemple, les CAR conditionnels SynNotch contrôlent l'activation du lymphocyte à la reconnaissance d'un antigène par le récepteur SynNotch (38).

Une approche visant à limiter la toxicité consiste à la transduction simultanée de deux CAR différents (un activateur et un inhibiteur) dans le lymphocyte (iCAR-T cells). Un CAR reconnaît l'antigène tumoral et active le lymphocyte T de façon conventionnel, tandis que l'autre CAR est spécifique d'un antigène de cellule saine. Si le CAR inhibiteur est activé par la reconnaissance d'un antigène de cellule saine, alors la cellule CAR-T sera inhibée en dépit de la reconnaissance de l'antigène tumoral par l'autre CAR. Ce modèle limite donc l'effet « *on target-off tumor* » en rendant la cellule CAR-T plus spécifique des cellules tumorales.

Dans le modèle *split-CAR* ou *ON-switch*, le domaine de signalisation n'est pas directement connecté au domaine de reconnaissance. C'est l'intervention d'une autre molécule qui permettra d'assembler le CAR et de le rendre fonctionnel (39). A l'inverse, le modèle de CAR « *suicide switch* » permet la destruction sélective du CAR en présence d'une molécule donnée, comme une caspase inductible par un agent dimérisant

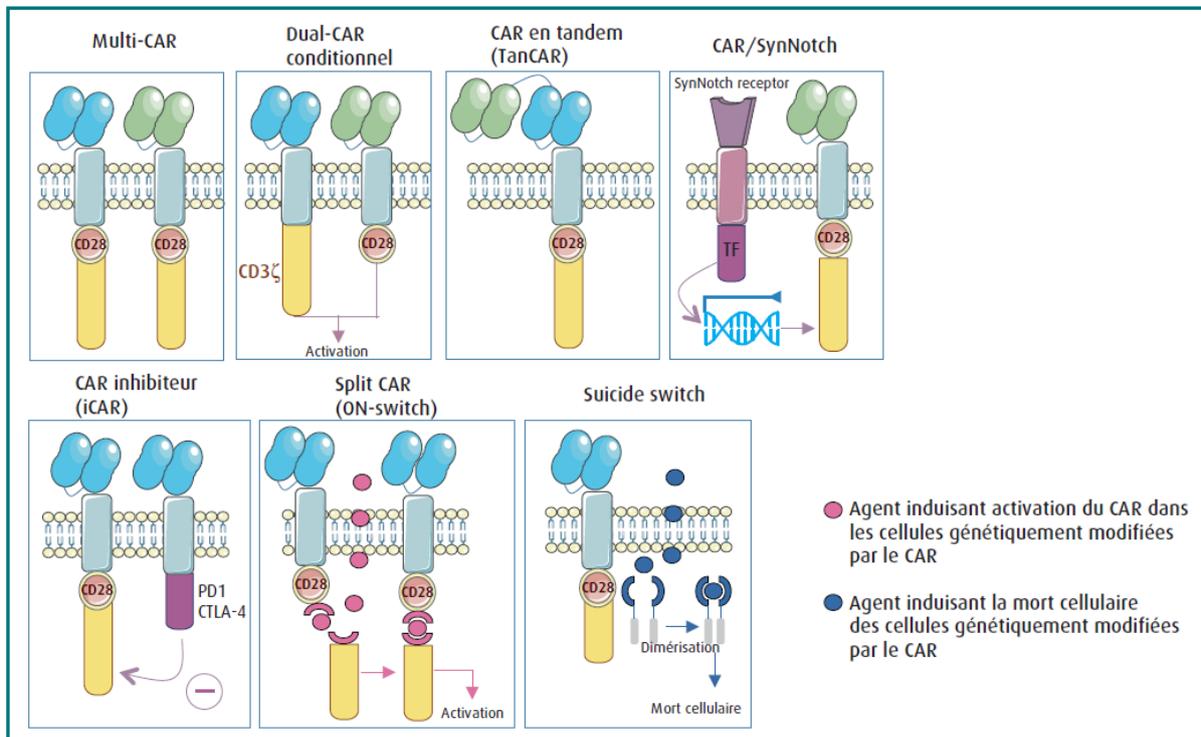


Figure 6 : Les différents modèles de Smart T cells,

D'après MT Rubio et al., (35)

## 2. Stratégies d'intégration du transgène

De nos jours, deux méthodes (figure 7) sont principalement utilisées pour permettre l'insertion d'un nouveau gène dans le génome de la cellule.

- La transduction virale, où un vecteur viral à ARN ou à ADN qui contient le gène d'intérêt (CAR) pénètre dans le cytoplasme de la cellule puis dans le noyau où il est intégré dans le génome du lymphocyte. La machinerie cellulaire préexistante dans le lymphocyte transcrit puis traduira le gène du CAR pour l'exprimer à la membrane.
- La transfection par électroporation, où un courant électrique va augmenter la perméabilité cellulaire et permettre l'entrée du transgène dans la cellule. Les vecteurs non viraux (*PiggyBac* (40) par exemple) vont alors intégrer l'ADN du gène codant le CAR au génome du lymphocyte.

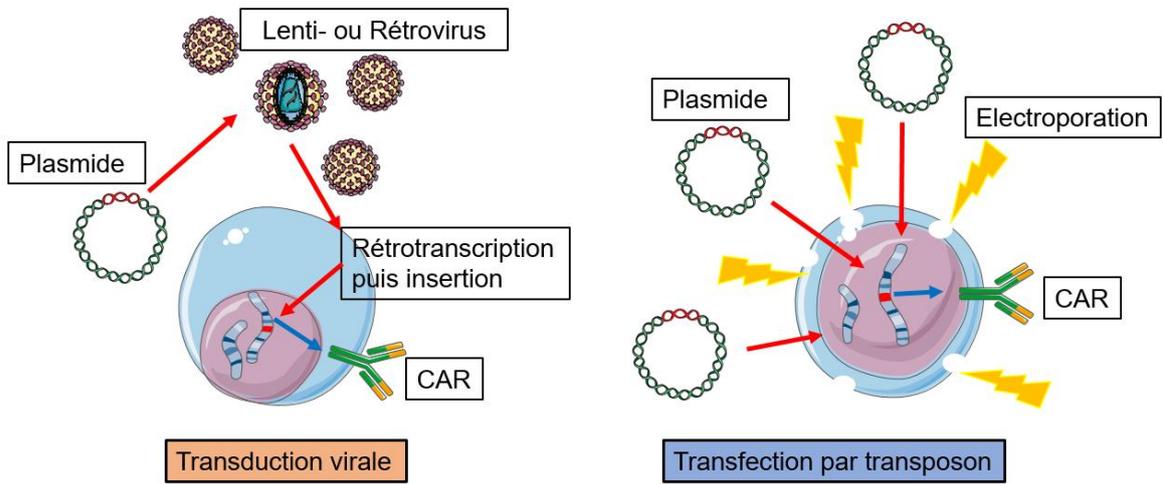


Figure 7 Deux méthodes de transfection appliquées aux cellules CAR-T.

La transduction (à gauche) utilisant un vecteur viral à ARN (lentivirus ou rétrovirus), tandis que la transfection par transposon (à droite) implique la hausse de la perméabilité dans la cellule, permettant aux plasmides de s'insérer dans le génome.



# MISE EN PLACE D'UNE PRODUCTION

## I. Production académique de cellules CAR-T autologues

La production académique de cellules génétiquement modifiées est effectuée au sein d'infrastructures publiques respectant les bonnes pratiques de fabrication (BPF), décrites dans les référentiels français et européens. Ces BPF concernent l'ensemble de la production (des infrastructures à la main d'œuvre en passant par les contrôles qualité), et garantissent la bonne qualité et l'asepsie des conditions de production des cellules CAR T.

### 1. Comparaison d'une production académique à une production industrielle

#### *Coût des produits*

En septembre 2021, le coût d'un traitement par cellules CAR-T varie selon la spécialité utilisée. En France, le coût du Yescarta® est de 327 000 euros hors taxe, le coût du Kymriah® de 298 000 euros hors taxe et le coût de l'Abecma® est de 360 000 euros hors taxe.

L'équipe de Ran et al., (41) s'est intéressée aux coûts d'une production académique de cellules CAR-T selon plusieurs scénarios. Dans les calculs étaient pris en compte l'ensemble de la production de la leucaphérèse jusqu'à la réinjection, en utilisant un système de production fermé et une transduction virale, ainsi que le coût des ressources humaines. Ils prenaient en compte la durée de vie du semi-automate, estimée entre 10 et 20 ans. Le coût d'une production est plus élevé la première année avec un investissement conséquent (achat d'automate, formation du personnel), mais il est amorti avec le temps. Le lancement d'une production académique avec la mise en place du matériel nécessaire implique donc une vision à long terme de la production.

Les scénarios envisagés sont les suivants :

- Le scénario d'une seule production par an était estimé à 540 000 euros, comprenant un seul automate et les coûts de fonctionnement annuels d'une salle propre.

- Le moins coûteux, à environ 51 000 euros par production, comportait une seule salle propre de production pour trois automates.
- Le plus plausible avec une salle propre de production et un automate fonctionnant en circuit fermé en continu (deux productions par mois) permettait un coût à 68 000 euros par production.

### *Durée d'une production*

Actuellement, les délais de productions d'une spécialité de cellules CAR-T industrielles varient de trois à cinq semaines. Dans notre cas, la production est prévue pour durer une dizaine de jours, variable selon la qualité du produit de leucaphérèse. La logistique est de plus beaucoup plus simple grâce à l'absence de transport sur des milliers de kilomètres comme cela est le cas pour les cellules CAR-T industrielles. La cryopréservation du produit cellulaire n'est donc théoriquement pas nécessaire dans notre cas.

### *Possibilités thérapeutiques*

Les intérêts d'une production académique sont multiples, et ils commencent par l'absence de restriction pour caractériser le produit cellulaire. La maîtrise de tout le processus de fabrication de l'aphérèse à la réinjection permet de caractériser le produit tout au long de la production afin de connaître précisément la composition de la poche de cellules CAR-T. Les industriels commercialisant les cellules CAR-T ne fournissent en effet qu'une seule information sur leur produit cellulaire, le pourcentage de lymphocytes CAR+ par rapport aux lymphocytes totaux avant la cryopréservation.

Deux spécialités de cellules CAR-T commercialisées ont la même cible : le CD19 exprimé à la surface des lymphocytes B tumoraux ou physiologiques. Ce choix de cible permet de nombreuses utilisations potentielles de ces traitements, puisque la majorité des cellules tumorales des syndromes lymphoprolifératifs B exprime le CD19. Le but d'une production académique n'est pas de concurrencer des industriels déjà installés sur le marché et qui fournissent des produits ayant déjà fait leurs preuves.

L'intérêt des productions académiques réside dans les indications potentielles des cellules CAR-T anti-CD19 non couvertes par l'AMM industrielle. En effet, les indications des AMM des spécialités industrielles mises sur le marché sont très restrictives et excluent beaucoup de patients souffrant d'hémopathies B CD19 positives de leurs indications. Des cellules CAR-T académiques pourraient être indiquées pour des patients habituellement exclus des indications des AMM

industrielles. Les possibilités thérapeutiques d'une production académique comprennent aussi la production de cellules CAR-T bispécifique (cellules CAR-T en tandem ou dual-CAR) destinées aux patients présentant des rechutes d'hémopathies CD19 négatives.

Enfin, à terme, l'intérêt d'une production académique de cellules CAR-T pourrait résider dans la production de cellules sans équivalent sur le marché. En effet, les hémopathies orphelines à incidence très faible (leucémie à basophiles, à cellules dendritiques plasmacytoïdes, ...) n'attirent que peu l'intérêt des industriels devant le manque de débouché de spécialités spécifiques mises sur le marché. Ainsi, les patients souffrant de ces pathologies n'ont que peu d'option thérapeutique et ces leucémies restent de mauvais pronostics. Une production académique de cellules CAR-T pourrait offrir une possibilité de traitement à ces patients.

Le récapitulatif des comparaisons des deux productions est résumé dans le tableau I.

*Tableau I : Récapitulatif des caractéristiques des deux modes de production.*

	Production académique	Production industrielle
Coût	51 à 540 000 euros	300 à 360 000 euros
Délai	Environ 10 jours	3 à 5 semaines
Possibilité thérapeutique	Hémopathies orphelines Patients hors AMM industrielle Patients présentant des rechutes	Hémopathies B Myélome multiple
Autres	Procédure modifiable Caractérisation précise des produits intermédiaires et finaux	Pourcentage de lymphocytes CAR+ avant la cryopréservation.

## 2. Les étapes d'une production de cellules CAR-T

Nous nous focaliserons sur le déroulement d'une production semi-automatisée à l'aide du semi-automate CliniMACS Prodigy®, de cellules CAR-T autologues ciblant l'antigène CD19 et transduites à l'aide d'un vecteur viral. Des études ont été publiées afin d'uniformiser la prise en charge des patients du début de la production à la prise en charge des effets indésirables liés aux cellules CAR-T (42).

## i. Aphérèse

La production de cellules CAR-T autologues débute par le prélèvement des cellules mononuclées du patient. Ce prélèvement par cytophérèse (ou leucaphérèse) sélectionne les cellules mononuclées du donneur selon des gradients de densité différents grâce à plusieurs centrifugations. Les autres cellules sont réinjectées au patient. La cytophérèse est réalisée par les centres de prélèvement des Établissements Français du Sang ou des hôpitaux. Le centre préleveur doit bénéficier d'une accréditation en cours de validité délivrée par l'Agence Régionale de Santé pour une durée de 5 ans. L'accréditation selon le référentiel FACT-JACIE est une exigence fréquente des industriels.

Le choix du moment idéal de la leucaphérèse est un dilemme pour les cliniciens. Ils doivent faire la balance entre l'avancée de la maladie réfractaire rendant urgent le traitement ou la thérapie de bridging (43), et le moment idéal de la leucaphérèse. Des recommandations pour la cytophérèse ont été publiées par l'*European Bone Marrow Transplantation EBMT* (42).

La viabilité des cellules du patient, qui a déjà reçu plusieurs lignes de chimiothérapie susceptibles de diminuer le nombre de lymphocyte et d'entraver leur activation est le principal problème rencontré (44). Il peut y avoir un nombre minimal de lymphocytes T pour débiter la production, et un nombre cible (45). Il est possible que la quantité de lymphocytes obtenus n'atteigne pas le nombre limite pour débiter la production, ce qui rend nécessaire une seconde leucaphérèse (46).

Plusieurs systèmes sont disponibles comme par exemple le Spectra Optia MNC® commercialisés par Terumo, testé par Schulz M, *et al.* (47). Les plaquettes, les polynucléaires, les globules rouges et le plasma sont réinjectés au patient, tandis que les lymphocytes sont récupérés et lavés. Les lymphocytes sont lavés afin d'éliminer les impuretés liées à la cytophérèse. Les restes d'anticoagulants et les cellules non désirées peuvent en effet perturber les étapes de production futures en modifiant l'activation des lymphocytes (48). C'est ce produit de leucaphérèse qui permettra de débiter notre production.

## ii. Production académique avec Miltenyi

### *Projet de production au CHU de Lille*

La production envisagée au CHU de Lille étant en partenariat avec la société Miltenyi Biotec, nous nous focaliserons sur leur méthode de production. Le semi-automate CliniMACS Prodigy® utilisé pour la production est présenté figure 8.

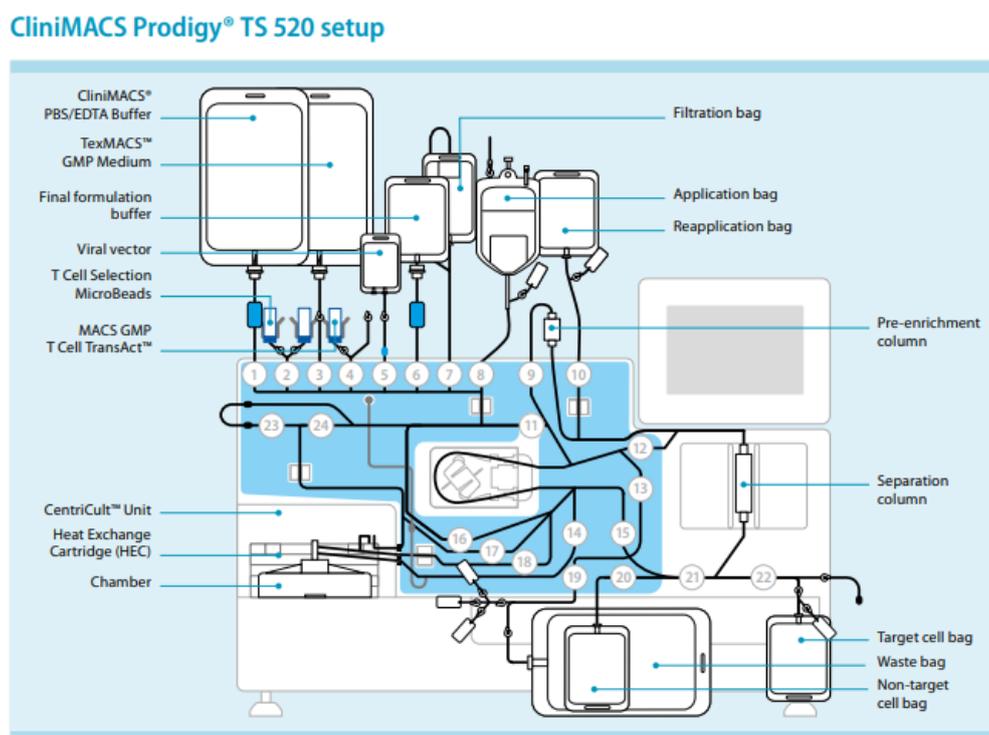


Figure 8 CliniMACS Prodigy®,

Schéma du semi-automate utilisé pour la production des cellules CAR-T au CHU de Lille, d'après Miltenyi Biotec (49).

### *Mise en œuvre de la production*

Le produit de leucaphérèse est acheminé jusqu'au lieu de la production. Il est caractérisé en mesurant la fréquence des cellules CD3+ parmi les cellules mononuclées totales, permettant ainsi la numération des lymphocytes T. Une sélection magnétique des cellules CD4+ et CD8+ du produit d'aphérèse est réalisée. Les contrôles qualité mis en œuvre à chaque étape de production seront détaillés dans la suite du travail présenté. Un schéma de la production est présenté figure 9.

La numération des lymphocytes sélectionnés permet la mise en culture d'une quantité bien définie, idéalement de l'ordre de  $10^8$  cellules. Les cellules CD4+ et CD8+ restantes peuvent être cryopréservées et utilisées soit comme cellules contrôles lors

des tests qui seront effectués, soit en cas de nécessité d'une nouvelle production si la première culture des lymphocytes échoue.

Les cellules CD4+ et CD8+ sont placées dans un milieu de culture favorable à l'expansion des lymphocytes T. Préalablement à la transduction, les lymphocytes T doivent être activés pour permettre l'intégration du transgène. *In vivo*, l'activation des lymphocytes T se fait grâce aux interactions entre le TCR du lymphocyte et l'antigène apprêté sur le CMH des cellules présentatrices de l'antigène CPA. La co-culture des CPA avec les lymphocytes T serait sujette à trop de contraintes. Les cellules sont donc activées pendant 24h à l'aide du TransAct<sup>®</sup>, une nanomatrice polymère colloïdale soluble contenant des anticorps anti-CD3 et anti-CD28, qui imitent la stimulation naturelle des CPA. L'activation par TransAct<sup>®</sup> permet également une meilleure reproductibilité car les anticorps contenus dans la matrice activent spécifiquement les lymphocytes T.

L'activation peut aussi se faire grâce à des billes magnétiques recouvertes d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 mais la méthode utilisant le TransAct<sup>®</sup> est préférée, évitant entre autre les étapes de lavage nécessaire à l'élimination des billes magnétiques (50). Certains protocoles ajoutent de l'interleukine-2 (IL-2) dans le milieu de culture, mais l'IL-2 en concentration excessive peut favoriser l'épuisement des lymphocytes T produits. Dans le procédé proposé par Miltenyi Biotec, l'IL-2 utilisée a été remplacée par de l'IL-7 et de l'IL-15, qui favorisent l'expansion des lymphocytes T mémoires.

Au terme de l'activation, la transduction se fait à l'aide du vecteur lentiviral fourni par Miltenyi. Ce vecteur, ajouté en quantité définie, est laissé 48h en contact avec les cellules. La quantité de vecteur à employer est exprimée en *Multiplicity of Infection* MOI, et correspond au nombre de virus par rapport au nombre de cellule. La MOI à utiliser doit être la plus basse possible pour rester efficace, de l'ordre de 10. Les 48h de transduction doivent se terminer sur des étapes de rinçage des cellules, nécessaires à l'élimination des vecteurs n'ayant pas été intégrés. Chaque nouveau lot de vecteur utilisé doit être validé par trois productions de validation de méthode au début du lot, afin de contrôler que le lot de vecteur entraîne bien l'expression du CAR souhaité.

Les lymphocytes T transduits sont ensuite maintenus en culture, pour une durée totale de production de 12 jours.

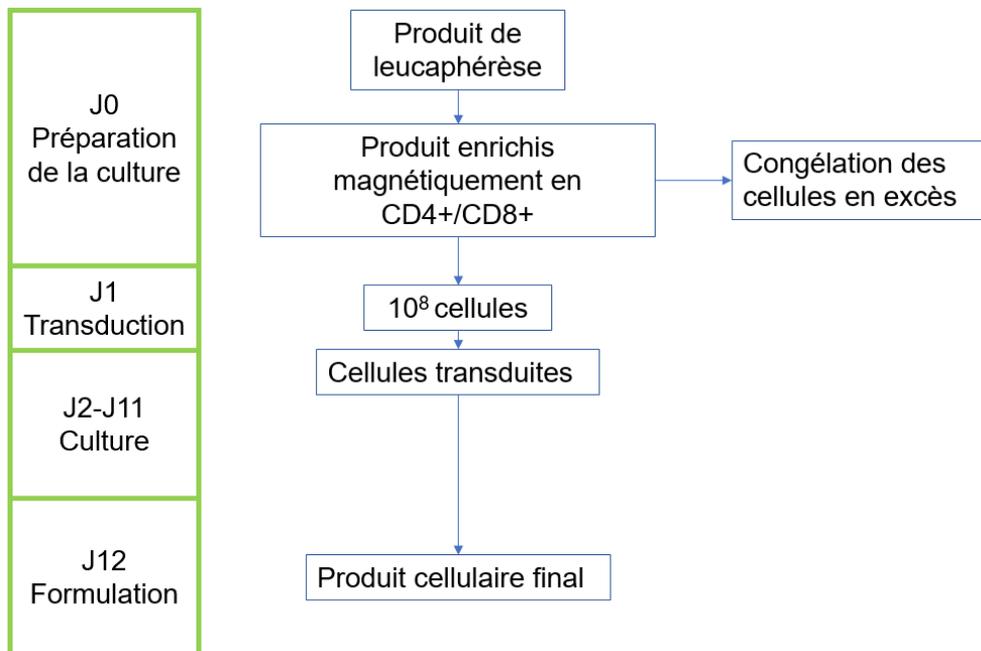


Figure 9 Protocole de fabrication des cellules CAR-T avec l'utilisation du CliniMACS Prodigy®.

Le produit final doit être parfaitement caractérisé et contrôlé avant son administration au patient. Certains des contrôles qualité mis en œuvre sont obligatoires lors de chaque production pour la libération de la poche produite. Il est possible d'effectuer d'autres contrôles dans un but expérimental, afin de mieux caractériser le produit réinjecté et son efficacité *in vivo*. Les différents contrôles, aussi bien ceux obligatoires et ceux optionnels, seront détaillés dans un chapitre dédié

## II. Contrôles qualité

Les contrôles qualité assurent la bonne qualité des cellules CAR-T et sont obligatoires au bon déroulement de la production. Ils permettent de contrôler la sécurité et l'efficacité de la thérapie.

Les paramètres à évaluer sont donc d'une part l'innocuité de ce qui sera réinjecté au patient, et d'autre part l'efficacité potentielle du produit. A partir de cette constatation, nous pouvons donc diviser les contrôles en deux catégories :

- Ceux assurant **l'innocuité de la poche et le rendement de production**. Ils assurent le bon déroulement de la production en contrôlant d'une part la sécurité microbiologique, et d'autre part l'efficacité de la transduction virale. Ils sont obligatoires à mettre en œuvre à chaque production, et doivent remplir les critères de libération du lot.
- Ceux caractérisant **la composition du produit cellulaire et son efficacité**. Ils ne font pas partie des critères de libération du lot mais ils restent fortement recommandés à mettre en place pour la production académique. Ils peuvent faire partie du développement des méthodes de production et avoir une utilité à des fins de recherche.

Ces contrôles qualité concernent la production de la poche de cellules CAR-T, donc nécessite une parfaite maîtrise de la totalité de la chaîne de production. Les étapes critiques doivent être identifiées en amont afin de sécuriser au maximum la réinjection au patient. La libération du lot nécessite le respect des critères qualité définis au préalable par la réglementation ainsi que la signature de la personne responsable de la libération.

### 1. Libération du lot

#### i. Sécurité microbiologique

Les contrôles de sécurité microbiologique sont des contrôles obligatoires à la libération de la poche. Toute contamination microbienne avérée dans les contrôles intermédiaires mène à l'arrêt de la production. Une analyse de risque permettra de déterminer si des contrôles intermédiaires négatifs au moment de la formulation et de la réinjection du produit nous permettent de réinjecter le produit directement, sans devoir attendre les résultats des contrôles microbiologiques finaux (compte tenu de leur délai).

### *Contrôles microbiologiques à mettre en œuvre*

D'après la pharmacopée européenne, les contrôles microbiologiques sont obligatoires pour toutes les préparations injectables. Étant donné qu'il s'agit d'un médicament dont le principe actif est une cellule viable, il n'est pas possible d'utiliser des procédés d'inactivation en fin de production prévenant une éventuelle contamination microbiologique. Ainsi, la sécurité d'utilisation du produit fini repose sur des dépistages microbiologiques multiples en début, au décours et en fin de production.

Le but à travers ces contrôles est d'assurer l'innocuité du produit final, en prenant en compte les risques liés à une exposition à des contaminants microbiologiques. Le produit final doit donc être stérile. La stérilité est définie par la pharmacopée européenne comme « *l'absence de micro-organismes viables, définie par un niveau d'assurance de stérilité de valeur inférieure ou égale à  $10^{-6}$*  ».

Selon la pharmacopée européenne, le choix de la méthode à employer est fondé sur les caractéristiques du produit final. Il repose ainsi sur les procédés de fabrication, les propriétés des matières premières utilisées et les conditions de culture cellulaire favorisant la croissance de micro-organismes (levures, bactéries, moisissures...).

Les contrôles microbiologiques des cellules CAR-T tiennent compte des limites des produits cellulaires recombinants. Leur durée de conservation n'excédant pas quelques heures à température ambiante, il n'est pas possible de terminer les essais classiques avant la réinjection de cellules CAR-T non cryopréservées. Les contrôles microbiologiques sont par définition longs, et l'attente des résultats de l'ensemble des contrôles qualité ne doit pas retarder la réinjection au risque de détériorer le produit et de retarder la prise en charge du patient. Pour répondre au mieux à cette difficulté, des contrôles intermédiaires en cours de production et des analyses de risque sont effectués. La chronologie des différents contrôles est synthétisée à la figure 10.

La validation des premiers contrôles en cours de production permet de libérer le produit avant les résultats des contrôles finaux. Les résultats des contrôles qualité microbiologiques réalisés en fin de production sont donc connus *a posteriori* de la réinjection.

En plus de la stérilité bactériologique et fongique, notre produit ne doit contenir aucun mycoplasme, et doit être indemne d'endotoxine bactérienne. Le dernier élément fondamental des contrôles de sécurité sont les contrôles liés à l'utilisation d'un vecteur viral.

## *Replication Competent Viruses*

Le premier des contrôles assurant la sécurité virale est le contrôle de l'absence de virus capable de réplication (*Replication Competent Viruses*, RCV). Ce contrôle doit être réalisé car la première et la seconde génération de vecteurs viraux ont montré des insertions mutagènes dans le génome des cellules hôtes, pouvant causer des lymphomes chez les patients traités (62). La FDA et l'EMA avaient alors rendu obligatoire le contrôle de l'absence de rétrovirus capable de se répliquer dans le produit cellulaire (63–65). La FDA et l'EMA recommandent l'utilisation d'un test basé sur la culture cellulaire, qui permet la réplication et l'amplification d'éventuels virus capable de se répliquer avant de doser l'un de leur composant (51,54). Cette étape d'amplification donne au test une durée de plusieurs semaines. Ce contrôle étant obligatoire avant la réinjection des cellules, il est aussi possible d'utiliser un test de détection rapide sans phase d'amplification en culture cellulaire, comme une PCR quantitative (qPCR) ou des méthodes par *southern blot* (57).

Il est important de comprendre que les vecteurs lentiviraux de 3<sup>e</sup> génération sont défectifs, c'est-à-dire qu'ils ont été construits de sorte à ne pas pouvoir se répliquer, par plusieurs techniques d'ingénierie qui ne seront pas détaillées ici (55). Ainsi, il n'a jamais été observé de vecteur d'origine lentiviral de 3<sup>e</sup> génération capable de se répliquer (54,55), mais le risque théorique existe toujours d'après la FDA et l'EMA (65). Ce risque théorique demeure en raison des recombinaisons non désirées lors de la production du vecteur. L'absence de RCV est obligatoirement contrôlée par le fournisseur lors de la libération du lot de vecteur, et elle doit être recontrôlée en fin de production des cellules CAR-T.

La difficulté de contrôler la présence de RCV est le choix d'une cible adéquate (52,56). En effet, beaucoup de composants sont communs entre le vecteur et un virus capable de réplication (gène de la capsid, de l'intégrase, de la transcriptase inverse...). Suivre un gène d'enveloppe (VSV-G) est une méthode efficace, car un tel gène est essentiel à la réplication d'un lentivirus (53) et il est absent du vecteur d'origine lentiviral. On extrait l'ADN des cellules CAR-T en fin de production, puis on amplifie le gène cible VSV-G par qPCR. La seule partie du vecteur s'intégrant dans le génome lymphocytaire étant le CAR, la PCR quantitative doit montrer une indétectabilité du gène cible d'enveloppe pour attester de l'absence de RCV.

## Vector Copy Number

Le second contrôle viral mis en œuvre est le contrôle du nombre de transgène inséré dans le génome de la cellule transduite.

L'insertion est susceptible de causer des mutagenèses, soit par perte d'expression de gène suppresseur de tumeur adjacent, soit par insertion induisant l'expression d'oncogène. Ainsi, on cherche à limiter ce risque en gardant le nombre d'insertion du transgène en dessous d'une certaine limite. Le principal levier pour limiter ce nombre de copie de vecteur est de garder la *Multiplicity of Infection* MOI en dessous d'un certain seuil. La MOI est le ratio du nombre de vecteur / nombre de cellules à transduire, elle doit être équilibrée entre une bonne expression du CAR et une limitation du risque mutationnel.

A l'heure actuelle, les techniques de contrôle du *Vector Copy Number* VCN font appels soit aux *southern blot* (58), soit à une PCR quantitative en temps réel (59,60). Miltenyi propose un protocole de calcul du VCN en utilisant une méthode de qPCR. Le VCN est fixé par Miltenyi à 5. Au-dessus de ce seuil, le produit cellulaire n'est pas considéré comme sûr et est rejeté.

Une nouvelle technique de détection en PCR digitale qui utilise moins d'ADN a été développée, permettant notamment de diminuer la prise d'essai de produit fini (61).

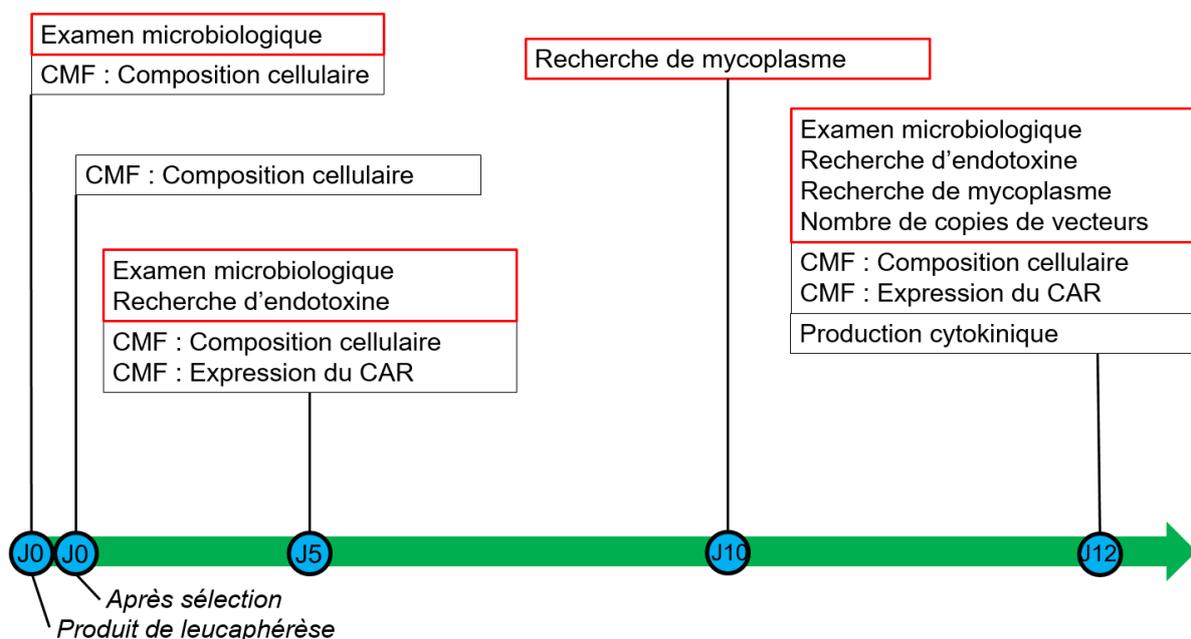


Figure 10 Chronologie des différents contrôles à mettre en place selon Miltenyi ®.

Les contrôles de microbiologie sont encadrés en rouge.

L'ensemble des contrôles qualité à mettre en œuvre dans le cadre d'une production académique de cellules CAR-T est synthétisé dans le tableau II.

Tableau II Récapitulatif des contrôles microbiologiques

Ces contrôles sont à mettre obligatoirement en œuvre pour la production académique de cellules CAR-T. Ces contrôles sont nécessaires à la libération du lot. Référence : Pharmacopée Européenne si non précisé.

Sécurité microbiologique du produit cellulaire		
Paramètres	Méthode	Critères d'acceptation
Stérilité bactérienne et fongique	Culture en flacons d'hémocultures, 1 aérobie et 1 anaérobie. Incubation en automate BacT/Alert® ou Virtuo® Si positif, ensemencement sur gélose adaptée et antibiogramme.	<b>Pas de croissance détectée dans les bouillons à J10 de culture</b>
Mycoplasmes	Culture en milieu liquide ou solide Méthode rapide par PCR	<b>Pas de croissance de mycoplasmes à J21. Absence d'amplification de gène spécifique de mycoplasmes</b>
Endotoxines	Lysat d'amoboecyte de limule : par gélification, turbidimétrie ou colorimétrie.	<b>Absence d'endotoxine</b>
Virus Capable de réplication ou <i>Replication Competent Viruses</i>	Culture cellulaire (51,52) PCR quantitative (53–56) Southern Blot (57)	<b>Absence de virus capable de réplication</b>
Nombre de copies de gènes par cellules	Southern Blot (58) PCR quantitative (59,60) PCR digitale (61)	<i>Pas de limite consensuelle</i> <b>5 selon Miltenyi</b>

## ii. Caractérisation du produit cellulaire

### *Expression du CAR*

Le contrôle de l'efficacité de la transduction du CAR au sein de lymphocytes T viables est obligatoire pour la libération du lot. Cette efficacité peut être contrôlée par cytométrie en flux (CMF) en ciblant le CAR à la surface de la cellule. Son expression phénotypique sur la membrane d'un lymphocyte T CD3+ montre l'intégration du gène du CAR dans le génome. Un seuil d'acceptabilité pour l'expression phénotypique est défini. La réinjection d'un produit cellulaire en dessous de ce seuil doit être discutée avec le clinicien qui considère la balance bénéfice/risque pour le patient.

En CMF, plusieurs méthodes de marquages existent pour détecter le CAR, comme présentées figure 11 :

- Un anticorps anti-idiotype couplé à un fluorochrome, (figure 11A), (66,67). L'anticorps peut aussi être dirigé contre le lien protéique entre VL et VH (*anti-linker*) (68).
- L'antigène d'intérêt soluble recombinant, couplé avec un fluorochrome (69) (Figure 11B), méthode en une seule étape qui ne requiert pas de lavage.
- L'antigène recombinant d'intérêt lié à la biotine, et révélé dans un second temps par un anticorps anti-biotine couplé à un fluorochrome, permettant une amplification du signal (figure 11C).
- L'antigène recombinant d'intérêt lié à la biotine, et révélé dans un second temps par la streptavidine couplée à un fluorochrome (figure 11D). La streptavidine peut être captée par les cellules en apoptose et est donc moins spécifique.

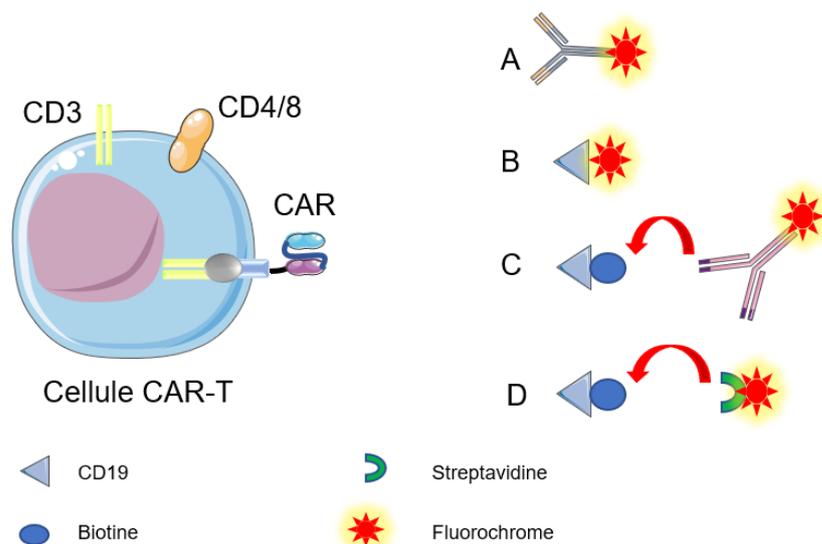


Figure 11 Différentes techniques de marquages du CAR

A : Ac anti-idiotypes. B : CD19 couplé au fluorochrome. C : CD19 couplé à la biotine révélée secondairement par un anticorps. D : CD19 couplé à la biotine révélée secondairement par la streptavidine marquée.

Ces deux méthodes de couplage du CD19 avec la biotine sont plus sensibles que le marquage direct du CD19 par un fluorochrome, mais requièrent des étapes de lavage supplémentaires et sont donc plus longues.

La méthode de marquage du CAR anti-CD19 proposée par Miltenyi met en œuvre une protéine CD19 recombinante couplée à la biotine. Après incubation avec la protéine CD19 couplée, deux étapes de lavage successives ont lieu avant l'addition du révélateur de la biotine. Ce marquage est long, avec une incubation d'environ 1h pour la révélation de la biotine (70).

Avant la réinjection, il est aussi obligatoire de connaître la proportion en lymphocytes T CAR+ de la poche de produit cellulaire. Des objectifs d'expressions attendus sont donnés à titre indicatif par Miltenyi, en pourcentage de lymphocytes T CAR+ parmi l'ensemble des lymphocytes T, en fin de production :

- 60 à 70% chez des donneurs sains
- 30 à 40% chez des patients souffrant d'hémopathies B
- 20%, pourcentage minimal nécessaire à la libération.

#### *Composition cellulaire*

Le phénotypage du produit cellulaire permet de caractériser le contenu cellulaire, en évaluant le nombre de cellules d'intérêt (les lymphocytes T) et le nombre de cellules CD3 négatives considérées comme des cellules indésirables dans notre production. Les cellules mononuclées CD3 négatives sont clairement identifiées et marquées par le panel d'anticorps proposé par Miltenyi, il s'agit des lymphocytes B et NK, ainsi que les monocytes. En début de production, il est nécessaire de contrôler la pureté du produit d'aphérèse, c'est-à-dire la proportion de lymphocytes T et des autres cellules mononuclées CD3- susceptibles de modifier la production des cellules CAR-T (8,71,72). Le produit cellulaire est de nouveau contrôlé après la sélection magnétique des lymphocytes CD4/8.

- En cours de production, au 5<sup>e</sup> jour, pour contrôler la composition du produit cellulaire en début de la production et la transduction virale.
- En fin de production, pour contrôler la composition du produit cellulaire fini, ainsi que la proportion d'expression du CAR en surface des lymphocytes T.

La composition cellulaire ne fait pas directement partie des critères de libération du lot. En revanche, le marquage du CAR en CMF oblige à marquer les cellules CD3+ et CD4/8. La composition est donc systématiquement contrôlée, mais le ratio CD4/CD8 n'a pas de borne car notre protocole ne permet pas sa maîtrise. De plus, aucune étude n'a à ce jour corrélée le ratio CD4/CD8 à l'efficacité clinique. La stratégie de marquage du CAR est détaillée figure 12.

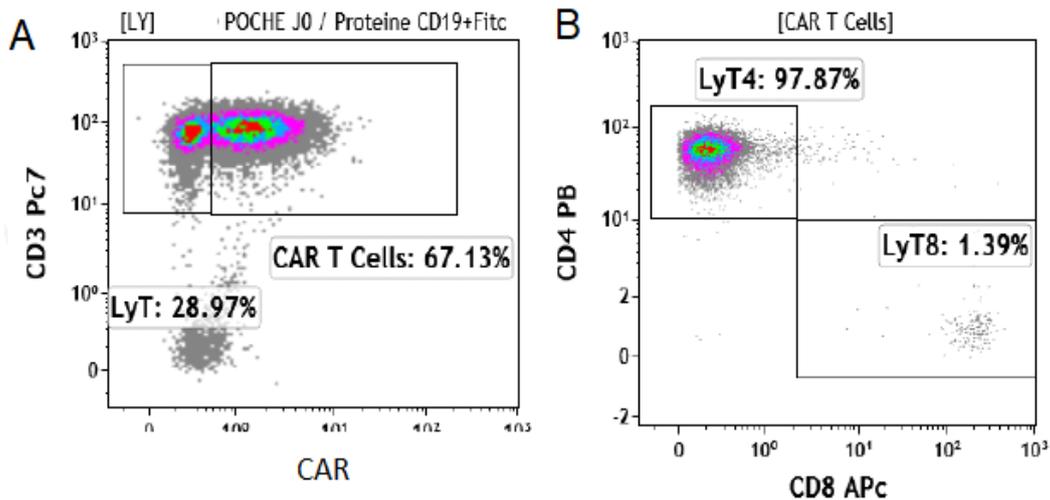


Figure 12 : Exemple de marquage en CMF d'une poche de cellules CAR-T industrielles.

A : Composition totale de la poche. B : Proportion de CD4 et CD8 parmi les cellules CAR+. Selon le mémoire de master 2 de A. Grossemy

La chronologie des contrôles obligatoires de la composition cellulaire est à retrouver figure 13, et leur récapitulatif tableau III.

### *Viabilité cellulaire*

La méthode couramment utilisée pour évaluer l'apoptose des cellules utilise des marqueurs de viabilité cellulaire. Ce sont des agents fluorescents intercalants de l'ADN comme l'iodure de propidium ou le 7-AAD (7-aminoactinomycin D). Ces agents sont incorporés uniquement par les cellules non viables et subissent un décalage de leur spectre d'émission lors de leur association avec l'ADN, permettant de vérifier leur incorporation (73,74). Il est important de noter que la technique de marquage par 7-AAD en CMF est la méthode la plus répandue et la méthode recommandée par Miltenyi dans ses 2 panels pour évaluer la viabilité cellulaire. Cette viabilité cellulaire ne doit pas être inférieure à un certain seuil car elle fait partie des critères de libération du produit cellulaire.

L'utilisation d'annexine V marquée par un fluorochrome est une autre méthode utilisable en CMF, testée en complément du marquage à l'iodure de propidium (75). L'annexine V est une molécule exprimée par les phagocytes ayant une haute affinité pour la phosphatidylsérine (PS). La PS est un phospholipide normalement retrouvée dans la couche interne de la membrane des cellules, et qui est externalisée en phase précoce de l'apoptose (76,77). L'annexine V du phagocyte reconnaît alors la PS et le phagocyte peut éliminer la cellule apoptotique.

Le bleu de trypan est aussi un colorant d'exclusion pénétrant le cytoplasme des cellules en apoptose. Il est utilisé en microscopie optique pour évaluer la viabilité cellulaire, ayant comme intérêt d'être très rapide à mettre en œuvre.

Tableau III : Récapitulatif de la caractérisation obligatoire du produit cellulaire.

Caractérisation du produit cellulaire		
Paramètres	Méthodes	Références
Efficacité de la transduction	CMF avec marquage direct du CAR CMF avec marquage à la biotine indirect	Figure 11 (66–69)
Phénotypage des cellules mononucléées du produit d'aphérèse	CMF : marquage des lymphocytes T CD4+ et CD8+, B et NK et des monocytes	(8,71,72)
Phénotypage du produit cellulaire	CMF : phénotype des lymphocytes T transduit	
Viabilité	CMF : Agent intercalant : Iodure de Propidium et 7-AAD	(73–75)
	CMF : Annexine V	(75–79)

### Indications du partenaire industriel

La caractérisation du produit cellulaire est réalisée avec en coopération avec le partenaire industriel à différentes étapes de la production.

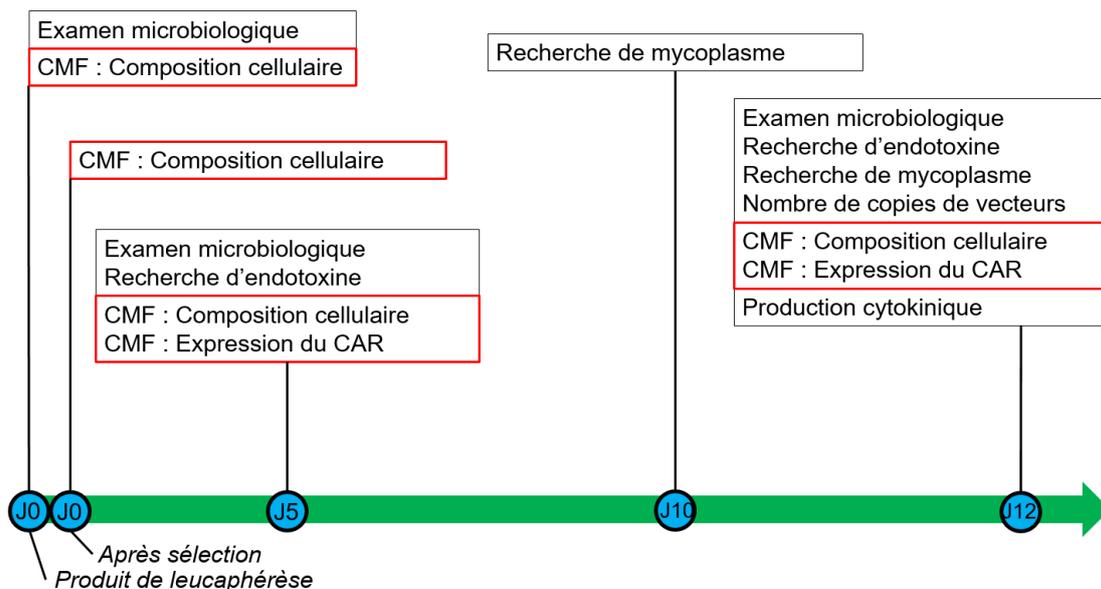


Figure 13 Chronologie des différents contrôles à mettre en place selon Miltenyi

Les contrôles de caractérisation sont encadrés en rouge.

Les deux panels d'anticorps sont recommandés par le partenaire, avec l'utilisation de l'automate de cytométrie en flux MACSQuant®.

Les deux panels proposés par Miltenyi sont présentés tableau IV.

- Le panel A est destiné à caractériser la composition cellulaire et à contrôler l'absence de cellules indésirables
- Le panel B est destiné au contrôle de l'efficacité de la transduction du CAR.

Les deux panels ont en commun de permettre l'évaluation de la viabilité, la numération des lymphocytes T et l'évaluation du ratio CD4 / CD8.

L'expression du CAR et la composition cellulaire sont évaluées à J5. Cette évaluation précoce contrôle le bon démarrage de la production. Si la transduction s'est bien déroulée, les cellules seront prêtes à la date prévue (7 jours après), et la date de réinjection est confirmée. Le clinicien peut alors démarrer la chimiothérapie de conditionnement du patient, préalable à sa réinjection.

*Tableau IV Présentation des deux panels d'anticorps proposés par Miltenyi.*

*Le panel A définit la composition cellulaire et contrôle l'absence de cellule indésirable, tandis que le panel B contrôle la bonne efficacité de la transduction.*

	Panel A : composition cellulaire	Panel B : efficacité de la transduction	Marqueur de/des
CD45	Oui	Oui	Leucocytes
CD3	Oui	Oui	Lymphocytes T
CD4	Oui	Oui	Lymphocytes T CD4
CD8	Oui	Oui	Lymphocytes T CD8
7-AAD	Oui	Oui	Viabilité
CD16/56	Oui	Non	Lymphocytes NK
CD14	Oui	Non	Monocytes
CD19	Oui	Non	Lymphocytes B
CAR	Non	Oui	Expression phénotypique du CAR

### iii. Capacités fonctionnelles des cellules CAR-T

Le dernier contrôle fortement recommandé pour la libération des cellules est un test d'efficacité des cellules CAR-T. Les contrôles d'efficacité ne sont pas obligatoires pour la libération des cellules car les délais de rendu des résultats sont trop longs pour garder le produit final à l'état frais.

Un contrôle envisageable est le dosage de l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ), une cytokine pro-inflammatoire produite par les lymphocytes T cytotoxiques. La sécrétion d'IFN $\gamma$  par les cellules CAR-T au contact de leur antigène cible permet de s'assurer que le produit cellulaire final est bien fonctionnel, et capable de reconnaître l'antigène cible et d'induire une activation de la cellule. Le dosage de l'IFN $\gamma$  peut être réalisé par approche ELISPOT (*Enzyme Linked Immunospot*) par exemple.

Les tests ELISPOT ont été décrits pour la première fois en 1983 (80). Ils sont basés sur une technique ELISA. Les analytes sécrétés dans un micro puit sont directement capturés par un anticorps recouvrant le fond du puit. Après incubation des cellules CAR-T avec l'antigène puis une étape de lavage du puit, la cytokine d'intérêt est rendue visible par un anticorps lié à la biotine et forme ainsi des spots colorés (figure 14). Les spots colorés sont dénombrés automatiquement, chacun représentant une cellule ayant sécrétée la cytokine. Ces tests fonctionnels sont intéressants pour observer une réaction cellulaire à un antigène précis.

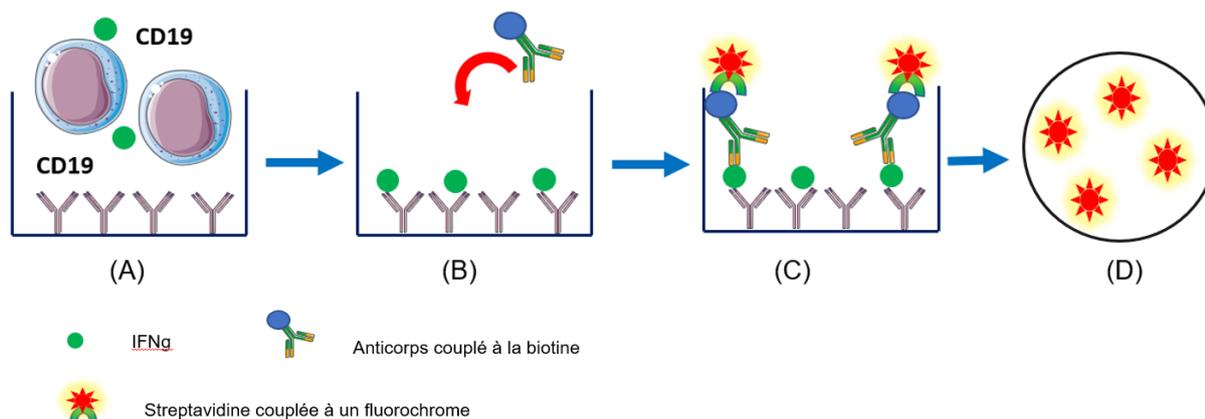


Figure 14 Schématisation du fonctionnement d'un ELISPOT.

(A) Co-incubation des cellules CAR-T avec le CD19 dans un micropuit coâté avec des anticorps anti-IFN $\gamma$ , sécrétion d'IFN $\gamma$  par les cellules CAR-T (B) IFN $\gamma$  sécrété retenu par les anticorps lors du lavage des cellules, puis ajout des anticorps anti-IFN $\gamma$  couplés à la biotine. (C) Révélation de l'IFN $\gamma$  capturé par de la streptavidine marquée (D) Vision du lecteur automatique de spot, un spot correspond à une sécrétion d'IFN $\gamma$ .

Le contrôle de la sécrétion de cytokine par les cellules CAR-T lors de la mise en contact de leur antigène cible est réalisé lors de la fin de production, sur le produit final

(figure 15). Ce contrôle à un délai de rendu des résultats d'environ deux jours, le résultat est donc rendu *a posteriori* de la réinjection des cellules CAR-T.

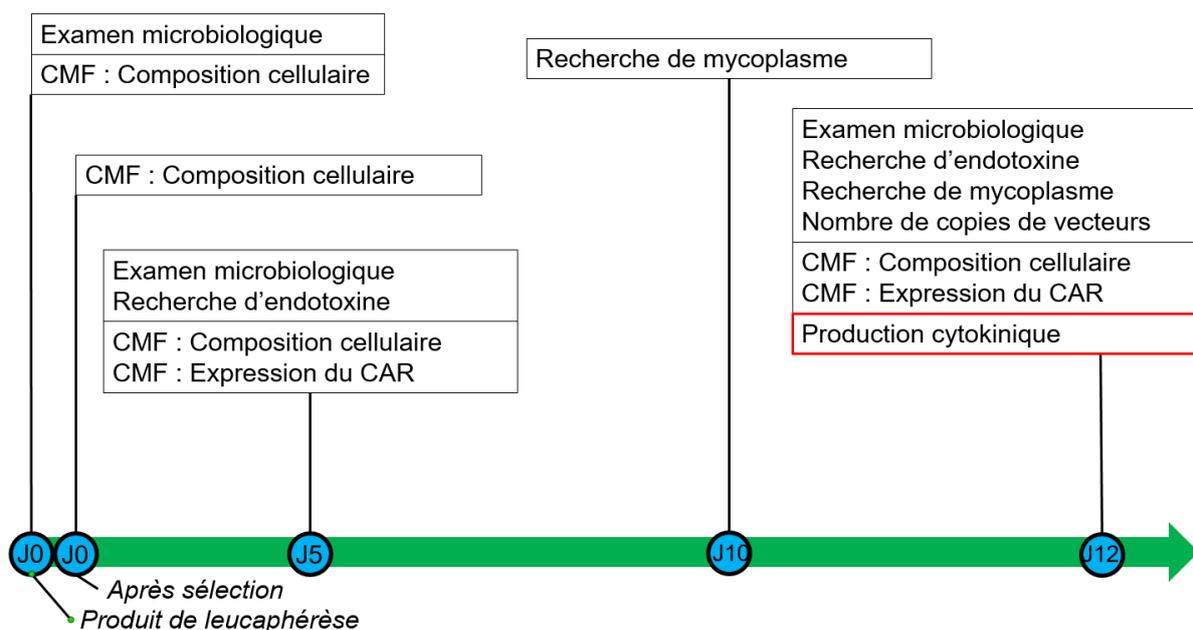


Figure 15 : Chronologie des différents contrôles à mettre en place selon Miltenyi.

Le contrôle de la production cytokinique est encadré en rouge.

## 2. Contrôles recommandés

Ces contrôles ne sont pas obligatoires pour la libération de la poche de produit cellulaire, mais ils peuvent être mis en œuvre à des fins de recherche et d'optimisation du protocole. Leur but est d'établir les différentes caractéristiques des produits cellulaires. Ainsi, on peut évaluer leur cytotoxicité ou encore phénotyper les différents sous-types cellulaires. La comparaison des données obtenues *in vitro* aux résultats cliniques obtenus chez le patient permettra entre autres d'optimiser la production des cellules CAR-T.

### i. Evaluation de la cytotoxicité des cellules CAR-T *in vitro*

La cytotoxicité est évaluable *in vitro* selon deux principes différents :

- Contrôles mesurant la lyse des cellules cibles lors de la co-incubation avec les cellules CAR-T.
- Contrôles vérifiant l'absence de prolifération cellulaire des cellules cibles au contact des cellules CAR-T.

Les cellules CAR-T produites sont normalement cytotoxiques pour les cellules tumorales exprimant l'antigène cible, donc les contrôles de cytotoxicité adéquats

évaluent l'effet des cellules CAR-T produites sur leurs cellules cibles. Les contrôles choisis doivent refléter la cytotoxicité *in vivo* des cellules CAR-T, soit l'effet « *on target / on tumor* » attendu chez le patient.

Dans le développement de tests d'efficacité destinés à des cellules CAR-T, un seul test ne sera pas suffisant pour tenter de prédire l'efficacité du traitement. Un résumé des contrôles existant est disponible tableau V. L'approche idéale se compose de différents contrôles évaluant des caractéristiques associées à l'efficacité. Les résultats de l'ensemble des essais choisis doivent être corrélés à une activité biologique pertinente. Des publications existent pour indiquer les contrôles à effectuer (81,82)

Tableau V Résumé des contrôles existant pour le contrôle de la cytotoxicité des cellules CAR-T.

Evaluation de la cytotoxicité des cellules CAR-T produites		
Méthodes	Principe	Référence
<b>Gold standard : Relargage d'isotopes radioactifs<sup>1</sup></b>	<b>Mesure de la radioactivité émise par la lyse des cellules cibles incorporant préalablement un isotope radioactif (ex : chrome 51)</b> Cf ci-dessous	Figure 16 (83–90)
Bioluminescence	Mesure d'une émission de photon par les cellules cibles transduites avec le gène de la luciférase.	(91–99)
Impédance	Mesure d'une décroissance d'impédance due à la lyse des cellules cibles.	(100–109)
Relargage d'enzymes intracellulaires	Dosage d'enzyme intracellulaire (LDH) dans le surnageant cellulaire.	(110,111)
Etude directe des cellules cibles	<b>Par CMF : Viabilité par l'étude de la lyse des cellules cibles : marquage par 7-AAD<sup>1</sup></b>	Figure 17 (112)
	Par CMF : prolifération des cellules cibles.	(113–116)
	Par mesure de la radioactivité : incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN des cellules cibles.	(117)

<sup>1</sup>Par souci de concision, seules seront détaillées les techniques de relargage de chrome 51 et de lyse des cellules cibles.

### *Évaluation de la cytotoxicité par relargage d'isotopes radioactifs (chrome51)*

La mesure de l'activité radioactive liée au relargage d'un isotope radioactif du chrome, le chrome 51, est la méthode historique de l'évaluation de la cytotoxicité et est considérée comme le Gold standard (83,84) des tests de cytotoxicité. L'inconvénient majeur de cette méthode est l'utilisation de la radioactivité, et donc la nécessité d'une plateforme dédiée aux radio-immuno analyses pour la mesure de la radioactivité.

Elle repose sur la quantification des cellules cibles ayant perdu l'intégrité de leurs membranes. Cette approche a été décrite pour la première fois en 1968 (85), et a ensuite gagné en popularité pour devenir la méthode de référence d'évaluation de la cytotoxicité des lymphocytes T et NK (86,87). La méthode est présentée figure 16. Les cellules cibles radiomarquées au chrome 51 sont co-incubées avec les cellules CAR-T dans des micro puits à différents ratios de cellules CAR-T / cellules cibles. Lors de cette co-incubation, les cellules CAR-T exercent leur activité cytotoxique, provoquant ainsi la perte d'intégrité de la membrane des cellules cibles. Les cellules cibles relarguent alors le chrome 51 dans le milieu de culture. Après 4h de co-incubation, le surnageant est récolté et la radioactivité sera mesurée dans ce surnageant par un compteur gamma. Un contrôle de relargage spontané du chrome 51 (avec simplement les cellules marquées au chrome 51) et un contrôle de relargage maximum de chrome 51 (en utilisant soit un détergent lysant entièrement les cellules, le Triton X-100, ou soit en utilisant une lyse hypotonique) sont utilisés comme contrôle négatif et positif. Plus la radioactivité du surnageant est élevée, plus la quantité de cellules cibles lysées est importante, reflétant ainsi l'activité cytotoxique des cellules CAR-T. Cette constatation permet le calcul d'un pourcentage de lyse spécifique sur ce principe :

$$\text{Lyse spécifique (\%)} = \frac{\text{Relargage avec les cellules CART} - \text{relargage spontanée}}{\text{Relargage maximal} - \text{relargage spontanée}}$$

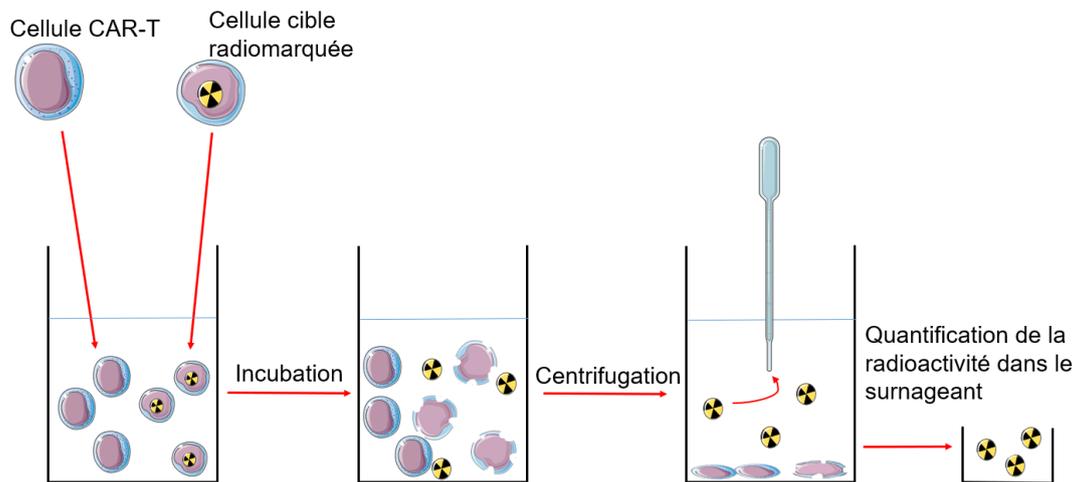


Figure 16 Schéma du protocole d'évaluation de la cytotoxicité par relargage de chrome 51.

Les cellules cibles radiomarquées sont co-incubées avec les cellules CAR-T. La lyse des cellules cibles va provoquer le relargage des isotopes radioactifs incorporés, dont l'activité sera mesurée dans le surnageant cellulaire après centrifugation.

En plus d'être compliqué à mettre en œuvre par son utilisation de la radioactivité et des risques qui en découlent, ce contrôle est chronophage et utilise une quantité importante de produit fini (88).

Le développement continu de nouvelles méthodes de mesure de la cytotoxicité oriente donc vers des tests en une seule étape automatisable, bon marché et autorisant une prise d'essai limitée. Dans cette optique, les techniques de bioluminescence (91–99) et d'impédance (100–109) sont en développement constant, rendant obsolète les techniques historiques de dosage des enzymes intracellulaires comme le dosage de la LDH (110,111).

#### *Évaluation de la cytotoxicité par l'étude de la lyse des cellules cibles*

La CMF étant déjà utilisée dans la caractérisation des cellules CAR-T, il est plus aisé de mettre en œuvre une évaluation de la cytotoxicité par cette méthode (figure 17). La viabilité, obligatoirement contrôlée pour les cellules CAR-T, peut aussi être évaluée sur les cellules cibles dans le cadre du contrôle de la cytotoxicité. Dans ce cadre, on cherchera à évaluer la non-viabilité, donc la lyse, des cellules cibles après leur co-incubation avec les cellules CAR-T. Si elles ne sont plus viables après la co-incubation, c'est qu'elles auront été lysées, donc que les cellules CAR-T leurs sont toxiques. Le marquage de la caspase intracellulaire peut par exemple être effectué (112).

Le marquage combiné par 7-AAD, iodure de propidium et annexine V, en plus d'être plus rapide, moins dangereux et plus sensible que la méthode par chrome 51, présente

l'avantage non négligeable de distinguer l'apoptose précoce de l'augmentation de la perméabilité membranaire, plus représentative de l'apoptose tardive (47).

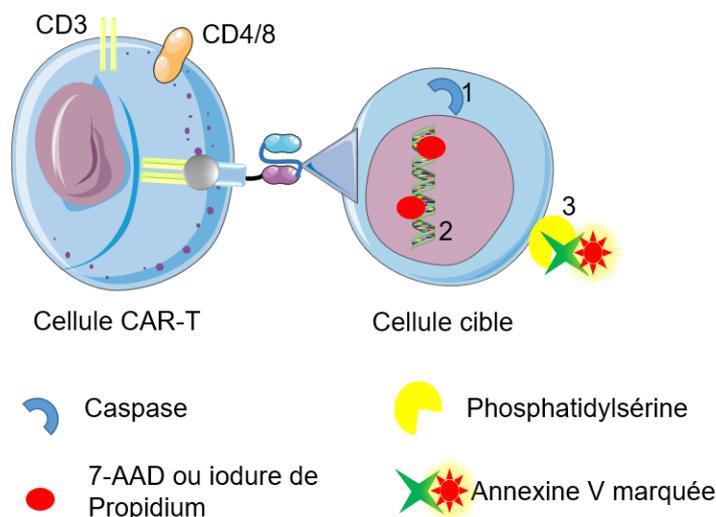


Figure 17 Différents marqueurs d'apoptose pouvant être ciblés en CMF :

(1) Activation de la caspase intracellulaire (2) Incorporation du 7-AAD ou de l'iodure de propidium dans l'ADN et (3) expression membranaire de la phosphatidylsérine reconnue par l'annexine V marquée par un fluorochrome.

A l'inverse, il est possible d'étudier la prolifération des cellules cibles. Cette étude est réalisée en CMF ou par la détection d'isotopes radioactifs.

En CMF, les outils pour étudier la prolifération seront détaillés plus loin. Rapidement, le principe est d'évaluer les divisions cellulaires témoins de la prolifération chez les cellules cibles (113). Il est possible de combiner le marquage par CFSE avec un marquage au iodure de propidium ou au 7-AAD (114,115), qui sont des marqueurs de viabilité.

En radio-immuno analyse, la méthode utilisée pour étudier la prolifération cellulaire met en œuvre un isotope radioactif de l'hydrogène incorporé dans la thymidine, nucléotide composant de l'ADN (thymidine tritiée ( $^3\text{H}$ -thymidine)). La thymidine tritiée permet une mesure de la prolifération cellulaire plutôt qu'une mesure de la lyse (117). Dans ce test, on étudiera la prolifération cellulaire des cellules cibles sur la base de l'incorporation dans l'ADN de la thymidine tritiée. Ce test présente les mêmes désavantages que le test par relargage de chrome 51 (radioactivité) et a été abandonné depuis sa création, remplacé par des méthodes plus adaptées.

ii. Caractériser le profil cytokinique des cellules CAR-T après activation

Précédemment, nous avons vu le dosage d'IFN $\gamma$  produit par les cellules CAR-T au contact de leur antigène cible, mais il est aussi possible de doser d'autres cytokines. Ce dosage évalue l'efficacité du produit et caractérise la réponse cytokinique des lymphocytes modifiés vis-à-vis de leurs cibles. En effet, la production de cytokines inflammatoire signerait un effet délétère sur les cellules tumorales, tandis que la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires *in vitro* ne serait pas prévisionnelle d'un effet anti-tumoral *in vivo*.

Le dosage des cytokines est effectué dans le surnageant cellulaire après la co-incubation des cellules CAR-T et des cellules cibles à un ratio défini. Il est possible de doser les cytokines dans le surnageant du milieu de culture par fluorimétrie en flux ou par ELISA. Autrement, il est possible de mesurer en CMF l'expression intracellulaire de certaines cytokines dans le cytoplasme des cellules effectrices. Pour finir, la dernière technique met en œuvre des tests ELISPOT sur le même exemple que pour l'IFN $\gamma$ .

Les méthodes en fluorimétrie en flux sur automate Luminex® permettent un multiplexage, donc le dosage simultané de différentes cytokines, permettant le développement de panels.

iii. Caractérisation du produit cellulaire en CMF

La caractérisation par cytométrie en flux est fortement recommandée dans la production de nos cellules. Son intérêt est notamment de :

- Étudier les capacités de proliférations *in vitro* des cellules CAR-T.
- Étudier le phénotype des sous-types lymphocytaires T.
- Étudier l'épuisement des cellules CAR-T.

Les différentes applications de la CMF peuvent être trouvées tableau VI.

Tableau VI : Résumé des caractérisations des cellules CAR-T recommandées lors de la production.

Caractérisation du produit cellulaire			
Méthode	But	Marqueurs spécifiques Miltenyi	Référence
Prolifération des cellules effectrices	Prévision des capacités d'expansion <i>in vivo</i>	CD27 CD127 PD-1	(118,119)
Phénotypage des sous-populations lymphocytaires T dans le produit d'aphérèse	Sélectionner et enrichir certains sous-types lymphocytaires afin d'uniformiser le produit de base de tous les patients		(120–124)
Phénotypage des sous-populations lymphocytaires T dans le produit final	Evaluer l'évolution de la répartition des sous-types lymphocytaires au cours de la production		(123)
Epuisement lymphocytaire en fin de production	Efficacité du produit cellulaire réinjecté au patient	LAG3 TIM3 PD-1	(125–128)

### *Prolifération cellulaire*

Nous avons déjà abordé les études de proliférations appliquées aux cellules cibles co-incubées avec les cellules CAR-T. Mais les tests de prolifération cellulaire sont surtout utilisés pour s'assurer de la bonne expansion des cellules CAR-T au contact de leurs cellules cibles (118,119). En effet, après leur réinjection, les lymphocytes modifiés doivent proliférer dans l'organisme du patient. Cette capacité de prolifération peut être évaluée *in vitro* avant la réinjection. Le principe de la technique est sensiblement identique à celui mis en œuvre pour les cellules cibles, en prenant comme marqueur soit un colorant se liant aux amines des protéines intracellulaires et qui fluoresce après clivage par des estérases (succinimidyl ester, CFSE) soit un colorant lipophile se liant aux membranes cellulaires (VioletCell).

Les cellules CAR-T sont préalablement incubées avec le colorant, puis co-incubées avec leurs cellules cibles. A la fin de la co-incubation, elles sont marquées avec les anticorps d'intérêt pour la CMF. Quel que soit le colorant choisi, le principe est le même : au cours de la prolifération cellulaire, le colorant sera équitablement réparti de la cellule mère vers les deux cellules filles, chaque cellule fille contiendra alors la moitié du colorant de la cellule mère. Ainsi, le nombre de division cellulaire peut être déduit de l'intensité de fluorescence du marqueur de prolifération, comme présenté figure 18.

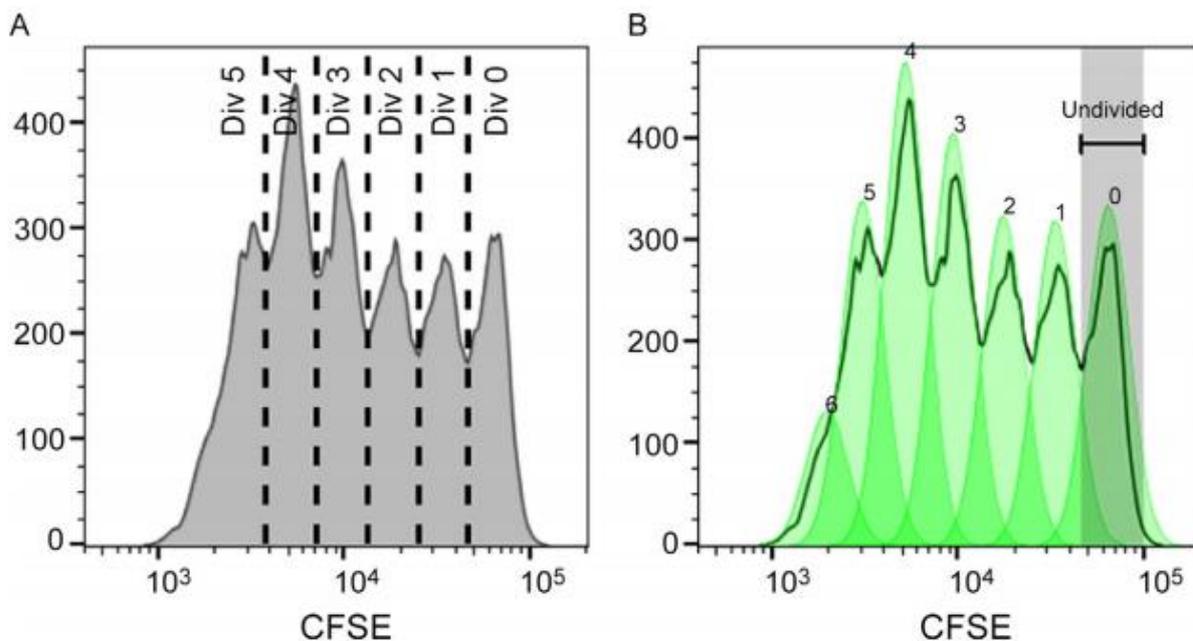


Figure 18 Décalage de l'intensité de fluorescence du CFSE selon la division cellulaire.

La prolifération des cellules CAR-T est montrée par les décalages successifs des pics de fluorescence. Plus le pic de fluorescence est décalé vers la gauche, moins la fluorescence est intense et plus les cellules ont proliféré. D'après (119)

Le partenaire industriel commercialise un panel d'anticorps ayant pour but d'évaluer les capacités de prolifération. Ce panel ne comporte pas de colorant de dilution comme le CFSE et le VioletCell, mais des anticorps marquant une protéine d'épuisement (PD-1) et les marqueurs d'activation CD27 et CD127. Il a pour intérêt d'évaluer les capacités de prolifération sans faire appel à une co-incubation avec les cellules cibles.

#### Caractériser les sous-populations

L'évaluation de la proportion de lymphocytes T CD4+ et T CD8+, de la viabilité cellulaire et du pourcentage d'expression phénotypique du CAR sont réalisés pour la libération de la poche. Il est toutefois possible d'aller au-delà de ces caractérisations, et de phénotyper les sous-types cellulaires à des fins de recherche.

Il est possible de phénotyper les lymphocytes T CD4+ et T CD8+ en différents sous-types cellulaires (129) présentés figure 19. Les lymphocytes T naïfs se différencient en lymphocytes à caractère souche (Souche Central Mémoire SCM), mémoires (Central Mémoire CM et Effecteur Mémoire EM) et à un état différencié effecteur (Eff). Ces sous types sont phénotypés sur la base de marqueurs membranaires ciblés en cytométrie en flux. Les lymphocytes naïfs ont une meilleure capacité de survie et de prolifération, tandis que les lymphocytes les plus différenciés ont des meilleures fonctions effectrices.

Dans le produit réinjecté, il a été montré que les lymphocytes T CM moins différenciés et les lymphocytes T SCM montrent davantage d'efficacité et de persistance que les autres sous types (130,131). Des travaux plus récents ont ensuite montré que l'enrichissement du milieu de culture en IL-7 et IL-15 pendant la phase d'expansion favorisait la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes T SCM (132,133).

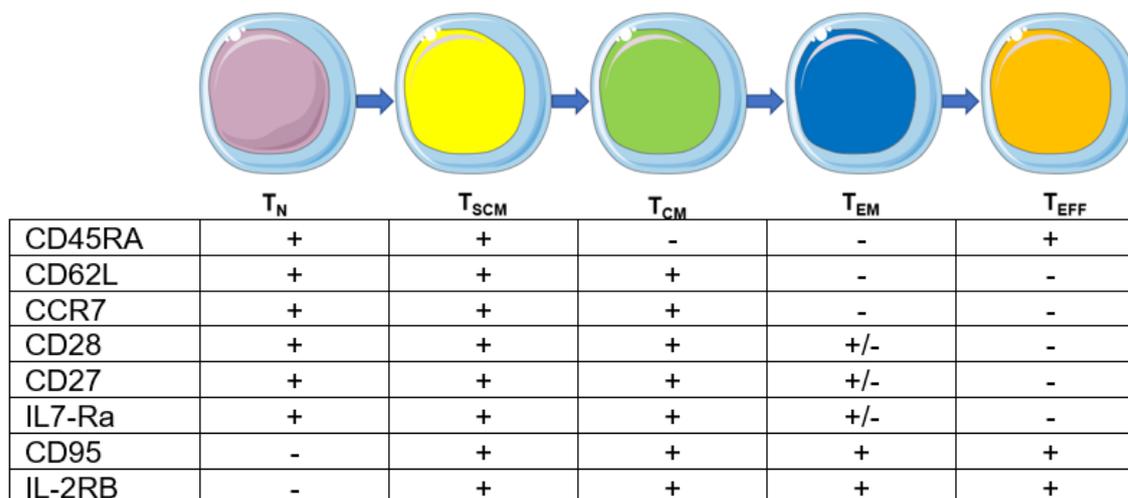


Figure 19 Marqueurs phénotypiques des sous-types lymphocytaires.

T<sub>N</sub> : T naïfs, T<sub>SCM</sub> : T Souche Central Mémoire, T<sub>CM</sub> : Central Mémoire, T<sub>EM</sub> : T Effecteur Mémoire, T<sub>Eff</sub> : T Effecteur.

#### Phénotypage sur le produit de leucaphérèse :

Chez les patients souffrant d'une LAL-B, il a été montré que les traitements préalablement reçus étaient responsables d'une variation du taux de lymphocytes d'un patient à l'autre, et que leur taux de lymphocytes T est modifié par rapport à des patients sains (120,123), figure 20.

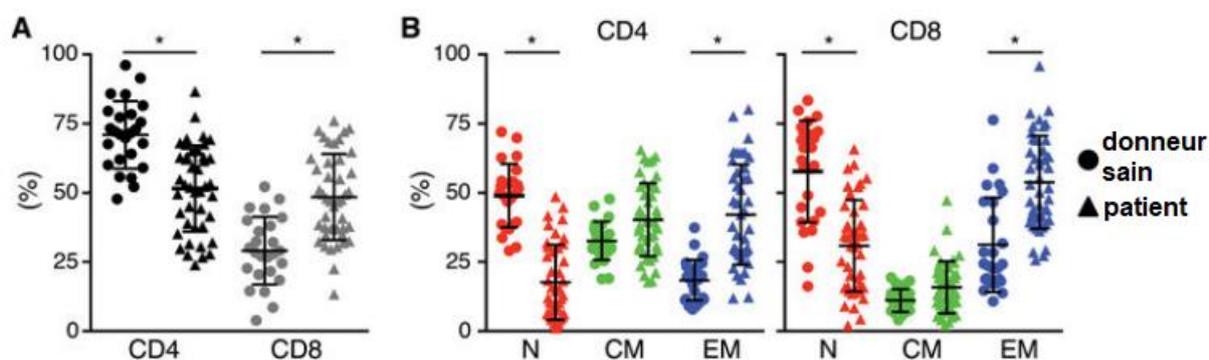


Figure 20 Différences entre les sous-types lymphocytaires T entre les CMN de patients et les CMN de donneurs sains

A : proportions entre CD4+ et CD8+ (B) TN, TCM et TEM entre des patients avec pathologies lymphocytaires B et des donneurs sains. Astérisques : différence significative. D'après Sommermeyer et al., (123)

La définition précise des sous-types lymphocytaires permet des comparaisons entre les patients mais aussi entre les études. Certains auteurs ont cherché à directement

formuler des cellules CAR-T à partir d'un unique sous-type de lymphocytes, permettant ainsi d'identifier leur fonction.

Une fois le rôle et les caractéristiques de chaque sous-type de cellules CAR-T définis chez le patient, il est possible d'enrichir les produits en certains sous-types lymphocytaires. L'uniformisation des différents produits rend plus aisé l'identification des facteurs influant sur l'efficacité et la cytotoxicité (124).

Avec l'expérience, des équipes se sont aperçues en comparant les sous-populations T exprimant le CAR que certains sous-types lymphocytaires T étaient plus facilement transduits que d'autres. L'équipe de Sommermeyer et al., a montré en 2016 l'intérêt de phénotyper avant la production pour sélectionner et débiter la production avec un ratio défini de CD4+/CD8+, permettant de d'avantage uniformiser les produits cellulaires finaux (123). Cette méthode n'est pas appliquée dans notre cas, mais elle existe. Il est cependant impossible de définir parfaitement le ratio CD4 / CD8 final sans produire les deux types de cellules séparément avec un produit de départ uniquement CD4 ou uniquement CD8, puis de les réunir en fin de production.

La composition de notre produit de départ a donc un impact sur le produit final, et donc des répercussions sur la réussite du traitement et la prédiction des effets indésirables consécutifs au traitement. En outre, le phénotypage préalable à la production autorise une sélection de certains sous-types cellulaires, la production séparée de cellules CAR-T provenant de différents sous-types, puis la combinaison des sous-types T CD4+ et CD8+ les plus efficaces.

#### *Phénotypage sur le produit final*

Le phénotypage final caractérise les cellules obtenues avant la réinjection au patient. Définir les fonctions de chaque sous-type cellulaire a été fait en séparant le produit cellulaire final entre lymphocytes T CD4+ et lymphocytes T CD8+, les résultats sont présentés figure 21. Les lymphocytes T CD4+ seuls montrent d'avantage de capacité de prolifération, tandis que les lymphocytes T CD8+ montrent une capacité de cytolysse supérieure.

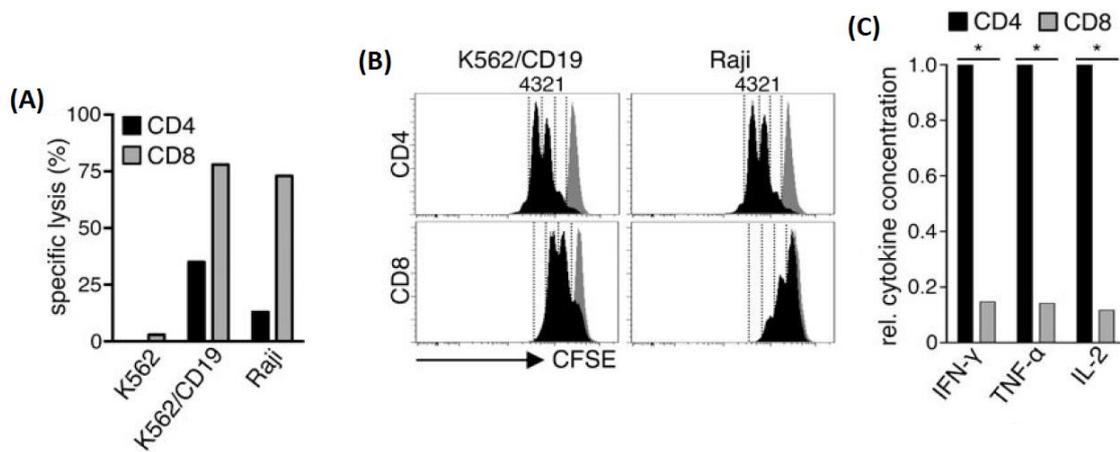


Figure 21 Différents capacités des lymphocytes T CD4+ ou CD8+

(A) Capacité de lyse des lymphocytes T CD4+ ou CD8+ mesurée par relargage du chrome 51 entre une co-incubation avec des cellules CD19+ (K562/CD19 et Raji) et un contrôle CD19- (K562). (B) Capacités de prolifération des T CD4+ ou des T CD8+, le nombre au-dessus indiquant le nombre de divisions cellulaires. (C) Capacités de sécrétion de cytokines lors d'une co-incubation avec les cellules cibles. \* : significativité statistique. D'après Sommermeyer et al.,

Il est à noter que consécutivement aux stimulations liées à la production, le phénotype cellulaire change entre le patient et la fin de la production. Les cellules présentant un phénotype naïf CD27+ CCR7+ CD62L+ et CD45RA+ deviennent largement minoritaires (123).

### Épuisement cellulaire

Il existe de nombreux freins à la persistance *in vivo* des cellules CAR-T (125) . C'est le cas par exemple de l'épuisement cellulaire et d'autres mécanismes comme la contraction lymphocytaire (l'antigène n'est plus en quantité suffisante pour permettre l'expansion des cellules CAR-T et elles finissent par disparaître).

L'épuisement cellulaire est un frein à la persistance qui peut être évalué en cytométrie en flux. L'épuisement des lymphocytes T est un phénomène physiologique d'inactivation des lymphocytes T en cas de stimulations répétées (126). Les stimulations répétées étant physiologiquement dues à un peptide du soi, l'épuisement lymphocytaire existe afin d'éviter une auto-réactivité des lymphocytes T. Lors d'un phénomène cancéreux, les antigènes tumoraux persistent de façon prolongée et peuvent ainsi mener à l'épuisement des lymphocytes T initialement présents pour la réponse anti-tumorale. Les lymphocytes T épuisés expriment ainsi PD-1 (Programmed death-1) (134), LAG-3 (Lymphocyte-activation Gene-3) et TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3) (135). Ces récepteurs sont des points de contrôles du système immunitaire exprimés par les lymphocytes T. Ils vont induire l'expression de gènes inhibiteurs de la réaction immunitaire, conduisant à une

contraction du pool de cellules CAR-T, une perte de leurs fonctions cytotoxique et de sécrétions de cytokine, et mener à une activation induisant la mort cellulaire (activation-induced cell death AICD).

Le partenaire industriel propose un panel d'anticorps ayant pour but d'évaluer l'épuisement des cellules CAR-T. Ce panel, intégrant le marquage de LAG-3, TIM-3 et PD-1, est d'abord destiné à être utilisé sur le produit de leucaphérèse. En effet, les chimiothérapies reçues précédemment par le patient altèrent le phénotype et la fonctionnalité des lymphocytes T recueillis dans le produit d'aphérèse. Cet épuisement serait susceptible d'entraver la bonne production des cellules CAR-T. Il a été montré qu'une plus grande expression de LAG-3 et TIM-3 à la surface des lymphocytes T du produit d'aphérèse était associée à un moins bon pronostic chez les patients souffrant de LAL-B (135).

Le contrôle de l'épuisement cellulaire est réitérable après la production, afin de contrôler la fonctionnalité du produit cellulaire réinjecté au patient.

Il est aussi possible d'évaluer l'épuisement cellulaire dû à des stimulations antigéniques répétées. C'est le test dit de « stress antigénique ». Les cellules effectrices sont transférées dans des puits contenant les cellules cibles, puis récoltées et co-incubées de nouveau avec des cellules cibles fraîches. La perte des fonctions effectrices est évaluée par le dosage des cytokines et par la numération des cellules cibles restantes à la fin de chaque incubation, et offre ainsi une évaluation plus proche de la réalité qu'une simple incubation avec les cellules cibles (128).

Un point à mettre en évidence est le manque de méthode standardisée permettant une comparaison des différents centres producteurs de cellules CAR-T (136). En effet, dans la littérature disponible, chaque centre évaluait le produit obtenu avec leurs propres contrôles qualités, qui étaient comparables mais comprenaient souvent de légères modifications pour s'adapter aux particularités de chacun. A ce jour, il n'existe pas de normes clairement définies par une instance nationale ou internationale permettant d'uniformiser tous les tests mis en œuvre dans le contrôle qualité des cellules CAR-T.

### III. Exemples déjà existant

#### 1. Production détaillée par une équipe espagnole

Les sujets de recherche de l'équipe du « *Hospital Clinic de Barcelona* » ce sont ces dernières années centrés sur le mode de production académique de lymphocytes modifiés anti-CD19 pour des patients atteints d'hémopathies lymphoïdes B. Dans ses publications, l'équipe a produit ses propres cellules CAR-T autologues à l'aide du CliniMACS Prodigy®, dans un modèle « *point-of-care* » déjà expérimenté avec des cellules allogéniques.

Cette étude est une étude de phase I mettant en œuvre une production de cellules CAR-T autologues appelées ARI-0001, destinées à des patients ayant déjà reçu au moins deux lignes de traitement. Cette étude recrute au total 27 patients, 22 ayant une Leucémie Aigüe Lymphoblastique (LAL), 4 un Lymphome malin Non Hodgkinien (LNH) et le dernier une Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC).

Les résultats obtenus ont été publiés en 2018, où les auteurs présentent les résultats de cytotoxicité et les test *in vivo* réalisés (137), puis en 2020 où ils présentent la caractérisation des cellules produites chez les 27 patients (138). Nous détaillerons dans cette partie d'abord la production des cellules, les contrôles qualité mis en place par l'équipe et leur résultats. Enfin, les résultats cliniques publiés en février 2021 (139) seront brièvement présentés.

##### i. Production

Cette équipe a travaillé en système semi-clos avec un semi-automate *CliniMACS Prodigy*® (Miltenyi Biotec) se chargeant des actions de sélection, d'activation, de transduction et d'expansion dans le même appareil.

Dans leur cas, le but de la production de cellules CAR-T est la production de 2 doses de cellules modifiées, à une concentration de  $10^6$ /kg pour les patients LAL et LLC et  $5 \times 10^6$ /kg pour les patients LNH. Dans cette étude, 27 patients sont inclus

Après la leucaphérèse, les cellules non désirables résiduelles sont éliminées par centrifugation. Le produit centrifugé est enrichi en lymphocytes T par sélection positive CD4 et CD8. Un échantillon de  $100 \times 10^6$  lymphocytes T est récupéré et mis en culture, puis activé pendant 24h par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28. Après les 24h d'activation, les cellules sont transduites à l'aide d'un vecteur lentiviral. Le vecteur

lentiviral utilisé par cette équipe a été développé et produit spécifiquement par eux même. Les cellules sont cultivées dans un milieu contenant de l'IL-7 et de l'IL-15 pendant 8 à 9 jours, temps nécessaire estimé pour obtenir le nombre minimal de cellule, soit  $35 \times 10^6$  cellules et une expression du CAR >20%. En moyenne,  $3\,780 \times 10^6$  cellules étaient obtenues avec environ 36% de ces cellules exprimant le CAR après 8 à 11 jours de culture. Le résumé de la production est disponible tableau VII.

Tableau VII Résumé des étapes la production de cellules CAR-T par l'équipe espagnole.

<b>Résumé de la production des cellules CAR-T anti-CD19</b>	
Leucaphérèse	
Enrichissement	Elimination des autres CMN par centrifugation avec gradient de densité.
Sélection	Billes magnétiques coatés par des anti-CD4/CD8
Début de la production	
J0 activation : $100 \times 10^6$ lymphocytes T	Anti CD3/CD28, durée de 24h Supplémentation en IL-7 et IL-15
J1 Transduction : MOI = 10	Vecteur lentiviral durée 48h
J3 Expansion	Milieu de culture avec IL-7 et IL-15, durée de 7 à 10 jours, en moyenne 8,5jours
J10 Fin de la production : $3\,780 \times 10^6$ cellules totales dont 35,8% de cellules CAR+ soit $1\,353 \times 10^6$ cellules CAR-T. En moyenne sur tous les produits finaux.	Dose cible de $10^6$ /kg patients LAL ou $5 \times 10^6$ /kg patients LNH, formulée dans 100mL de sérum physiologique et 1% de <i>Human Serum Albumine</i> HSA
Fin de la production	
Réinjection	Cryopréservation préalable

En moyenne, l'équivalent de 9 doses est produit pour les patients adultes LAL et 25,4 pour la population pédiatrique, tandis que 2,5 doses sont formulées pour les patients atteints de LNH. Il serait donc possible selon l'équipe de raccourcir la durée d'expansion des cellules.

## ii. Contrôles mis en œuvre

### *Contrôles microbiologiques*

L'équipe a sous-traité à un laboratoire certifié les contrôles microbiologiques de la pharmacopée européenne. L'ensemble des critères libératoires de l'équipe est résumé dans le tableau VIII.

Le calcul du nombre de copies de vecteur (VCN) par cellule est réalisé par qPCR, une séquence cible spécifique du vecteur lentiviral est ciblée et détectée dans chacun des produits cellulaires, pour un nombre moyen de 0,4 à 2,9 copies / cellules. Une corrélation positive a été faite entre le nombre moyen de copies et l'expression phénotypique du CAR. Comme vu précédemment, il est nécessaire que ce ratio soit le plus bas possible pour être efficace. L'équipe avait décidé d'une limite libératoire de VCN inférieure à 10 copies.

### Contrôles de la cytotoxicité

La cytotoxicité des cellules a été évaluée par la lyse *in vitro* d'une lignée cellulaire NALM6 CD19 positive. Un contrôle négatif a été mis en place en parallèle, où des lymphocytes T non transduits ont été cultivés dans les mêmes conditions que les cellules ARI-0001. Un contrôle de spécificité de la toxicité est réalisé en parallèle, avec une co-incubation des cellules effectrices avec des cellules d'une lignée tumorale CD19 négative et CD33 positive HL60.

A la fin de la co-incubation, les cellules sont transférées dans des tubes et incubées avec des anticorps anti CD4/8, CD19, CD33 et du 7-AAD. La cytotoxicité est déterminée en calculant le nombre de cellules cibles (lignée NALM6) encore viables, identifiées comme les cellules CD19 positive, 7-AAD négative, visualisable figure 22. Aucune toxicité spécifique n'est observée vis-à-vis des cellules HL60 CD19 négative.

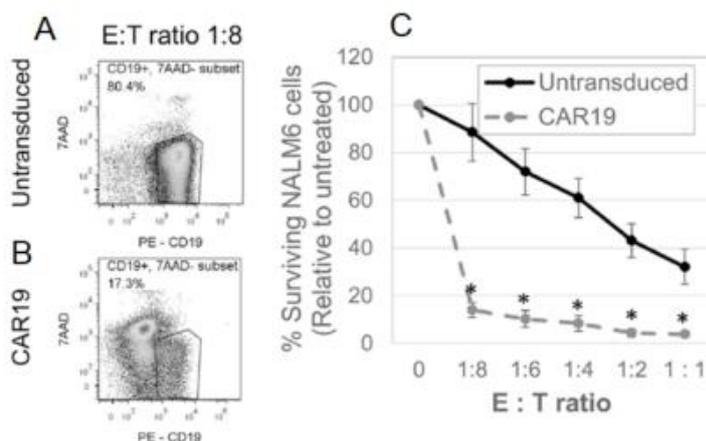


Figure 22 Résultats de cytotoxicité obtenus avec les cellules ARI-0001

A : Contrôle négatif, aucune lyse des cellules cibles avec des lymphocytes T non transduits pour un ratio de cellules effectrices : cellules cibles = 1 :8 B : Lyse spécifique des cellules cibles par les cellules CAR-T transduites pour un ratio de 1 :8 C : comparaison d'efficacité des lymphocytes T non transduits par le CAR par rapport aux cellules CAR-T à différents ratios. Une lyse non spécifique des cellules NALM6 par les lymphocytes T non transduits est observée pour des ratios cellulaires supérieurs à 1 :8. D'après (137).

## Caractérisation du produit cellulaire

Dans cet exemple, la spécificité de l'anti-CD19 utilisé a été validée avant l'introduction de son gène dans le vecteur. En effet, l'anti-CD19 a été produit directement par l'équipe de recherche, qui détaille cette étape dans une autre de ses publications (140). L'équipe a ainsi intégré la séquence d'ARN de cet anti-CD19 à un vecteur lentiviral.

L'efficacité de la transduction est évaluée par le marquage du CAR membranaire en CMF. Etant donné que la construction de CAR choisie comporte un ScFv d'origine murine, l'équipe utilise en CMF un anticorps anti-idiotype (anti-souris) couplé à un fluorochrome (APC), comme présenté figure 11A. L'expansion est aussi contrôlée par des numérations régulières des lymphocytes, comme vu sur la figure 23.

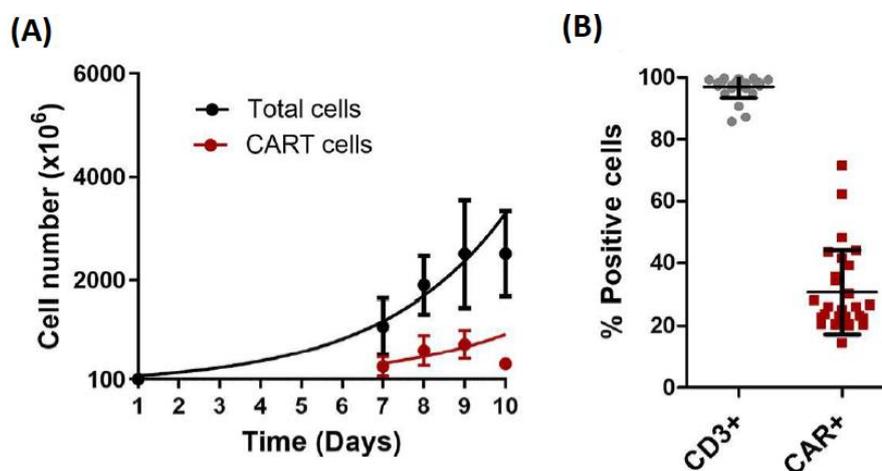


Figure 23 Expansion des ARI-0001 au sein du CliniMACS Prodigy ®

(A) Cinétique d'expansion des cellules CAR+ en rouge par rapport aux lymphocytes totaux en noir. Les écarts types sont représentés. (B) Pourcentage moyen avec écarts types de lymphocytes CD3+ et CAR+ par CMF sur le produit cellulaire final.

Afin d'analyser l'impact des conditions de culture et de la transduction sur le phénotype des populations lymphocytaires T, la composition du produit cellulaire lors des étapes clés est contrôlée en CMF. Sur la figure 24, on peut voir l'influence de la transduction sur les lymphocytes T CD4 et T CD8 positifs. Les types de lymphocytes T obtenus par aphérèse, après la sélection CD4/CD8 et à la fin de la production sont comparés. On observe une inversion du ratio CD4/CD8 entre la sélection CD4/8 et la fin de la production. Les lymphocytes T CD4 intègrent mieux le CAR à leur génome.

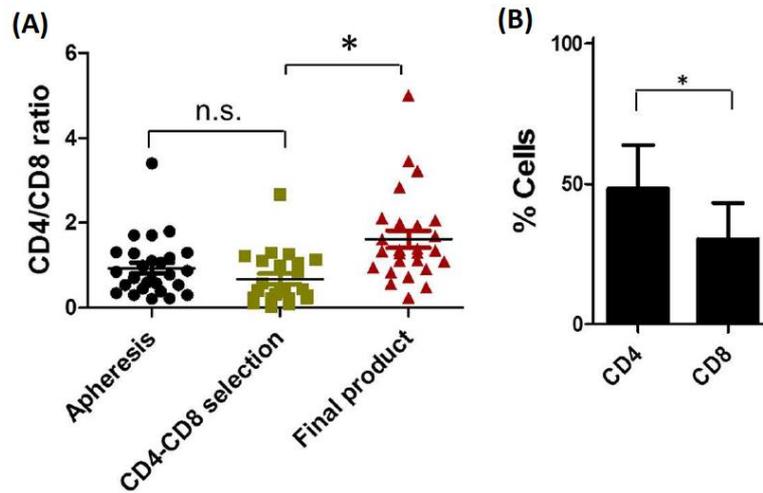


Figure 24 Caractérisation des lymphocytes T entre CD4+ et CD8+.

(A) Ratio CD4/CD8 des produits d'aphérese, après sélection des CD4 et CD8 et du produit final. (B) Efficacité de transduction du CAR anti-CD19 dans les cellules CD4 et CD8. Moyenne +/- écarts types. n.s. : non statistiquement significatif

De la même façon, l'équipe a comparé les sous-populations de lymphocytes T entre le début et la fin de la production. En effet, si les lymphocytes T CD4+ étaient plus à même d'intégrer le vecteur, il était possible que certains sous types de lymphocytes T prolifèrent davantage que d'autres. On observe sur la figure 25 une majorité de lymphocytes CM et EM en fin d'expansion, par rapport aux lymphocytes naïfs et effecteurs. En revanche, aucune différence significative n'est observée dans les sous-types cellulaires entre les lymphocytes transduits et non transduits. La transduction influencerait donc peu sur la prolifération d'un sous-type particulier.

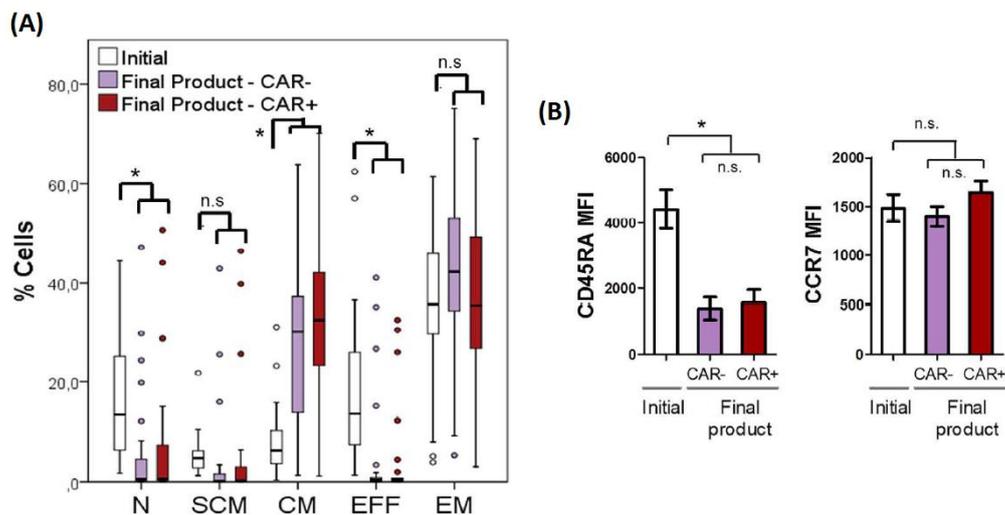


Figure 25 Caractérisation des sous-populations des cellules ARI-0001.

(A) Pourcentage des sous-populations après la sélection des CD4 et CD8 poolés entre les produits du début et de la fin selon leur expression du CAR. (B) Différences de l'intensité moyenne de fluorescence MFI de l'expression de CD45RA et CCR7 entre les produits du début et de la fin de la production. \* : différence statistiquement significative et ns : non statistiquement significative.

L'expansion des cellules CAR-T après co-incubation avec leurs cellules cibles NALM6 est évaluée figure 26. Une expansion doit être observée lors de la co-incubation avec ces cellules, mais pas lors d'une co-incubation avec des cellules n'exprimant pas le CD19. Un indice de prolifération est calculé avec la formule suivante :

$$\text{Prolifération} = \frac{\text{Nombre de cellules des différentes générations}}{\text{Nombre de cellules initialement dénombré}}$$

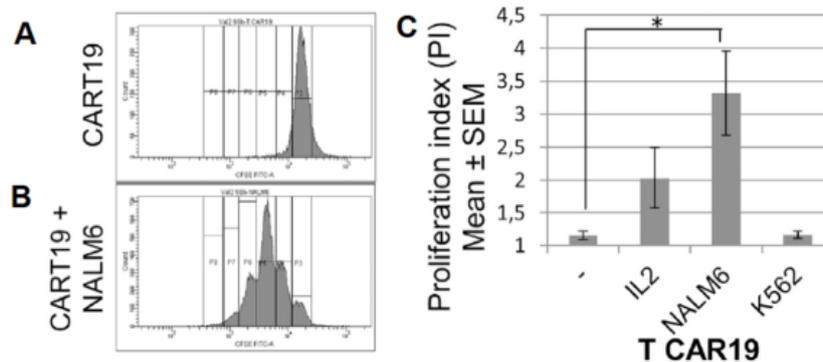


Figure 26 Prolifération in vitro des cellules ARI-0001.

A et B : prolifération in vitro des cellules CAR-T par CFSE avec marquage au CFSE après 96h de co-incubation entre les cellules CAR-T et des cellules cibles B ou des cellules CAR-T seules A. C : indice de prolifération après une incubation seule de cellules CAR-T ou une co-incubation des cellules CAR-T avec de l'IL-2, ou des cellules cibles CD19+ NALM6 ou des cellules CD19- K562. Les cellules CAR-T ne prolifèrent pas significativement si elles ne sont pas co-incubées avec leurs cellules cibles.

La production de cytokines par les cellules CAR-T après une co-incubation avec les cellules cibles NALM6 a été étudiée dans les deux publications. Comme pour les protocoles précédents, des témoins négatifs (culture des cellules CAR-T seules, et co-incubation de lymphocytes non transduits avec les cellules cibles) sont mis en place pour s'assurer de la spécificité de la réponse des cellules CAR-T contre leurs cellules cibles. Après 16h de culture, les cytokines inflammatoires (IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$ ) et anti-inflammatoires (IL-10) du surnageant cellulaire sont dosées (figure 27).

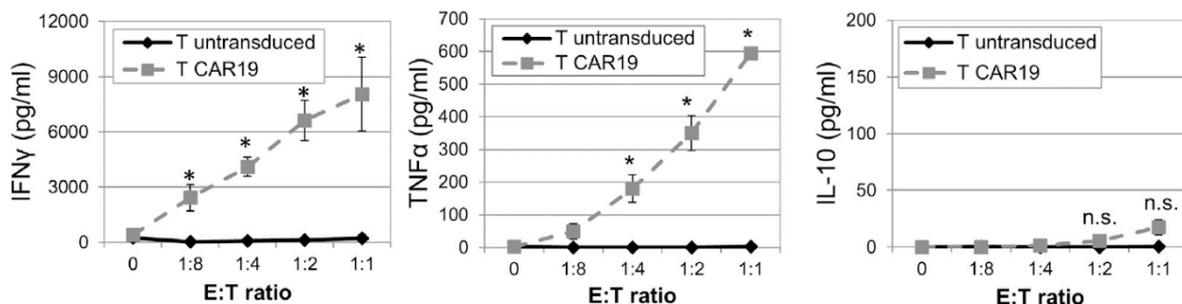


Figure 27 Dosage des cytokines par ELISA dans le surnageant.

On observe la sécrétion d'IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$  pro-inflammatoire par les cellules CAR-T co-incubées avec leurs cellules cibles, mais pas de sécrétion d'IL-10 anti inflammatoire. \* Statistiquement significatif ; ns non statistiquement significatif.

Une grande partie des contrôles détaillés dans les publications de cette équipe est destinée à des fins de recherche. Néanmoins, les critères de libération des cellules ARI0001 ont été publiés et se trouvent dans le tableau VIII. Les critères référencés s'appuient sur des tests qui doivent être obligatoirement répétés pour chacune des productions.

*Tableau VIII Spécification et critères d'acceptation des cellules CAR-T ARI-0001 produites par l'équipe de l'Hospital Clinic de Barcelona.*

*Un Neubauer désigne un hémocytomètre permettant la numération des cellules nucléées grâce à une grille. Le bleu de trypan est un colorant d'exclusion, pénétrant le cytoplasme des cellules mortes.*

Parameter	Method	Acceptance criteria
Appearance	Visual inspection	Cloudy liquid solution
Number of CAR19+ cells	Neubauer and flow cytometry	>0.5 x 10 <sup>6</sup> CART cells/kg
% CAR19 cells	Flow cytometry	≥20%
% CD3	Flow cytometry	≥70%
% Cell viability	Neubauer – trypan blue	≥70%
Sterility	Microbial growth	Sterile
Mycoplasma	PCR	Absent
Endotoxin	Chromogenic assay	≤0.5EU/ml
Adventitious virus	PCR	Absent
Transgene copies / cell	Real-time PCR	≤ 10 copies / cell
RCL	Real-time PCR	Absent
Potency	Flow cytometry	<70%*

\* NALM6 cell surviving fraction using CART19 ratio E:T 1:1

## 2. Production détaillée par une équipe américaine

L'équipe américaine du *Medical College of Wisconsin*, de Milwaukee aux Etats-Unis, a également produit des cellules CAR-T à l'aide du semi-automate CliniMACS Prodigy® de Miltenyi Biotec, avec un vecteur lentiviral (141–143).

L'originalité de leur approche a été la production de cellules CAR-T bispécifiques anti-CD19 et anti-CD20, le CD20 étant un autre marqueur spécifique des lymphocytes B. Un ciblage simultanée de deux marqueurs différents des lymphocytes B, le CD19 et le CD20, résulte en une meilleure destruction de ceux-ci et donc à un moindre risque d'échappement tumoral (144). Ils ont alors expérimenté la production de cellules CAR-T anti-CD19/CD-20 à partir de lymphocytes de donneurs sains (142).

Ensuite, cette équipe a mené le premier essai chez l'Homme de cellules CAR-T autologues bispécifiques anti-CD19/CD20, dans des hémopathies B réfractaires et en rechutes (143). Ils ont voulu initialement inclure 26 patients mais 4 d'entre eux n'ont pas pu l'être, dû à un nombre de cellules CAR-T insuffisant en fin de production. Ils ont été traité mais non inclus dans l'étude. L'étude a donc inclus 22 patients, avec une réinjection de produit cellulaire frais (n=15) ou cryopréservé (n=7) à cause de complications cliniques. Parmi ces 22 patients, 11 souffraient d'un lymphome diffus à

grande cellules B (*Diffuse Large B Cell Lymphoma* DLBCL), 7 souffraient de lymphomes du manteau (*Mantle Cell Lymphoma* MCL), et un dernier de lymphome folliculaire (*Follicular Lymphoma* FL). Trois patients souffraient de LLC dont 2 transformées en syndrome de Richter. Un patient avait déjà bénéficié d'une thérapie par cellules CAR-T anti-CD19 industrielles. L'expansion *in vitro* et *in vivo* et l'efficacité de la transduction étaient moindres chez ce patient. Il est possible, selon l'équipe, que la réaction immunitaire vis-à-vis de la partie murine du CAR anti CD19 ait provoqué cette baisse d'efficacité, les deux CAR (le CAR anti CD19 industriel et le CAR bispécifique académique) comportant une partie murine.

#### i. Production

La production est commencée sur des cellules mononucléées fraîches, dans les 24h suivant l'aphérèse. Ces cellules sont enrichies en lymphocytes CD4 et CD8. Le nombre de cellule après enrichissement au début de la production était fixé à  $10^8$  cellules. Le résumé de la production est tableau IX.

Le pourcentage moyen de cellules CAR+ en fin de production était de 17,5%, soit en moyenne  $5,76 \times 10^8$  cellules CAR+ dans le produit final.

Tableau IX : Résumé de la production américaine

<b>Schéma de production des cellules CAR-T anti-CD19</b>	
Leucaphérèse	
Enrichissement	
Sélection	Billes magnétiques coatées par des anti- CD4/CD8
Début de la production	
J0 activation : $10^8$ lymphocytes T	Anti CD3/CD28, durée de 24h Supplémentation en IL-2
J1 Transduction MOI = 10	Vecteur lentiviral durée 48h
J3 Expansion	Milieu de culture avec IL-7 et IL-15, durée de 7 à 10j, en moyenne 8,5j
J14 Fin de la production $576 \times 10^6$ cellules CAR-T. 17,4% de cellules CAR+ en moyenne sur tous les produits finaux, soit $3310 \times 10^6$ cellules totales	Dose cible de $2,5 \times 10^6$ cellules/kg
Fin de la production	

## ii. Contrôles réalisés

Lors des contrôles de l'essai clinique de cette équipe (143), les seuls contrôles effectués sont ceux imposés comme contrôles libératoires, ainsi que deux contrôles d'efficacité. Ainsi, il n'a pas été réalisé de caractérisation plus poussée que le pourcentage de cellules CAR+ et le ratio de cellules CD4/CD8 sur les cellules CAR-T autologues. En revanche, lors du développement des cellules CAR-T avec des cellules allogéniques issus de donneurs sains, la caractérisation des sous types lymphocytaires T a été réalisée (142).

### *Contrôles microbiologiques*

L'équipe américaine n'a quasiment pas mentionné les contrôles microbiologiques effectués. On sait simplement que le contrôle de la stérilité a été effectué à J8 et en fin de production. Le VCN est effectué en fin de production mais sans mention du résultat.

### *Contrôles d'efficacité*

Cette équipe a contrôlé l'efficacité des cellules CAR-T autologues produites par un test de relargage du chrome 51, ainsi que par un marquage en CMF de l'IFN $\gamma$  intracellulaire. Ces tests sont effectués en cours de production (J8) et en fin de production, avec un produit cryopréservé.

Pour le test de relargage du chrome 51, un échantillon du produit cellulaire total est co-incubé pendant 4 à 5h avec les cellules cibles (cellules Raji, CD19 et CD20 positives) préalablement marquées au chrome 51 comme présenté figure 17. Un contrôle négatif avec une co-incubation avec des cellules CD19 et CD20 négatives (cellules U2OS) est mis en place en parallèle. Les ratios cellules effectrices : cellules cibles varient de 100 : 1 à 12,5 : 1. Les cellules CAR-T sont aussi co-incubées avec des cellules de la biopsie de lymphome d'un patient en rechute. A titre d'exemple, les résultats obtenus pour le patient 3 sont présentés dans le tableau X. Le patient était en rechute malgré le traitement par cellules CAR-T, et son lymphome (DLBCL) biopsié.

Tableau X : Contrôle du relargage de Chrome 51 par les cellules cibles lors de leur co-incubation avec les cellules CAR-T bispécifiques.

Lyse spécifique  $\pm$  écart type (143).

**Cytotoxicity Assay (using the patient's frozen final product CAR T cells as effectors in the assay):**

E : T ratio	Raji	U2OS	Biopsy
100	36.3 $\pm$ 2.0	6.4 $\pm$ 0.6	9.5 $\pm$ 2.2
50	23.0 $\pm$ 3.7	3.7 $\pm$ 1.8	6.3 $\pm$ 0.3
25	10.1 $\pm$ 1.0	4.3 $\pm$ 1.3	2.7 $\pm$ 1.4
12.5	3.0 $\pm$ 1.9	2.1 $\pm$ 1.4	2.4 $\pm$ 0.3

Le deuxième contrôle mis en œuvre afin d'évaluer l'efficacité des cellules CAR-T a été le marquage intracellulaire de l'IFN $\gamma$  en CMF. Un échantillon du produit cellulaire est co-incubé avec des cellules Raji CD19+ et CD20+, des cellules U2OS CD19- CD20-, un contrôle positif (Entérotoxine B du staphylocoque, SEB), et un échantillon de biopsie. Les cellules étaient marquées avec des anticorps anti-CD3, CD4, CD8, IFN $\gamma$  couplés à des fluorochromes. Les résultats sont visualisables figure 28. On peut voir que le marquage de l'IFN $\gamma$  est nul pour les cellules CAR-T co-incubées avec des cellules CD19- et CD20-, avec les cellules de biopsie chez le patient 3, souffrant d'un DLBCL en rechute. En revanche, l'IFN $\gamma$  est détecté pour les cellules CAR-T co-incubés avec les cellules CD19+, CD20+ et avec le contrôle positif. Chez ce patient, plus de 50% des lymphocytes T circulants étaient CAR+, mais cette proportion était diminuée à environ 20% lors du marquage de la biopsie en immunohistochimie.

**IFN $\gamma$  Intracellular Cytokine Assay:**

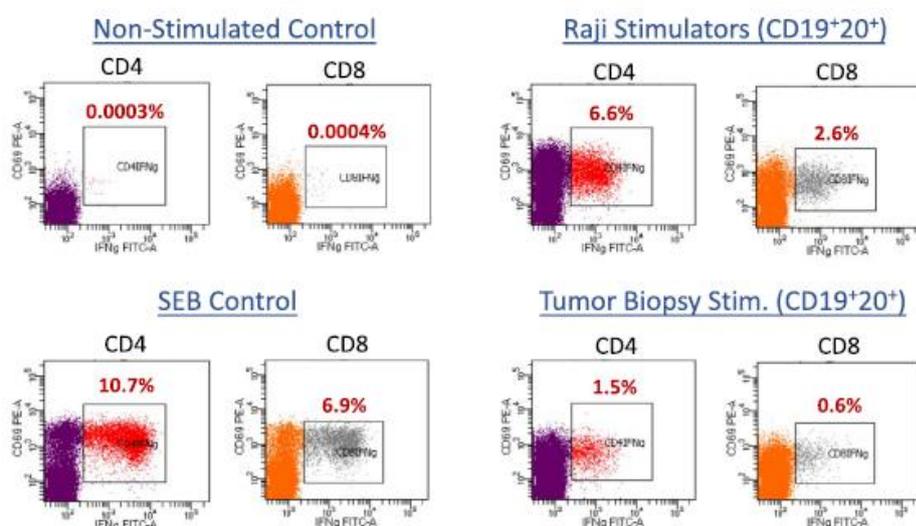


Figure 28 : Marquage de l'IFN $\gamma$  intracellulaire des cellules CAR-T obtenues pour un patient, après différentes co-incubation.

L'IFN $\gamma$  intracellulaire est exprimé dans les cellules CAR-T co-incubées avec le contrôle positif (SEB control) et les cellules Raji. Il n'est pas exprimé dans les cellules CAR-T co-incubées avec les cellules CD19 et CD20 négatives, ni dans les cellulés CAR-T co-incubées avec les cellules du lymphome du patient.

On constate sur le tableau X et la figure 29 une absence d'efficacité des cellules CAR-T sur les cellules de biopsie de lymphome du patient 3 en rechute. La lyse est quasi identique à la lyse des cellules CD19- et CD20-, très en dessous de la lyse spécifique des cellules Raji. L'expression de l'IFN $\gamma$  intracellulaire est aussi inférieure pour les cellules CAR-T co-incubées avec les cellules du lymphome plutôt qu'avec les cellules CAR-T co-incubées avec les cellules Raji. Les cellules du lymphome du patient expriment cependant le CD19 et le CD20 avec la même intensité qu'avant le traitement (marquage CD19 et CD20 sur biopsie). Cette absence d'activité est mise sur le compte d'une activité inhibitrice des cellules du lymphome sur les cellules CAR-T.

### Caractérisation du produit cellulaire

Le marquage du CAR a été fait en deux temps avec la protéine L biotinylée, puis un marquage de la biotine avec de la streptavidine couplée à un fluorochrome. La protéine L est une protéine se fixant à la partie VL du CAR (145). Le tableau XI montre les moyennes des résultats obtenus lors de la production des différents produits cellulaires.

Tableau XI : Données de la production des cellules CAR-T bi-spécifiques anti-CD19/CD20

<sup>a</sup> Toutes les données sont des valeurs moyennes  $\pm$  l'écart type <sup>b</sup> Les données à J0 après l'enrichissement en CD4/8, avant la culture. par Shah NN et al., (143)

Parameter (Mean $\pm$ SD) <sup>a</sup>	Apheresis Product	Day of Culture		
		0 <sup>b</sup>	8	14
% CD3 T-cells	41.8 $\pm$ 20.9%	85.5 $\pm$ 9.6%	98.7 $\pm$ 1.6%	99.1 $\pm$ 1.3%
CD4:CD8 ratio (total T-cells)	1.6 $\pm$ 1.7	1.8 $\pm$ 1.6	3.5 $\pm$ 3.5 **	2.0 $\pm$ 2.2
CD4:CD8 ratio (CAR T-cells)	NA	1.8 $\pm$ 1.6 *	5.1 $\pm$ 5.6	3.1 $\pm$ 2.7
# CD3 T-cells	NA	1.00e8 $\pm$ 0	1.16e9 $\pm$ 0.47e9	3.33e9 $\pm$ 0.91e9
Fold total CD3 Expansion	NA	NA	11.7 $\pm$ 4.7	33.3 $\pm$ 9.1
% T-cells Transduced	NA	NA	14.4 $\pm$ 6.0%	17.4 $\pm$ 5.3%
# CAR T-cells	NA	NA	1.81e8 $\pm$ 1.26e8	5.76e8 $\pm$ 2.42e8
% Viability (trypan blue)	99.7 $\pm$ 0.5%	97.8 $\pm$ 2.8%	95.5 $\pm$ 2.6%	93.4 $\pm$ 2.7%

La caractérisation des sous types lymphocytaires T a été réalisée dans la première publication de l'équipe (142), figure 29, mais n'a pas été faite lors de l'essai clinique.

Les données obtenues entre le début et la fin de la production montrent une diminution du phénotype terminal (Effecteur, CD45RA+ CD62L-) et effecteur mémoire (EM,

CD45RA- CD62L-), au profit essentiellement des phénotypes centraux mémoires (CM, CD45RA- CD62L+) et dans une moindre mesure naïfs (N, CD45RA+, CD62L+).

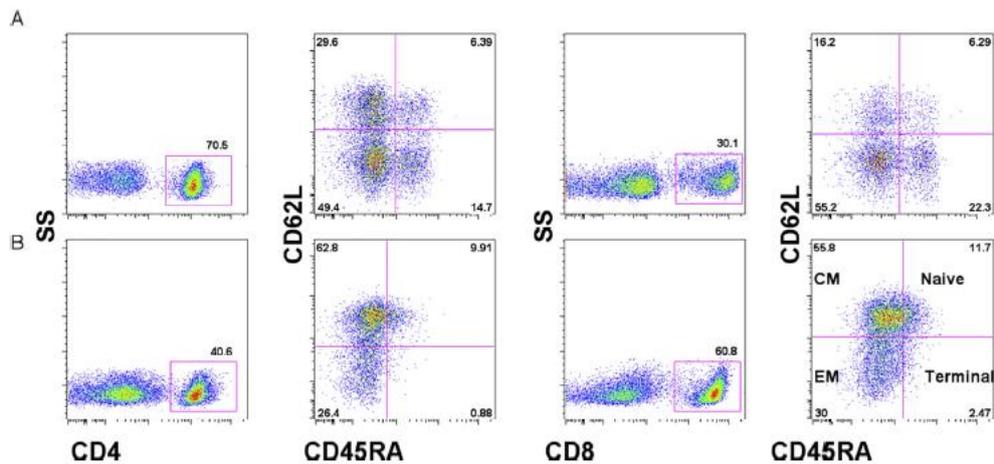


Figure 29 : Phénotypes des sous-populations T entre le début et la fin de la culture.

A : cellules CD4/8 de début de culture. B : cellules CAR-T en fin de production.

### iii. Résultats cliniques

Les résultats obtenus ont été publiés (143). Pour les 14 patients en rémission complète à 28 jours, la durée médiane de réponse n'a pas été atteinte (temps médian de suivi : 10,1mois). Pour les 4 patients en rémission partielle à 28 jours, la durée médiane de réponse était de 2,3 mois. 4 patients avaient une maladie progressive au 28<sup>e</sup> jour.

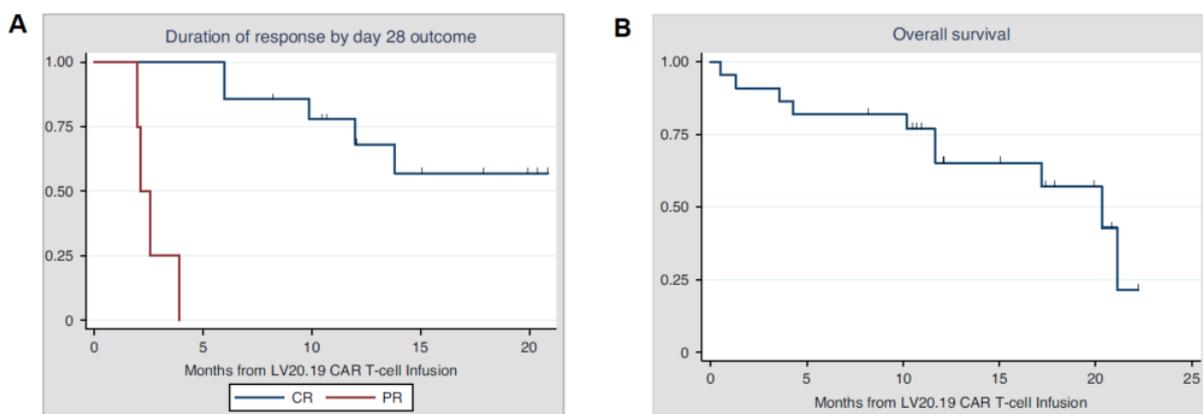


Figure 30 : Résultats cliniques avec courbe d'estimation de Kaplan-Meier.

A : Durée de la réponse entre les patients en rémission complète (CR) à 1 mois et les patients en rémission partiel (PR) à 1 mois. B : Survie globale des 22 patients inclus dans l'étude, médiane de 20,3 mois.

### 3. Comparaison des productions espagnole et américaine

Les deux équipes ont montré que la production académique de cellules autologues avec l'utilisation du CliniMACS Prodigy® était possible, dans un délai inférieur à celui

proposé par les industriels utilisant une production centralisée. Les deux productions sont comparées sur le tableau XII.

Tableau XII Comparaison des résultats obtenus lors des deux productions, espagnole et américaine.

<sup>a</sup> Après enrichissement magnétique en CD4/CD8.

	Production espagnole	Production américaine
Patients	n=27 dont 22 LAL, 4 LNH et 1 LLC  Adultes et enfants	n=22 dont 19 LNH et 3 initialement LLC (2 transformations en syndrome de Richter)  Adultes uniquement
Récepteur	Anti CD19	Bispécifique en tandem Anti CD19/CD20
Transduction	Lentiviral, production maison	Lentiviral, fourni par Miltenyi
Quantité de cellules en début de production <sup>a</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>
Phénotypage produit d'aphérèse	CD4/CD8 = 0,9±0,7	CD4/CD8 = 1,8±1,6
<i>Multiplicity of Infection</i>	10	10
Dose cible (cellules CAR-T / kg)	10 <sup>6</sup> cellules / kg LAL 5x10 <sup>6</sup> cellules / kg LNH	2,5x10 <sup>6</sup> cellules / kg
Durée de production	10 jours	14 jours
Quantité de cellules totale en fin de production	3 780x10 <sup>6</sup>	3 300x10 <sup>6</sup>
Marquage du CAR	Anticorps anti-idiotype couplé à un fluorochrome	Protéine L associée à la biotine, streptavidine couplée à un fluorochrome
Expression du CAR	35,8%	17,4%
Quantité moyenne de cellules CAR-T en fin de production	1 353x10 <sup>6</sup>	576x10 <sup>6</sup>
Phénotypage produit final	CD4/CD8 = 1,6±1  %CM = 31±16,7 %EM = 35,1±17,7	CD4/CD8 = 2±2,2  %CD4 CM = 55,8 %CD8 CM = 62,8 %CD4 EM = 26,4 %CD8 CM = 30
Viabilité produit final au bleu de trypan	98%	93,4±2,7%

Les deux protocoles utilisés, ainsi que les patients inclus entraînent des variations dans les quantités de produits cellulaires obtenus. Les produits finaux restent cependant efficaces *in vitro* avec les contrôles effectués sur des lignées cellulaires commerciales.

Ces deux exemples de production sont intéressants pour la mise en place d'une production académique au sein du CHU de Lille. En effet, elle permettra la comparaison de nos résultats avec les résultats de ces équipes.

Les publications de ces deux équipes montrent que la production de cellules CAR-T académique avec l'utilisation du CliniMACS Prodigy® est possible avec différents récepteurs transduits. D'autres protocoles de production de cellules CAR-T académiques existent aussi sans utilisation d'un semi-automate, comme cet exemple de production en Israël par Itzhaki et al., (146–148).

## IV. Transposition au CHU de Lille

### 1. Expérience lilloise en thérapie cellulaire

#### i. Expérience en service clinique

L'expérience acquise au laboratoire a été possible grâce au large recrutement de patients effectué par le service d'hématologie clinique du CHU. En effet, entre début septembre 2018 et fin octobre 2021, ce ne sont pas moins de 123 patients qui ont pu bénéficier de traitement par cellules CAR-T au CHU, en recevant différents produits présentés figure 31.

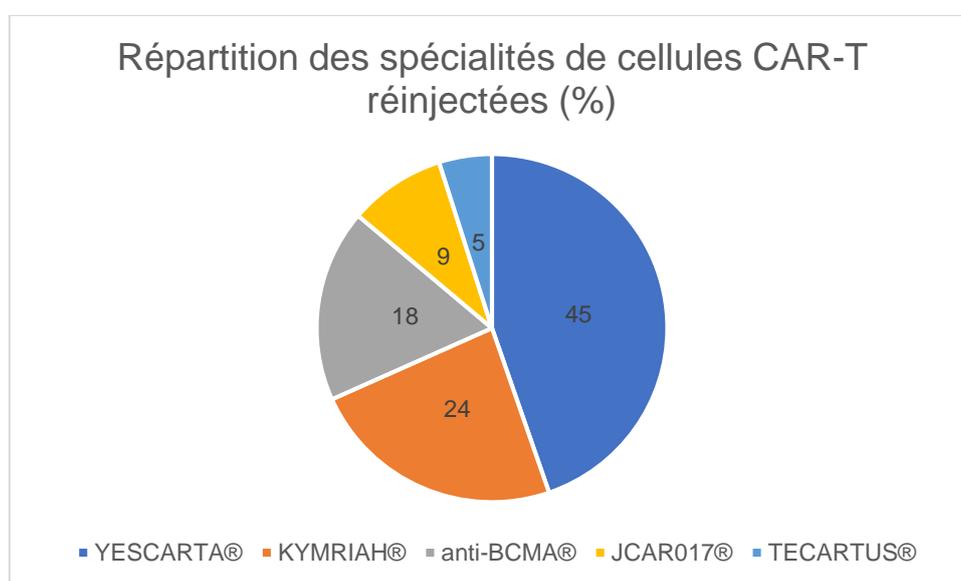


Figure 31 : Proportion (%) des différentes spécialités réinjectées aux patients du CHU de Lille.

Les cellules anti-bcma réinjectées regroupent toutes les spécialités utilisées à Lille dans le myélome : essai CARTITUDE (149), bb2121 (9), Les cellules JCAR017 (ou liso-cel) sont en essais cliniques de phase 1 (150) Les pourcentages de chaque spécialités réinjectés sont indiqués.

#### ii. Expertise en contrôles microbiologiques de thérapies cellulaires

Le CHU de Lille bénéficie déjà d'une plateforme de biothérapies autorisée par l'ANSM pour la préparation d'îlots de Langerhans autologues et allogéniques. Cette plateforme dédiée à la production de préparations de thérapies cellulaires (PTC) à but thérapeutique est validée par l'ANSM pour les essais cliniques de PTC.

Cette activité dans le domaine de la greffe d'îlots a permis aux laboratoires de bactériologie et de mycologie du CHU de Lille d'acquérir une expérience des contrôles microbiologiques sur des produits cellulaires. Le laboratoire de bactériologie réalise l'incubation de flacons d'hémoculture servant de bouillons d'enrichissement. Ces

flacons sont ensemencés à plusieurs moments de la production d'îlots : avec le milieu de transport du pancréas, avec un échantillon de pancréas mis en suspension, des échantillons avant et après purification, et après le 1<sup>er</sup> changement de milieu. Si le flacon est positif, la bactérie est remise en culture sur une gélose dans une boîte de Petri, identifiée et l'antibiogramme est réalisé. Il n'y a pas de test rapide en biologie moléculaire réalisé, les contrôles ont un but rétrospectif.

### iii. Expertise au laboratoire de virologie

Une autre structure du CHU de Lille participe au suivi des cellules CAR-T chez le patient (151). En effet, le laboratoire de virologie utilise des techniques de biologie moléculaire afin de détecter le vecteur viral dans les lymphocytes modifiés. Pour le moment, les spécialités pouvant être détectées par PCR sont le tisagenlecleucel et l'axicabtagene ciloleucel.

Le tisagenlecleucel (Kymriah®) de Novartis est fabriqué grâce à un vecteur lentivirus qui peut être suivi par certaines troupes qPCR de détection du VIH (152). En revanche, l'axicabtagene-ciloleucel (Yescarta®) de Kite/Gilead est produit à l'aide d'un  $\gamma$ -rétrovirus et il n'existe à ce jour pas de trousse PCR commerciale permettant de suivre son expansion. Le laboratoire a donc mis au point une méthode pour suivre l'expansion des cellules CAR-T suite à l'injection du Yescarta® en se basant sur la structure du vecteur lentiviral utilisé pour sa production. Des exemples de résultats obtenus sont figure 32.

A partir du vecteur utilisé, le « *mouse stem cell virus* » ou « virus des cellules souches murines » dont la séquence avait été publiée précédemment (153), l'équipe a pu mettre au point une technique de PCR quantitative plus aisée à effectuer dans un laboratoire de routine par rapport aux techniques de PCR digital (d(d)PCR) préalablement développées (154,155). La d(d)PCR est plus sensible, plus spécifique et plus reproductible que la qPCR dans les valeurs basses mais est compliquée à intégrer dans une routine de laboratoire d'analyse.

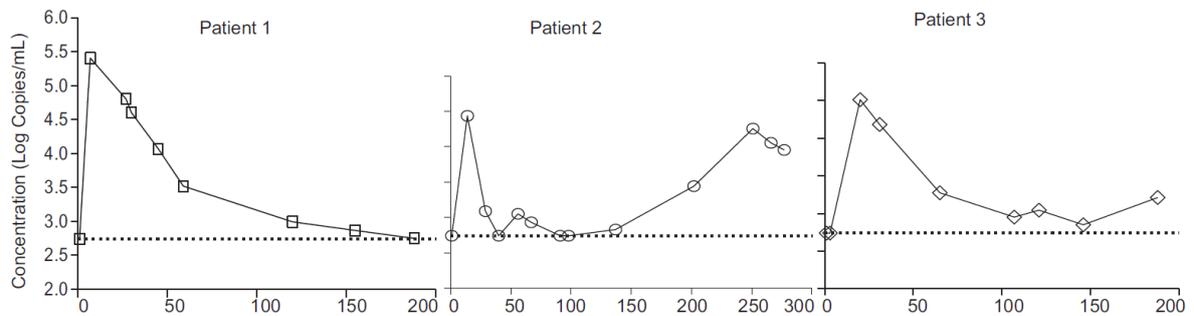


Figure 32 : Exemple de résultat obtenu lors du suivi de trois patients pendant le développement de la méthode.

Cette technique a été développée initialement pour suivre les cellules CAR-T directement chez le patient, et pas dans une optique de contrôle qualité d'une production de cellules CAR-T. En effet, le seuil de détection des cellules CAR-T par qPCR étant inférieur à celui de la CMF, la qPCR permettait une meilleure détection des cellules CAR-T chez le patient. A l'inverse, une poche de cellules CAR-T étant composée à minima de 20% de lymphocytes CAR+, la CMF est donc largement assez sensible pour évaluer leur proportion, et moins coûteuse qu'une technique de biologie moléculaire.

Néanmoins, il s'agit d'une première expérience de biologie moléculaire virale adaptée aux cellules CAR-T. La biologie moléculaire étant une technique obligatoire des contrôles qualité de la production (RCV et VCN), cette expérience acquise au laboratoire de virologie pourra être utile dans les contrôles qualité de virologie.

#### iv. Expérience au laboratoire d'immunologie

##### *Sur les cellules souches hématopoïétiques*

Les travaux de recherche de l'équipe ont montré l'intérêt de caractériser des sous-populations lymphocytaires au sein des greffons de cellules souches hématopoïétiques CSH. En effet, il a été montré qu'une proportion élevée de lymphocytes T CD4+ CCR7+ était un facteur de risque de *Graft versus Host Disease* (GvHD) aiguë, mais sans influence sur les GvHD chroniques (135,136). Cette activité initiée il y a plusieurs années a permis d'acquérir une maîtrise des immunophénotypages au sein des produits de thérapie cellulaire allogéniques.

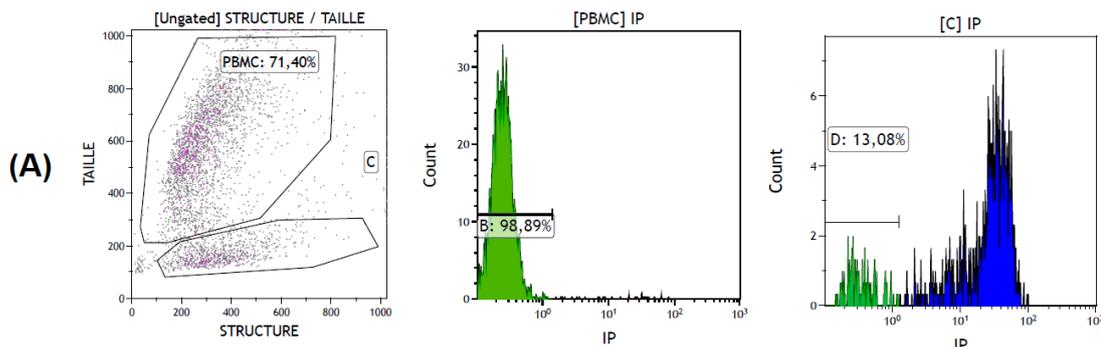
##### *Sur les poches de cellules CAR-T industrielles*

Une étude des poches industrielles (Kymriah® et Yescarta®) après décongélation par la pharmacie à usage intérieur du CHU de Lille a été initiée par le laboratoire

d'immunologie afin de connaître la composition des poches réinjectées aux patients (figure 33).

Dans un premier temps, des essais de viabilité des cellules de la poche Yescarta® ont été réalisés avec un double marquage à l'iodure de propidium (IP) et à l'annexine V chez deux patients. Le but de ce marquage était de comparer le fenêtrage taille/structure en CMF pour évaluer la viabilité, avec les autres marqueurs de viabilité disponible (annexine V et 7-AAD) utilisés pour évaluer la viabilité des cellules.

### Marquage à l'iodure de propidium seul



### Marquage Annexin V + iodure de propidium

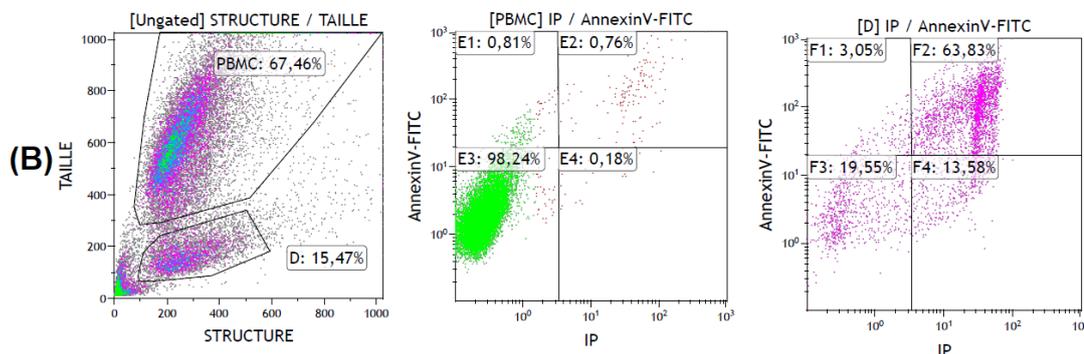


Figure 33 : Viabilité des cellules CAR-T

(A) marquage à l'iodure de propidium seul et fenêtrage selon le graphique taille / structure : l'IP estime bien la viabilité. (B) marquage combiné IP et 7-AAD. Les cellules viables PI- 7-AAD-correspondent bien aux PBMC du graph taille/structure. D'après le travail de Grossemy A.

Ensuite, les cellules des poches de Yescarta® et Kymriah® ont été marquées pour définir les taux de lymphocytes T CD3, CD4, CD8, et les taux de transduction après décongélation en marquant le CAR. Le but était d'abord d'en savoir plus sur la composition des poches, puis de comparer les compositions entre les différentes poches industrielles. L'analyse du contenu cellulaire montre une plus forte proportion de lymphocytes T CD8+ dans les poches de cellules Yescarta®, et également une proportion plus élevée de cellules exprimant le CAR.

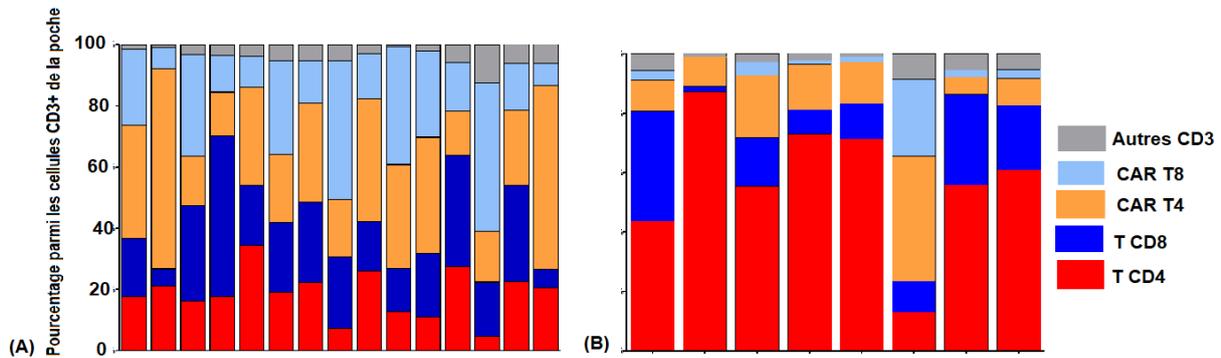


Figure 34 Composition lymphocytaire des poches de cellules CAR-T

(A) Yescarta® (B) Kymriah® d'après le mémoire de master 2 de Grossemy A.

### Suivi des patients traités

Au sein du Centre Hospitalier Universitaire du CHU de Lille, le laboratoire d'immunologie est déjà impliqué dans le suivi des patients ayant reçu des cellules CAR-T industrielles. Un protocole novateur de suivi des cellules modifiées par cytométrie en flux a été développé par une équipe de recherche du laboratoire (69). Ce protocole innove par la cible sélectionnée pour le suivi. En effet, plutôt que de cibler une partie murine du CAR, ou de cibler une partie de protéine ajoutée au récepteur (comme l'EGFR tronquée des études de Turtle et al. (120,124)), cette technique cible directement le ScFv du CAR. Ce marquage a été rendu possible par la mise sur le marché d'une protéine CD19 couplée au FITC. Le FITC-CD19 est reconnu par le CAR, qui pourra alors être visible avec le cytomètre.

Pour le marquage par CMF du sang du patient, deux panels sont utilisés.

- Le premier panel permet la numération des lymphocytes (marquage CD3, CD4, CD8, CD19 et CD16/56) à l'aide de billes et sans étape de lavage. Il permet aussi de marquer le CD20, de façon à marquer des lymphocytes B tumoraux échappant au traitement par cellules CAR-T anti-CD19.
- Le second panel permet de marquer le CAR grâce à une protéine CD19 recombinante couplé à un fluorochrome. Le protocole ayant recours à ce panel comporte des étapes de lavage, mais une numération en valeur absolue des cellules CAR-T est possible en extrapolant le marquage réalisé avec le premier panel, réalisé sur le même prélèvement.

Ce protocole est intéressant car il ne comporte que peu d'étape manuelle (étape de lavage nécessaire uniquement avec le panel 2 d'anticorps) et s'intègre donc bien sur un plateau de CMF de routine avec un temps technique d'environ 1h. De plus, ce

marquage nous permet d'évaluer le ratio CD4/CD8 de l'échantillon. Un exemple de résultat obtenu pour un patient est visible figure 35. Ce panel d'anticorps a rendu possible le suivi longitudinal de 28 patients traités par Yescarta au CHU de Lille.

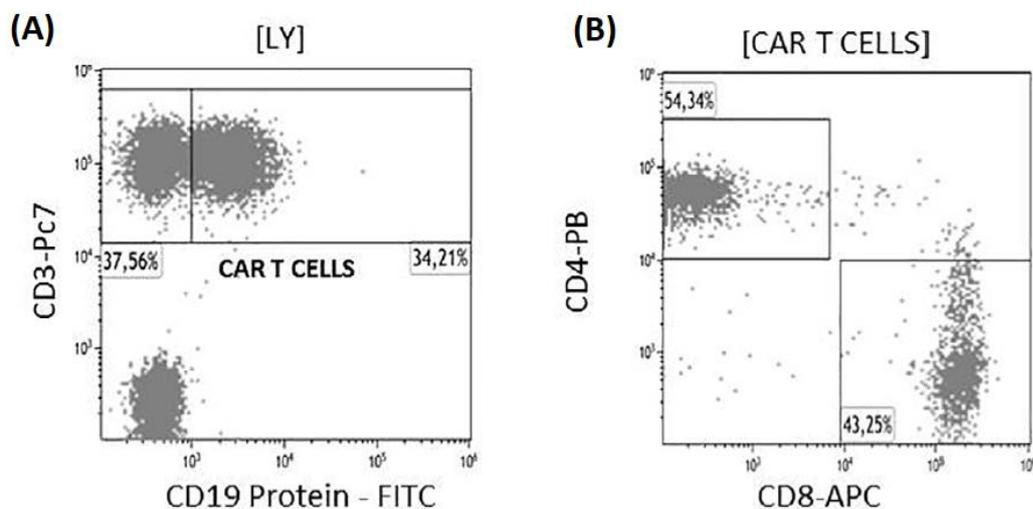


Figure 35 Exemple de marquage obtenu avec la technique développée au CHU de Lille

(A) Fenêtrage sur les lymphocytes, les cellules CAR-T sont celles exprimant le CD3 et l'anti CD19. (B) Répartition des lymphocytes T CD4+ et CD8+ au sein des cellules CAR-T. D'après Demaret et al.

Actuellement, cette technique est utilisée en routine pour le suivi des patients déjà réinjecté, mais elle a aussi fait ses preuves à des fins de recherche pour la caractérisation des cellules avant la réinjection. Elle peut donc être utilisée tout au long du procédé de production de cellules CAR-T ainsi, et pour suivre l'expansion après la réinjection au patient.

## 2. Applicabilité au CHU de Lille et mise en œuvre

### i. Réglementation

En raison de l'existence de cellules CAR-T industrielles anti-CD19 autorisées par l'EMA, la production ponctuelle de cellules de même nature est possible en dehors des indications couvertes par l'AMM des cellules CAR-T anti-CD19 actuellement sur le marché.

Le règlement européen (1394/2007/CE) sur les MTI a été conçu pour encadrer cette nouvelle classe de médicaments au sein de l'Union Européenne. Il permet également, via une « exemption hospitalière », la production de MTI par une unité de thérapie cellulaire autorisée d'un établissement de santé. Cette dérogation rend possible la production pour un usage local et à petite échelle des MTI-pp « préparé ponctuellement » par un établissement de santé autorisé par l'ANSM. Cette production

est réalisée sur la base d'une prescription nominative et est sous la responsabilité exclusive d'un médecin. Il est à noter que la pharmacopée européenne ne comporte pas encore de chapitre dédié aux contrôles d'efficacité des différents MTI-pp ou MTI-exp.

Comme tout médicament commercial ou expérimental, la production de MTI suit des règles regroupées sous le terme de bonnes pratiques de fabrications spécifiques aux MTI (BPF MTI) (156). Les BPF MTI sont divisées en différents chapitres concernant différents aspects de la fabrication des MTI, dont l'un est dédié aux locaux. En effet, les salles de production sont des zones à atmosphère contrôlée (ZAC), classées selon des conditions environnementales précises, prenant en compte la contamination particulaire et microbiologique de l'environnement (les différentes classes de l'environnement sont nommées de A à D où A est la plus propre). Comme tout MTI, les cellules CAR-T peuvent être produites en système dit « ouvert » lorsque le produit est au contact de l'environnement (manipulation devant être réalisée sous une hotte à flux laminaire), ou en système dit « clos » lorsqu'il est manipulé dans un isolateur ou dans des automates avec connexions stériles. Dans le cas d'un système ouvert, la hotte à flux laminaire de classe A devra être placée dans une ZAC de classe B alors que dans le cas d'une production en système clos, l'environnement adjacent pourra être au minimum de classe D. Il faut prendre en considération que les cellules CAR-T sont également des Organismes Génétiquement Modifiés (OGM) et qu'une demande de confinement OGM doit être réalisée auprès du Haut Conseil des Biotechnologies. Dans le cadre de la production automatisée de cellules CAR-T à l'aide de l'automate CliniMACS Prodigy® avec une transduction virale utilisant un lentivirus il faudra envisager un confinement de niveau 2.

## ii. Contraintes techniques

Les médicaments de thérapie innovante sont composés de tissus et/ou de cellules ne pouvant pas subir de stérilisation à l'étape terminale de leur fabrication contrairement aux médicaments conventionnels. C'est pourquoi une production en milieu aseptique et conforme à la réglementation ainsi qu'une analyse de risque des étapes identifiées comme « à risque » doivent être mises en place. La réalisation de trois media process test (MPT) successifs et réussis permettent de confirmer l'asepsie du process. Un MPT consiste à mimer toutes les étapes d'une production en utilisant un milieu de croissance microbiologique qui favorise le développement microbien (type TSB) et qui permet après incubation de mettre en évidence toutes les éventuelles contaminations.

On définit comme réussi tout MPT ne présentant aucune contamination microbienne après 12 jours d'incubation.

Plusieurs difficultés à la mise en place des contrôles existent, (tableau XIII). Tout d'abord, le produit cellulaire, intermédiaire ou final, est précieux car en faible quantité. Ainsi, les méthodes de contrôles qualité doivent être validées avec une quantité minimale de produit définie. Ensuite, le choix de réinjecter les cellules CAR-T de manière fraîche, c'est-à-dire sans passer par des étapes de cryopréservation, oblige à réaliser des contrôles qualités microbiologique en cours de production. Une analyse de risque doit être réalisée afin de valider qu'un produit final pourra être libéré sur la base des résultats des contrôles qualités intermédiaires, sans attendre les contrôles de stérilité de fin de production, qui viendront compléter le dossier de lot *a posteriori*. C'est grâce à l'identification précise des étapes à risque de contamination et à leur maîtrise (connexion des tubulures avec le connecteur stérile type Terumo® par exemple) que cette libération avec les contrôles intermédiaires pourra être faite. Les contrôles microbiologiques finaux sont donc réalisés en temps réel mais complètent le dossier de lot *a posteriori*. Pour finir, la composition de l'échantillon utilisé pour les contrôles doit être représentative de l'ensemble du produit cellulaire : il doit donc comporter des cellules en plus du surnageant cellulaire.

Tableau XIII : Difficultés de mise en place et réponses pouvant y être apportées.

Difficulté de mise en place des contrôles	
Difficultés	Réponses apportées
Durée réduite de conservation des cellules CAR-T	Contrôles microbiologiques au cours de la production en amont de la libération
	Identification des étapes à risques : analyse de risque (exemple : connexion non stérile sans utilisation du connecteur stérile)
Quantité de cellules réduites	Validation des méthodes de contrôles avec la quantité minimale requise de produit cellulaire
Contaminants intracellulaires	Composition de l'échantillon : il doit être composé de cellules et pas uniquement du surnageant cellulaire

### iii. Contrôles réalisables

Comme vu tout au long de ce travail, un certain nombre de contrôles sera obligatoirement réalisé avant la libération de nos cellules. Ces contrôles s'intégreront dans le dossier de lot, dans une fiche de libération. Dans notre cas, la production sera

déjà en milieu stérile et des contrôles intermédiaires seront réalisés, ce qui permettra, après connaissance des résultats intermédiaires, la réinjection des cellules avant le résultat des contrôles microbiologiques finaux. Les étapes ne se déroulant pas en milieu stérile et qui sont donc « à risque » de contamination sont clairement identifiées.

Une ébauche de cette fiche de libération peut déjà être réalisée, en séparant les résultats des contrôles intermédiaires et des contrôles finaux.

- Contrôles intermédiaires. Il s'agit des contrôles réalisés au cours de la production à J0, J5 et J10. Ils sont présentés figure 36. C'est la réussite de ces contrôles qui va déterminer la réinjection au patient.

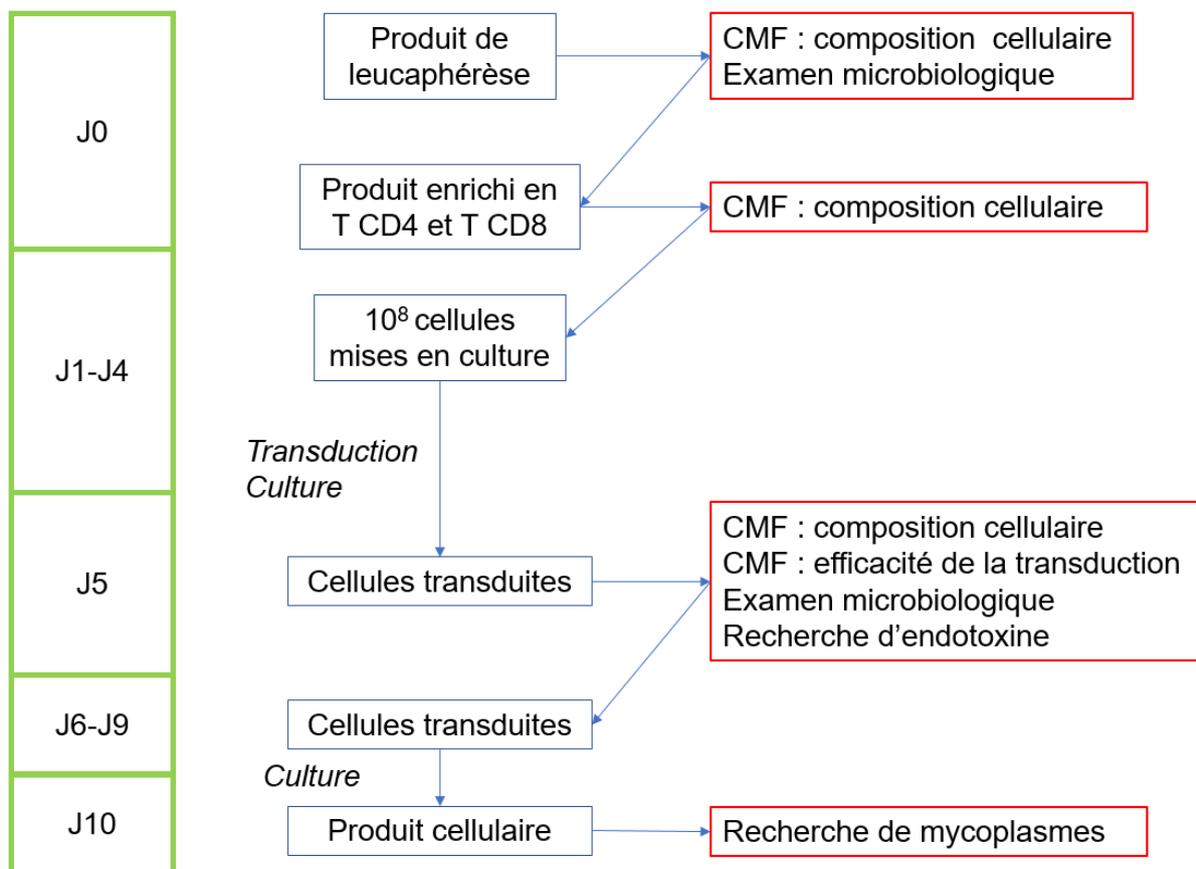


Figure 36 Contrôles intermédiaires de la production des cellules CAR-T.

- Les contrôles finaux réalisés en fin de production, figure 37. Hormis la CMF dont le délai de rendu des résultats est plus court (quelques heures), ils rentrent *a posteriori* dans le dossier de libération de lot.

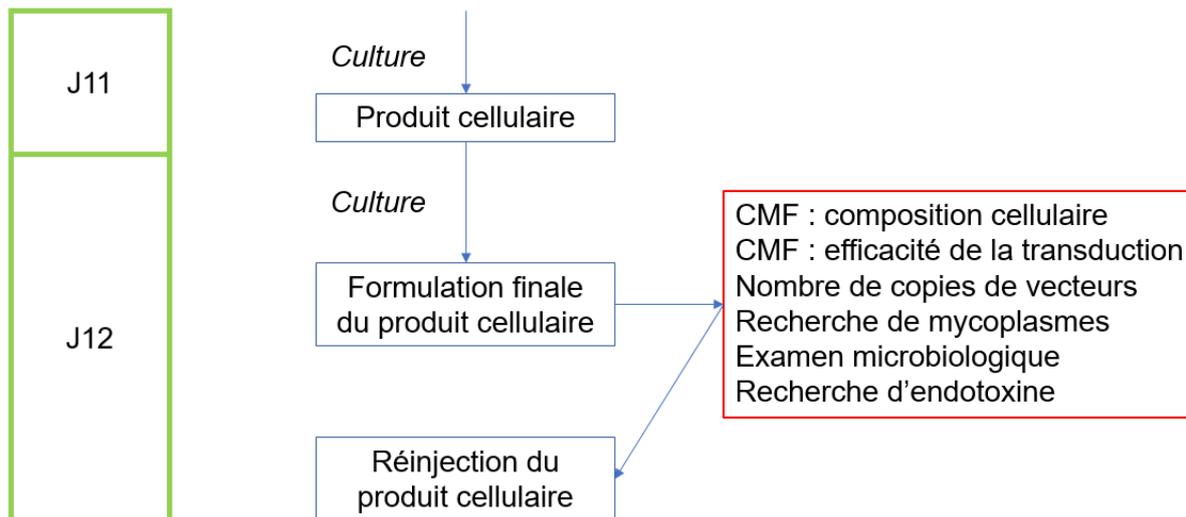


Figure 37 Contrôles finaux de la production des cellules CAR-T

Les différents acteurs impliqués dans la production des cellules CAR-T sont à retrouver sur la figure 38. Ne figure pas sur cette figure les contrôles environnementaux, effectués par le laboratoire d'hygiène.

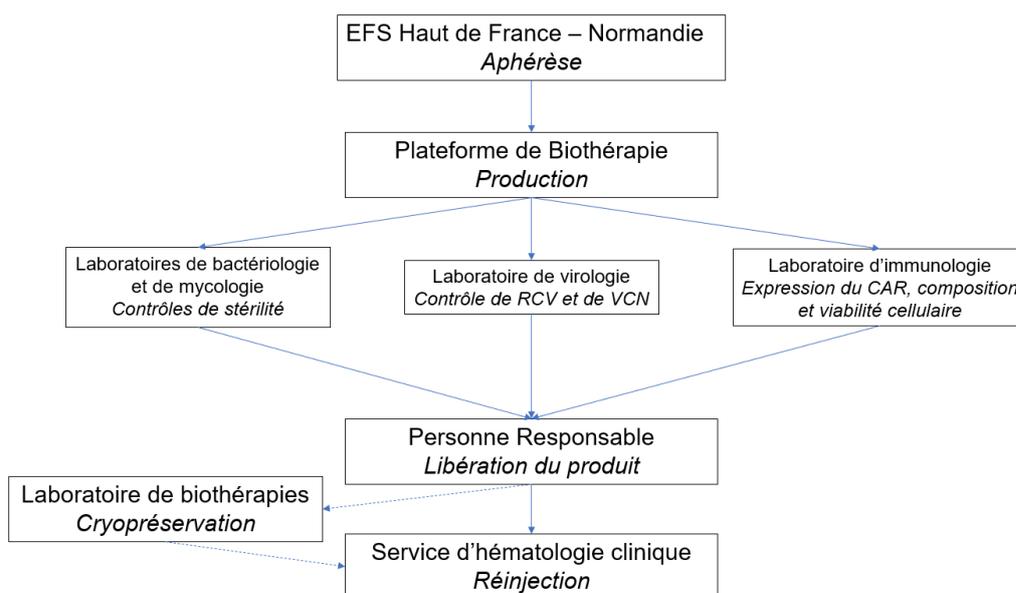


Figure 38 Les différents acteurs impliqués dans la production académique de cellules CAR-T

Plateforme de biothérapies ou s'effectue la production, les laboratoires de bactériologie, de mycologie où s'effectuent les contrôles de stérilité, le laboratoire de virologie pour le contrôle du VCN et de la RCV, et le laboratoire d'immunologie contrôlant l'expression du CAR, la composition et la viabilité cellulaire. Le laboratoire d'hygiène ne figure pas sur le schéma.

Pour rappel, le résultat des contrôles à J5 indique au clinicien si le conditionnement du patient peut être débuté. S'il est possible selon les résultats des contrôles qualités de démarrer le conditionnement du patient mais que l'état du patient ne le permet pas, la

production de cellules CAR-T sera menée à son terme puis cryopréservée en attente du rétablissement du patient pour la réinjection.

#### iv. Perspectives à long terme

Le but d'une production académique n'est pas de concurrencer les cellules CAR-T produites industriellement, mais de produire en complément de celles-ci. Les enjeux à long terme d'une production de cellules CAR-T académiques sont donc multiples.

La production académique permettra notamment la prise en charge de patients ne rentrant pas dans le cadre d'une AMM industrielle. Les indications de l'AMM étant très restrictives, une production à la demande de cellules CAR-T peut s'adapter aux besoins de patients qui n'étaient pas ciblés par l'AMM. De plus l'avantage de la proximité entre clinicien, production et recherche permet une grande adaptabilité aux besoins cliniques.

La possibilité de parfaitement caractériser le produit cellulaire réinjecté au patient auparavant impossible avec l'utilisation de cellules CAR-T industrielle, est également très intéressante dans un but de recherche translationnelle et d'amélioration de l'efficacité de cette thérapeutique. En effet, la mise en parallèle des caractéristiques du produit et des résultats cliniques pourrait permettre de fournir à terme des informations nécessaires pour atteindre cet objectif.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Kuwana Y, Asakura Y, Utsunomiya N, Nakanishi M, Arata Y, Itoh S, et al. Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. *Biochem Biophys Res Commun.* 31 déc 1987;149(3):960-8.
2. Eshhar Z, Waks T, Gross G, Schindler DG. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 janv 1993;90(2):720-4.
3. FDA approves tisagenlecleucel for B-cell ALL and tocilizumab for cytokine release syndrome | FDA. Disponible sur: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-tisagenlecleucel-b-cell-all-and-tocilizumab-cytokine-release-syndrome>
4. FDA approves axicabtagene ciloleucel for large B-cell lymphoma | FDA Disponible sur: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-axicabtagene-ciloleucel-large-b-cell-lymphoma>
5. Levine JE, Grupp SA, Pulsipher MA, Dietz AC, Rives S, Myers GD, et al. Pooled safety analysis of tisagenlecleucel in children and young adults with B cell acute lymphoblastic leukemia. *J Immunother Cancer.* août 2021;9(8):e002287.
6. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 3 janv 2019;380(1):45-56.
7. Shah BD, Ghobadi A, Oluwole OO, Logan AC, Boissel N, Cassaday RD, et al. KTE-X19 for relapsed or refractory adult B-cell acute lymphoblastic leukaemia: phase 2 results of the single-arm, open-label, multicentre ZUMA-3 study. *Lancet Lond Engl.*;398(10299):491-502.
8. Locke FL, Go WY, Neelapu SS. Development and Use of the Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy Axicabtagene Ciloleucel in Large B-Cell Lymphoma. *JAMA Oncol.*;6(2):281-90.

9. Munshi NC, Anderson LD, Shah N, Madduri D, Berdeja J, Lonial S, et al. Idecabtagene Vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 25 févr 2021;384(8):705-16.
10. Brown CE, Alizadeh D, Starr R, Weng L, Wagner JR, Naranjo A, et al. Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *N Engl J Med*. 29 déc 2016;375(26):2561-9.
11. Schaft N. The Landscape of CAR-T Cell Clinical Trials against Solid Tumors-A Comprehensive Overview. *Cancers*. 9 sept 2020;12(9):E2567.
12. Ali A, Kitchen SG, Chen ISY, Ng HL, Zack JA, Yang OO. HIV-1-Specific Chimeric Antigen Receptors Based on Broadly Neutralizing Antibodies. *J Virol*. 11 juill 2016;90(15):6999-7006.
13. Jethwa H, Adami AA, Maher J. Use of gene-modified regulatory T-cells to control autoimmune and alloimmune pathology: is now the right time? *Clin Immunol Orlando Fla*. janv 2014;150(1):51-63.
14. Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, Wang G, Eshhar Z, Mavroukakis SA, et al. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 oct 2006;12(20 Pt 1):6106-15.
15. Li J, Li W, Huang K, Zhang Y, Kupfer G, Zhao Q. Chimeric antigen receptor T cell (CAR-T) immunotherapy for solid tumors: lessons learned and strategies for moving forward. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol* 13 févr 2018
16. Patel S, Burga RA, Powell AB, Chorvinsky EA, Hoq N, McCormack SE, et al. Beyond CAR T Cells: Other Cell-Based Immunotherapeutic Strategies Against Cancer. *Front Oncol* 10 avr 2019
17. Klichinsky M, Ruella M, Shestova O, Lu XM, Best A, Zeeman M, et al. Human chimeric antigen receptor macrophages for cancer immunotherapy. *Nat Biotechnol*. août 2020;38(8):947-53.
18. Mangal JL, Handlos JL, Esrafil A, Inamdar S, Mcmillian S, Wankhede M, et al. Engineering Metabolism of Chimeric Antigen Receptor (CAR) Cells for Developing Efficient Immunotherapies. *Cancers* 5 mars 2021

19. Cruz CRY, Micklethwaite KP, Savoldo B, Ramos CA, Lam S, Ku S, et al. Infusion of donor-derived CD19-redirected virus-specific T cells for B-cell malignancies relapsed after allogeneic stem cell transplant: a phase 1 study. *Blood*. 24 oct 2013;122(17):2965-73.
20. Kochenderfer JN, Dudley ME, Carpenter RO, Kassim SH, Rose JJ, Telford W, et al. Donor-Derived Anti-CD19 Chimeric-Antigen-Receptor-Expressing T Cells Cause Regression Of Malignancy Persisting After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Blood*. 15 nov 2013;122(21):151-151.
21. Yang Y, Jacoby E, Fry TJ. Challenges and Opportunities of Allogeneic Donor-Derived CAR T cells. *Curr Opin Hematol*. nov 2015;22(6):509-15.
22. Halloran PF. Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. *N Engl J Med*. 23 déc 2004;351(26):2715-29.
23. Schwartz RH, Mueller DL, Jenkins MK, Quill H. T-cell clonal anergy. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1989;54 Pt 2:605-10.
24. Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol*. juin 2015;15(6):388-400.
25. Ni L, Lu J. Interferon gamma in cancer immunotherapy. *Cancer Med*. sept 2018;7(9):4509-16.
26. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. avr 2001;410(6832):1107-11.
27. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:235-71.
28. Dwivedi A, Karulkar A, Ghosh S, Rafiq A, Purwar R. Lymphocytes in Cellular Therapy: Functional Regulation of CAR T Cells. *Front Immunol* 18 janv 2019
29. Karjalainen K. New simplified molecular design for functional T cell receptor.
30. Brocker T. Chimeric Fv- $\zeta$  or Fv- $\epsilon$  receptors are not sufficient to induce activation or cytokine production in peripheral T cells. *Blood*. 1 sept 2000;96(5):1999-2001.
31. Zhao Z, Condomines M, van der Stegen SJC, Perna F, Kloss CC, Gunset G, et al. Structural design of engineered costimulation determines tumor rejection kinetics and persistence of CAR T cells. *Cancer Cell*. 12 oct 2015;28(4):415-28.

32. Kawalekar OU, O'Connor RS, Fraietta JA, Guo L, McGettigan SE, Posey AD, et al. Distinct Signaling of Coreceptors Regulates Specific Metabolism Pathways and Impacts Memory Development in CAR T Cells. *Immunity*. 16 févr 2016;44(2):380-90.
33. Guest RD, Hawkins RE, Kirillova N, Cheadle EJ, Arnold J, O'Neill A, et al. The role of extracellular spacer regions in the optimal design of chimeric immune receptors: evaluation of four different scFvs and antigens. *J Immunother Hagerstown Md* 1997. juin 2005;28(3):203-11.
34. Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, Rivière I, Sadelain M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCR $\zeta$  /CD28 receptor. *Nat Biotechnol*. janv 2002;20(1):70-5.
35. Rubio M-T, Galaine J, Borg C, Daguindau É. Biologie, concepts et principes des CAR-T cells. *Bull Cancer (Paris)*. déc 2018;105 Suppl 2:S135-46.
36. Ruella M, Barrett DM, Kenderian SS, Shestova O, Hofmann TJ, Perazzelli J, et al. Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies. *J Clin Invest*. 3 oct 2016;126(10):3814-26.
37. Wilkie S, van Schalkwyk MCI, Hobbs S, Davies DM, van der Stegen SJC, Pereira ACP, et al. Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling. *J Clin Immunol*. oct 2012;32(5):1059-70.
38. Morsut L, Roybal KT, Xiong X, Gordley RM, Coyle SM, Thomson M, et al. Engineering Customized Cell Sensing and Response Behaviors Using Synthetic Notch Receptors. *Cell*. 11 févr 2016;164(4):780-91.
39. Wu C-Y, Roybal KT, Puchner EM, Onuffer J, Lim WA. Remote control of therapeutic T cells through a small molecule-gated chimeric receptor. *Science*. 16 oct 2015;350(6258):aab4077.
40. Bishop DC, Xu N, Tse B, O'Brien TA, Gottlieb DJ, Dolnikov A, et al. PiggyBac-Engineered T Cells Expressing CD19-Specific CARs that Lack IgG1 Fc Spacers Have Potent Activity against B-ALL Xenografts. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 1 août 2018;26(8):1883-95.
41. Ran T, Eichmüller SB, Schmidt P, Schlander M. Cost of decentralized CAR T-cell production in an academic nonprofit setting. *Int J Cancer*. 2020;147(12):3438-45.

42. Yakoub-Agha I, Chabannon C, Bader P, Basak GW, Bonig H, Ciceri F, et al. Management of adults and children undergoing chimeric antigen receptor T-cell therapy: best practice recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) and the Joint Accreditation Committee of ISCT and EBMT (JACIE). *Haematologica*. 2020;105(2):297-316.
43. Dwivedy Nasta S, Hughes ME, Namoglu EC, Landsburg DJ, Chong EA, Barta SK, et al. A Characterization of Bridging Therapies Leading up to Commercial CAR T-Cell Therapy. *Blood*. 13 nov 2019;134(Supplement\_1):4108-4108.
44. Fesnak A, Lin C, Siegel DL, Maus MV. CAR-T Cell Therapies From the Transfusion Medicine Perspective. *Transfus Med Rev*. 1 juill 2016;30(3):139-45.
45. Allen ES, Stroncek DF, Ren J, Eder AF, West KA, Fry TJ, et al. Autologous lymphapheresis for the production of chimeric antigen receptor T cells. *Transfusion (Paris)*. mai 2017;57(5):1133-41.
46. Korell F, Laier S, Sauer S, Veelken K, Hennemann H, Schubert M-L, et al. Current Challenges in Providing Good Leukapheresis Products for Manufacturing of CAR-T Cells for Patients with Relapsed/Refractory NHL or ALL. *Cells*
47. Schulz M, Bialleck H, Thorausch K, Bug G, Dünzinger U, Seifried E, et al. Unstimulated leukapheresis in patients and donors: comparison of two apheresis systems. *Transfusion (Paris)*. juin 2014;54(6):1622-9.
48. Engstad CS, Gutteberg TJ, Osterud B. Modulation of blood cell activation by four commonly used anticoagulants. *Thromb Haemost*. avr 1997;77(4):690-6.
49. Automated cell processing with the CliniMACS Prodigy | France [Internet]. [cité 27 sept 2021]. Disponible sur: <https://www.miltenyibiotec.com/FR-en/products/clinimacs-prodigy.html>
50. Wang X, Rivière I. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. *Mol Ther Oncolytics*. 2016;3:16015.
51. Cornetta K, Yao J, Jasti A, Koop S, Douglas M, Hsu D, et al. Replication-competent lentivirus analysis of clinical grade vector products. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. mars 2011;19(3):557-66.
52. Escarpe P, Zayek N, Chin P, Borellini F, Zufferey R, Veres G, et al. Development of a sensitive assay for detection of replication-competent recombinant lentivirus in

large-scale HIV-based vector preparations. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* août 2003;8(2):332-41.

53. Skrdlant LM, Armstrong RJ, Keidaisch BM, Lorente MF, DiGiusto DL. Detection of Replication Competent Lentivirus Using a qPCR Assay for VSV-G. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 16 mars 2018;8:1-7.

54. Cornetta K, Duffy L, Turtle CJ, Jensen M, Forman S, Binder-Scholl G, et al. Absence of Replication-Competent Lentivirus in the Clinic: Analysis of Infused T Cell Products. *Mol Ther.* 3 janv 2018;26(1):280-8.

55. Farley DC, McCloskey L, Thorne BA, Tareen SU, Nicolai CJ, Campbell DJ, et al. Development of a replication-competent lentivirus assay for dendritic cell-targeting lentiviral vectors. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2015;2:15017.

56. Manilla P, Rebello T, Afable C, Lu X, Slepushkin V, Humeau LM, et al. Regulatory considerations for novel gene therapy products: a review of the process leading to the first clinical lentiviral vector. *Hum Gene Ther.* janv 2005;16(1):17-25.

57. King D. Evolution of Viral Vector Analytics for Gene Therapy Manufacturing [Internet]. *Cell Culture Dish.* 2021

58. Cantsilieris S, Baird PN, White SJ. Molecular methods for genotyping complex copy number polymorphisms. *Genomics.* févr 2013;101(2):86-93.

59. Zhao Y, Stepto H, Schneider CK. Development of the First World Health Organization Lentiviral Vector Standard: Toward the Production Control and Standardization of Lentivirus-Based Gene Therapy Products. *Hum Gene Ther Methods.* août 2017;28(4):205-14.

60. Sadelain M, Papapetrou EP, Bushman FD. Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome. *Nat Rev Cancer.* 1 déc 2011;12(1):51-8.

61. Lin H-T, Okumura T, Yatsuda Y, Ito S, Nakauchi H, Otsu M. Application of Droplet Digital PCR for Estimating Vector Copy Number States in Stem Cell Gene Therapy. *Hum Gene Ther Methods.* 1 oct 2016;27(5):197-208.

62. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest.* sept 2008;118(9):3132-42.

63. Testing of Retroviral Vector-Based Human Gene Therapy Products for Replication Competent Retrovirus During Product Manufacture and Patient Follow-up; Guidance for Industry. :16.
64. Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. :46.
65. Supplemental Guidance on Testing for Replication-Competent Retrovirus in Retroviral Vector-Based Gene Therapy Products and During Follow-up of Patients in Clinical Trials Using Retroviral Vectors. *Hum Gene Ther.* 10 févr 2001;12(3):315-20.
66. Jena B, Maiti S, Huls H, Singh H, Lee DA, Champlin RE, et al. Chimeric antigen receptor (CAR)-specific monoclonal antibody to detect CD19-specific T cells in clinical trials. *PloS One.* 2013;8(3):e57838.
67. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *N Engl J Med.* 16 oct 2014;371(16):1507-17.
68. Chen P-H, Lipschitz M, Weirather JL, Jacobson C, Armand P, Wright K, et al. Activation of CAR and non-CAR T cells within the tumor microenvironment following CAR T cell therapy. *JCI Insight.* 18 juin 2020;5(12):134612.
69. Demaret J, Varlet P, Trauet J, Beauvais D, Grossemy A, Hégo F, et al. Monitoring CAR T-cells using flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2021;100(2):218-24.
70. Miltenyi Biotec | Biotechnology Company | France [Internet]. [cité 27 sept 2021]. Disponible sur: <https://www.miltenyibiotec.com/FR-en/>
71. Stroncek DF, Ren J, Lee DW, Tran M, Frodigh SE, Sabatino M, et al. Myeloid cells in peripheral blood mononuclear cell concentrates inhibit the expansion of chimeric antigen receptor T cells. *Cytotherapy.* juill 2016;18(7):893-901.
72. Stebbings R, Wang L, Sutherland J, Kammel M, Gaigalas AK, John M, et al. Quantification of cells with specific phenotypes I: determination of CD4+ cell count per microliter in reconstituted lyophilized human PBMC prelabeled with anti-CD4 FITC antibody. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol.* mars 2015;87(3):244-53.
73. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1458-61.

74. Zaritskaya L, Shurin MR, Sayers TJ, Malyguine AM. New flow cytometric assays for monitoring cell-mediated cytotoxicity. *Expert Rev Vaccines*. juin 2010;9(6):601-16.
75. Özdemir Ö, Ravindranath Y, Savaşan S. Cell-mediated cytotoxicity evaluation using monoclonal antibody staining for target or effector cells with annexinV/propidium iodide colabeling by fluorosphere-adjusted counts on three-color flow cytometry. *Cytometry A*. 2003;56A(1):53-60.
76. Aubry JP, Blaecke A, Lecoanet-Henchoz S, Jeannin P, Herbault N, Caron G, et al. Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity. *Cytometry*. 1 nov 1999;37(3):197-204.
77. Logue SE, Elgendy M, Martin SJ. Expression, purification and use of recombinant annexin V for the detection of apoptotic cells. *Nat Protoc*. 2009;4(9):1383-95.
78. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1 sept 1994;84(5):1415-20.
79. Goldberg JE, Sherwood SW, Clayberger C. A novel method for measuring CTL and NK cell-mediated cytotoxicity using annexin V and two-color flow cytometry. *J Immunol Methods*. 22 avr 1999;224(1):1-9.
80. Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods*. 16 déc 1983;65(1-2):109-21.
81. Roddie C, O'Reilly M, Pinto JDA, Vispute K, Lowdell M. Manufacturing chimeric antigen receptor T cells: issues and challenges. *Cytotherapy*. 1 mars 2019;21(3):327-40.
82. Cell therapy products: focus on issues with manufacturing and quality control of chimeric antigen receptor T-cell therapies - Eyles - 2019 - *Journal of Chemical Technology & Biotechnology - Wiley Online Library* [Internet].
83. Hollyman D, Stefanski J, Przybylowski M, Bartido S, Borquez-Ojeda O, Taylor C, et al. Manufacturing validation of biologically functional T cells targeted to CD19 antigen for autologous adoptive cell therapy. *J Immunother Hagerstown Md* 1997. mars 2009;32(2):169-80.

84. Comparative analysis of assays to measure CAR T-cell-mediated cytotoxicity | Nature Protocols [Internet]. [cité 17 juin 2021]. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/s41596-020-00467-0>
85. Brunner KT, Mauel J, Cerottini J-C, Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells of <sup>51</sup>Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology*. févr 1968;14(2):181-96.
86. Smith EL, Harrington K, Staehr M, Masakayan R, Jones J, Long TJ, et al. GPRC5D is a target for the immunotherapy of multiple myeloma with rationally designed CAR T cells. *Sci Transl Med*
87. Daher M, Rezvani K. Next generation natural killer cells for cancer immunotherapy: the promise of genetic engineering. *Curr Opin Immunol*. avr 2018;51:146-53.
88. Singh H, Figliola MJ, Dawson MJ, Olivares S, Zhang L, Yang G, et al. Manufacture of Clinical-Grade CD19-Specific T Cells Stably Expressing Chimeric Antigen Receptor Using Sleeping Beauty System and Artificial Antigen Presenting Cells. *PLoS ONE* [Internet]. 31 mai 2013
89. Borella P, Bargellini A, Salvioli S, Medici CI, Cossarizza A. The use of non-radioactive chromium as an alternative to <sup>51</sup>Cr in NK assay. *J Immunol Methods*. 12 oct 1995;186(1):101-10.
90. Adusumilli PS, Cherkassky L, Villena-Vargas J, Colovos C, Servais E, Plotkin J, et al. Regional delivery of mesothelin-targeted CAR T cell therapy generates potent and long-lasting CD4-dependent tumor immunity. *Sci Transl Med*. 5 nov 2014;6(261):261ra151.
91. Karimi MA, Lee E, Bachmann MH, Salicioni AM, Behrens EM, Kambayashi T, et al. Measuring Cytotoxicity by Bioluminescence Imaging Outperforms the Standard Chromium-51 Release Assay. *PLoS ONE* [Internet]. 19 févr 2014
92. Brown CE, Wright CL, Naranjo A, Vishwanath RP, Chang W-C, Olivares S, et al. Biophotonic cytotoxicity assay for high-throughput screening of cytolytic killing. *J Immunol Methods*. 1 févr 2005;297(1):39-52.
93. Matta H, Gopalakrishnan R, Choi S, Prakash R, Natarajan V, Prins R, et al. Development and characterization of a novel luciferase based cytotoxicity assay. *Sci Rep*. 9 janv 2018;8:199.

94. Omokoko TA, Luxemburger U, Bardissi S, Simon P, Utsch M, Breitkreuz A, et al. Luciferase mRNA Transfection of Antigen Presenting Cells Permits Sensitive Nonradioactive Measurement of Cellular and Humoral Cytotoxicity. *J Immunol Res.* 2016;2016:9540975.
95. McMillin DW, Delmore J, Weisberg E, Negri JM, Geer DC, Klippel S, et al. Tumor cell-specific bioluminescence platform to identify stroma-induced changes to anti-cancer drug activity. *Nat Med.* avr 2010;16(4):483-9.
96. Thorne N, Inglese J, Auld DS. Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. *Chem Biol.* 25 juin 2010;17(6):646-57.
97. Tannous BA, Kim D-E, Fernandez JL, Weissleder R, Breakefield XO. Codon-optimized Gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* mars 2005;11(3):435-43.
98. Rossignol A, Bonnaudet V, Clémenceau B, Vié H, Bretaudeau L. A high-performance, non-radioactive potency assay for measuring cytotoxicity: A full substitute of the chromium-release assay targeting the regulatory-compliance objective. *mAbs.* avr 2017;9(3):521-35.
99. Fu X, Tao L, Rivera A, Williamson S, Song X-T, Ahmed N, et al. A Simple and Sensitive Method for Measuring Tumor-Specific T Cell Cytotoxicity. *PLOS ONE.* 29 juill 2010;5(7):e11867.
100. Peper JK, Schuster H, Löffler MW, Schmid-Horch B, Rammensee H-G, Stevanović S. An impedance-based cytotoxicity assay for real-time and label-free assessment of T-cell-mediated killing of adherent cells. *J Immunol Methods.* 1 mars 2014;405:192-8.
101. Abassi YA, Jackson JA, Zhu J, OConnell J, Wang X, Xu X. Label-free, real-time monitoring of IgE-mediated mast cell activation on microelectronic cell sensor arrays. *J Immunol Methods.* 1 sept 2004;292(1):195-205.
102. Zhu J, Wang X, Xu X, Abassi YA. Dynamic and label-free monitoring of natural killer cell cytotoxic activity using electronic cell sensor arrays. *J Immunol Methods.* 20 févr 2006;309(1):25-33.

103. Kho D, MacDonald C, Johnson R, Unsworth CP, O'Carroll SJ, Mez ED, et al. Application of xCELLigence RTCA Biosensor Technology for Revealing the Profile and Window of Drug Responsiveness in Real Time. *Biosensors*. juin 2015;5(2):199-222.
104. Martinez-Serra J, Gutierrez A, Muñoz-Capó S, Navarro-Palou M, Ros T, Amat JC, et al. xCELLigence system for real-time label-free monitoring of growth and viability of cell lines from hematological malignancies. *OncoTargets Ther*. 12 juin 2014;7:985-94.
105. Hillger JM, Lieu W-L, Heitman LH, IJzerman AP. Label-free technology and patient cells: from early drug development to precision medicine. *Drug Discov Today*. 1 déc 2017;22(12):1808-15.
106. Jachimowicz L, Chiavario A, Ye P, Guenther G, Chan K, Xue JS. Multifunctional Potency Assays for Cancer Immunotherapy. :3.
107. Cerignoli F, Abassi YA, Lamarche BJ, Guenther G, Santa Ana D, Guimet D, et al. In vitro immunotherapy potency assays using real-time cell analysis. *PLoS ONE*. 2 mars 2018;13(3):e0193498.
108. Erskine CL, Henle AM, Knutson KL. Determining optimal cytotoxic activity of human Her2neu specific CD8 T cells by comparing the Cr51 release assay to the xCELLigence system. *J Vis Exp JoVE*. 8 août 2012;(66):e3683.
109. Thakur A, Scholler J, Schalk DL, June CH, Lum LG. Enhanced cytotoxicity against solid tumors by bispecific antibody-armed CD19 CAR T cells: a proof-of-concept study. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1 août 2020;146(8):2007-16.
110. Korzeniewski C, Callewaert DM. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods*. 25 nov 1983;64(3):313-20.
111. Hussain RF, Nouri AM, Oliver RT. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *J Immunol Methods*. 15 mars 1993;160(1):89-96.
112. Liu L, Chahroudi A, Silvestri G, Wernett ME, Kaiser WJ, Safrit JT, et al. Visualization and quantification of T cell-mediated cytotoxicity using cell-permeable fluorogenic caspase substrates. *Nat Med*. févr 2002;8(2):185-9.
113. Jedema I, van der Werff NM, Barge RMY, Willemze R, Falkenburg JHF. New CFSE-based assay to determine susceptibility to lysis by cytotoxic T cells of leukemic

- precursor cells within a heterogeneous target cell population. *Blood*. 1 avr 2004;103(7):2677-82.
114. Mirzaei HR, Jamali A, Jafarzadeh L, Masoumi E, Alishah K, Mehrjardi KF, et al. Construction and functional characterization of a fully human anti-CD19 chimeric antigen receptor (huCAR)-expressing primary human T cells. *J Cell Physiol*. 2019;234(6):9207-15.
115. Schönberg K, Hejazi M, Uhrberg M. Protocol for the clonal analysis of NK cell effector functions by multi-parameter flow cytometry. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2012;903:381-92.
116. Martinez EM, Klebanoff SD, Secrest S, Romain G, Haile ST, Emtage PCR, et al. High-Throughput Flow Cytometric Method for the Simultaneous Measurement of CAR-T Cell Characterization and Cytotoxicity against Solid Tumor Cell Lines. *SLAS Discov Adv Sci Drug Discov*. 1 août 2018;23(7):603-12.
117. Griffiths M, Sundaram H. Drug design and testing: profiling of antiproliferative agents for cancer therapy using a cell-based methyl-[3H]-thymidine incorporation assay. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2011;731:451-65.
118. Rufener GA, Press OW, Olsen P, Lee SY, Jensen MC, Gopal AK, et al. Preserved Activity of CD20-Specific Chimeric Antigen Receptor-Expressing T cells in the Presence of Rituximab. *Cancer Immunol Res*. juin 2016;4(6):509-19.
119. Terrén I, Orrantia A, Vitallé J, Zenarruzabeitia O, Borrego F. CFSE dilution to study human T and NK cell proliferation in vitro. *Methods Enzymol*. 2020;631:239-55.
120. Turtle CJ, Hanafi L-A, Berger C, Gooley TA, Cherian S, Hudecek M, et al. CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest*. 1 juin 2016;126(6):2123-38.
121. Riches JC, Davies JK, McClanahan F, Fatah R, Iqbal S, Agrawal S, et al. T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood*. 28 févr 2013;121(9):1612-21.
122. Kiaii S, Clear AJ, Ramsay AG, Davies D, Sangaralingam A, Lee A, et al. Follicular lymphoma cells induce changes in T-cell gene expression and function: potential impact on survival and risk of transformation. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 juill 2013;31(21):2654-61.

123. Sommermeyer D, Hudecek M, Kosasih PL, Gogishvili T, Maloney DG, Turtle CJ, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8+ and CD4+ subsets confer superior antitumor reactivity in vivo. *Leukemia*. févr 2016;30(2):492-500.
124. Turtle CJ, Hanafi L-A, Berger C, Hudecek M, Pender B, Robinson E, et al. Immunotherapy of non-Hodgkin lymphoma with a defined ratio of CD8+ and CD4+ CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells. *Sci Transl Med*. 7 sept 2016;8(355):355ra116.
125. McLellan AD, Rad SMAH. Chimeric antigen receptor T cell persistence and memory cell formation. *Immunol Cell Biol*. 2019;97(7):664-74.
126. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*. août 2015;15(8):486-99.
127. Cherkassky L, Morello A, Villena-Vargas J, Feng Y, Dimitrov DS, Jones DR, et al. Human CAR T cells with cell-intrinsic PD-1 checkpoint blockade resist tumor-mediated inhibition. *J Clin Invest*. 126(8):3130-44.
128. Kiesgen S, Messinger JC, Chintala NK, Tano Z, Adusumilli PS. Comparative analysis of assays to measure CAR T-cell-mediated cytotoxicity. *Nat Protoc*. mars 2021;16(3):1331-42.
129. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med*. 18 sept 2011;17(10):1290-7.
130. Klebanoff CA, Gattinoni L, Torabi-Parizi P, Kerstann K, Cardones AR, Finkelstein SE, et al. Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 5 juill 2005;102(27):9571-6.
131. Gattinoni L, Klebanoff CA, Palmer DC, Wrzesinski C, Kerstann K, Yu Z, et al. Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. *J Clin Invest*. juin 2005;115(6):1616-26.
132. Singh N, Perazzelli J, Grupp SA, Barrett DM. Early memory phenotypes drive T cell proliferation in patients with pediatric malignancies. *Sci Transl Med*. 6 janv 2016;8(320):320ra3.

133. Xu Y, Zhang M, Ramos CA, Durett A, Liu E, Dakhova O, et al. Closely related T-memory stem cells correlate with in vivo expansion of CAR.CD19-T cells and are preserved by IL-7 and IL-15. *Blood*. 12 juin 2014;123(24):3750-9.
134. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 28 juin 2012;366(26):2443-54.
135. Finney OC, Brakke HM, Rawlings-Rhea S, Hicks R, Doolittle D, Lopez M, et al. CD19 CAR T cell product and disease attributes predict leukemia remission durability. *J Clin Invest*. 1 mai 2019;129(5):2123-32.
136. Vormittag P, Gunn R, Ghorashian S, Veraitch FS. A guide to manufacturing CAR T cell therapies. *Curr Opin Biotechnol*. oct 2018;53:164-81.
137. Castella M, Boronat A, Martín-Ibáñez R, Rodríguez V, Suñé G, Caballero M, et al. Development of a Novel Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor: A Paradigm for an Affordable CAR T Cell Production at Academic Institutions. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 6 déc 2018;12:134-44.
138. Castella M, Caballero-Baños M, Ortiz-Maldonado V, González-Navarro EA, Suñé G, Antoñana-Vidósola A, et al. Point-Of-Care CAR T-Cell Production (ARI-0001) Using a Closed Semi-automatic Bioreactor: Experience From an Academic Phase I Clinical Trial. *Front Immunol [Internet]*. 2020
139. Ortiz-Maldonado V, Rives S, Castellà M, Alonso-Saladrigues A, Benítez-Ribas D, Caballero-Baños M, et al. CART19-BE-01: A Multicenter Trial of ARI-0001 Cell Therapy in Patients with CD19+ Relapsed/Refractory Malignancies. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 3 févr 2021;29(2):636-44.
140. Armengol MP, Juan M, Lucas-Martín A, Fernández-Figueras MT, Jaraquemada D, Gallart T, et al. Thyroid Autoimmune Disease: Demonstration of Thyroid Antigen-Specific B Cells and Recombination-Activating Gene Expression in Chemokine-Containing Active Intrathyroidal Germinal Centers. *Am J Pathol*. 1 sept 2001;159(3):861-73.
141. Zhu F, Shah NN, Xu H, Schneider D, Orentas R, Dropulic B, et al. CAR-T Cell Production Using the Clinimacs® Prodigy System. *Blood*. 1 janv 2016;128(22):5724.
142. Zhu F, Shah N, Xu H, Schneider D, Orentas R, Dropulic B, et al. Closed-system manufacturing of CD19 and dual-targeted CD20/19 chimeric antigen receptor T cells

using the CliniMACS Prodigy device at an academic medical center. *Cytotherapy*. 1 mars 2018;20(3):394-406.

143. Shah NN, Johnson BD, Schneider D, Zhu F, Szabo A, Keever-Taylor CA, et al. Bispecific anti-CD20, anti-CD19 CAR T cells for relapsed B cell malignancies: a phase 1 dose escalation and expansion trial. *Nat Med*. oct 2020;26(10):1569-75.

144. Zah E, Lin M-Y, Silva-Benedict A, Jensen MC, Chen YY. T Cells Expressing CD19/CD20 Bispecific Chimeric Antigen Receptors Prevent Antigen Escape by Malignant B Cells. *Cancer Immunol Res*. juin 2016;4(6):498-508.

145. Zheng Z, Chinnasamy N, Morgan RA. Protein L: a novel reagent for the detection of chimeric antigen receptor (CAR) expression by flow cytometry. *J Transl Med*. 13 févr 2012;10:29.

146. Itzhaki O, Jacoby E, Nissani A, Levi M, Nagler A, Kubi A, et al. Head-to-head comparison of in-house produced CD19 CAR-T cell in ALL and NHL patients. *J Immunother Cancer*. mars 2020;8(1):e000148.

147. Jacoby E, Bielgorai B, Avigdor A, Itzhaki O, Hutt D, Nussboim V, et al. Locally produced CD19 CAR T cells leading to clinical remissions in medullary and extramedullary relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Am J Hematol*. déc 2018;93(12):1485-92.

148. Avigdor A, Shouval R, Jacoby E, Davidson T, Shimoni A, Besser M, et al. CAR T cells induce a complete response in refractory Burkitt Lymphoma. *Bone Marrow Transplant*. déc 2018;53(12):1583-5.

149. Berdeja JG, Madduri D, Usmani SZ, Jakubowiak A, Agha M, Cohen AD, et al. Ciltacabtagene autoleucel, a B-cell maturation antigen-directed chimeric antigen receptor T-cell therapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CARTITUDE-1): a phase 1b/2 open-label study. *Lancet Lond Engl*. 24 juill 2021;398(10297):314-24.

150. Abramson JS, Palomba ML, Gordon LI, Lunning MA, Wang M, Arnason J, et al. Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *Lancet Lond Engl*. 19 sept 2020;396(10254):839-52.

151. Baras A, Bocket L, Beauvais D, Hallaert C, Varlet P, Yakoub-Agha I, et al. A Real-Time Quantitative PCR Targeting the Viral Vector for the Monitoring of Patients Treated with Axicabtagene Ciloleucel. *J Mol Diagn JMD*. avr 2021;23(4):447-54.
152. Avettand-Fènoël V, Chaix M-L, Blanche S, Burgard M, Floch C, Toure K, et al. LTR real-time PCR for HIV-1 DNA quantitation in blood cells for early diagnosis in infants born to seropositive mothers treated in HAART area (ANRS CO 01). *J Med Virol*. févr 2009;81(2):217-23.
153. Olive V, Bennett MJ, Walker JC, Ma C, Jiang I, Cordon-Cardo C, et al. miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes Dev*. 15 déc 2009;23(24):2839-49.
154. Mika T, Maghnouj A, Klein-Scory S, Ladigan-Badura S, Baraniskin A, Thomson J, et al. Digital-Droplet PCR for Quantification of CD19-Directed CAR T-Cells. *Front Mol Biosci*. 2020;7:84.
155. Fehse B, Badbaran A, Berger C, Sonntag T, Riecken K, Geffken M, et al. Digital PCR Assays for Precise Quantification of CD19-CAR-T Cells after Treatment with Axicabtagene Ciloleucel. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 13 mars 2020;16:172-8.
156. Deschamps M, Decot V, Giverne C, Pinturaud M, Vaissié A, Parquet N, et al. Prérequis pour une production académique des cellules CART conforme aux bonnes pratiques pharmaceutiques (BPF). Recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). *Bull Cancer (Paris)*. 1 janv 2020;107(1, Supplement):S85-93.



Université de Lille

FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Année Universitaire 2020 / 2021

**Nom : Pajot**

**Prénom : Thibault**

**Titre de la thèse : Mise en place des contrôles qualités nécessaires à une production académiques de cellules CAR-T autologues**

**Mots-clés : Cellules CAR-T, production académique, contrôles qualités**

---

**Résumé :** Les cellules CAR-T représentent depuis leur découverte un avenir de l'immunothérapie anticancéreuse. Les spécialités commercialisées à ce jour sont indiquées dans le traitement d'hémopathies lymphoïdes B et dans le traitement du myélome multiple réfractaire. Le projet mené par le CHU de Lille prévoit une production académique de cellules CAR-T avec un partenaire industriel, Miltenyi Biotec. Cette production utilise un semi-automate, le CliniMACS Prodigy®, et met en œuvre un vecteur d'origine viral. Ce travail de thèse a pour but d'identifier les contrôles qualité qui sont nécessaires à une production de ce type. Certains contrôles qualités sont obligatoires pour la libération des lots, en assurant l'innocuité de la poche et en contrôlant le rendement de la production. D'autres contrôles qualité ne sont pas obligatoires mais fortement recommandés pour caractériser la composition du produit cellulaire et s'assurer de son efficacité *in vitro*.

**Membres du jury :**

**Président :**

Madame le Professeur Annabelle Dupont, PU-PH, CHU de Lille

**Directeurs, conseillers de thèse :**

Madame le Docteur Pauline Varlet, PH, CHU de Lille

Madame le Docteur Alix Vaissié, AHU, CHU de Lille

**Assesseurs :**

Madame le Professeur Myriam Labalette, PU-PH, CHU de Lille

Monsieur le Docteur David Beauvais, CCU-AH, CHU de Lille