



**Académie nationale de Pharmacie**

Santé Publique - Médicament - Produits de santé - Biologie - Santé et environnement

# **Contrôle qualité des produits basés sur les cellules souches embryonnaires humaines**

**Aurore Lacroix**

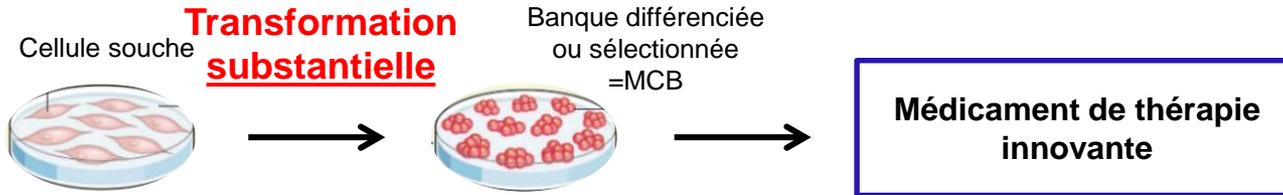
**Responsable Affaires Réglementaires et Chargée Assurance Qualité**

**Genosafe – Evry**

**[alacroix@genosafe.com](mailto:alacroix@genosafe.com)**

**Le 04 Octobre 2017**

- 1 - La réglementation des médicaments issus de cellules souches
- 2 - Fabrication du médicament
- 3 - Les contrôles à réaliser sur les Master Cell Banks
- 4 - Les contrôles qualités au cours de développement et contrôles qualités libératoires
- 5 - Les tests pré-cliniques
- 6 - Ce qu'il faut retenir
- 7 - Exemple d'analyses réalisées à GenoSafe



<p><b>NON-Substantial manipulations</b> 1394/2007- Annex I</p>	<p><b>Substantial manipulations</b> <i>Médicaments de thérapie innovante – version 2 - MAJ 05/06/2012 - ANSM</i></p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>— cutting,</li> <li>— grinding,</li> <li>— shaping,</li> <li>— centrifugation,</li> <li>— soaking in antibiotic or antimicrobial solutions,</li> <li>— sterilization,</li> <li>— irradiation,</li> <li>— cell separation, concentration or purification,</li> <li>— filtering,</li> <li>— lyophilization,</li> <li>— freezing,</li> <li>— cryopreservation,</li> <li>— vitrification</li> </ul>	<p>Substantial modification = consequences of the modification</p> <p>A modification is considered as substantial if the <b><u>biological properties</u></b> or <b><u>initial functions</u></b> are <b>MODIFIED</b>.</p> <p><b><u>NOTE: Cell culture is a SUBSTANTIAL manipulation</u></b></p>

**Regulation 1394/2007**

**Advanced therapy medicinal product** means any of the following **medicinal products** for human use:

- a **gene therapy medicinal product** as defined in Part IV of Annex I to Directive 2001/83/EC,
- a **somatic cell therapy medicinal product** as defined in Part IV of Annex I to Directive 2001/83/EC,
- a **tissue engineered product**

**GTMP ,***(2001/83 – part IV- amdt 2011)*

Par médicament de thérapie de génique, on entend un **médicament biologique** qui a les caractéristiques suivantes:

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

**ET**

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

**Les médicaments de Thérapie Génique n'incluent pas les vaccins contre les maladies infectieuses.**

**SCTMP***(2001/83 – part IV- amdt 2011)*

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

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

**ET**

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

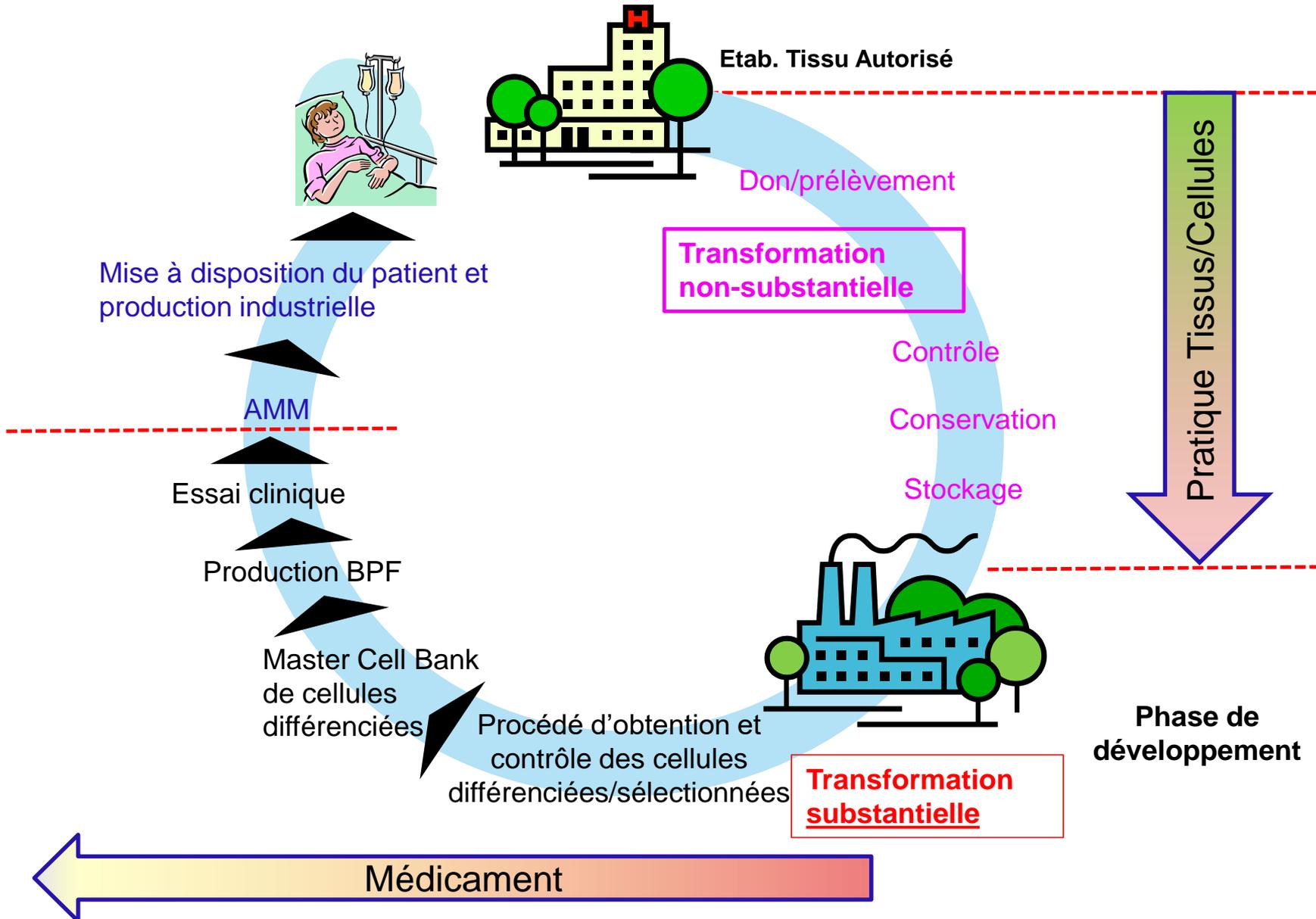
**TEP***(1394/2007 – art.1 b)c)*

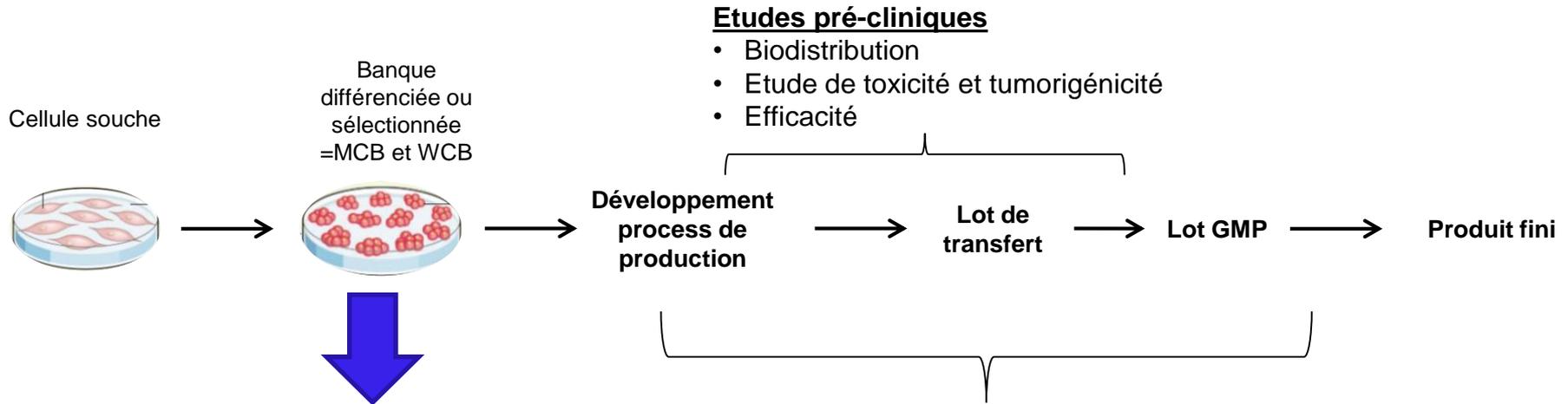
Sont considérés comme «issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire» les cellules ou tissus qui répondent à au moins l'une des conditions suivantes:

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

**OU**

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





### Etudes pré-cliniques

- Biodistribution
- Etude de toxicité et tumorigénicité
- Efficacité

### ICH Q5D

- Identité
- Pureté
- Caryotype/phénotype
- Stabilité
- Tumorigénicité/toxicité

Tests varient en fonction des propriétés biologiques des cellules, de la culture et des tests disponibles

### ICH Q6B // EMEA/CHMP/410869/2006 / Reflection paper « on stem cell-based medicinal product »

### EMA/CAT/571134/2009 // ICH Q8

- Identité
- Pureté
- Caryotype/phénotype
- Stabilité

Liste des tests à réaliser *a minima* sur la MCB:

- Transmission electron microscopy (TEM) for viruses
- In vitro* pour la mise en évidence de contaminants viraux
- Virus Bovin
- Virus Porcin
- Test de PERT (Product-Enhanced Reverse Transcriptase)
- Virus adeno-associé
- Virus Humain (HIV, EBV, ETC, ...)

**Exemple** sur une banque d'iPS générée à partir de CD34 transfectées par des plasmides de façon transitoire afin d'exprimer des facteurs de dé-différenciation.

A partir des colonies isolées, réalisation des tests ci-dessus, ainsi que:

- Morphologie cellulaire
- Disparition des plasmides transitoires (qPCR)

## Caractérisation

- Identité
- Pureté
- Potency (efficacité)

⇒ Les composants structurels (matrice/membrane) de support cellulaire doivent être identifiés et caractérisés d'un point de vue physico-chimique

- Aspect macroscopique
- Porosité
- Densité
- Structure microscopique
- Taille particulaire

⇒ Les tests de contrôle qualité doivent être validés (la validation doit être achevée au cours du dernier essai clinique).

Dépend de la population et de l'origine des cellules utilisées.

❖ Produit cellulaire => caractériser le phénotype et génotype cellulaires

□ Exemple de tests :

- Phénotype (quantification ARN ou protéine / cytométrie)
- Caryotype
- Séquençage

⇒ Utilisation de marqueurs cellulaires (choix à justifier dans le dossier d'AMM)

❖ Produit non-cellulaire => caractérisation des autres composants (chimiques ou biologiques) entrant dans la composition du médicament.

Identifier les intermédiaires de production, les cellules, les vecteurs, les bactéries ou fongiques qui ne sont pas requis dans le produit final.

Caractérisation du produit => établissement de spécifications appropriées

❖ Safety

- Recherche de bactéries/fongiques (Ph Eur 2.6.12 et 2.6.14)
- Recherche de mycoplasmes (Ph Eur 2.6.7 → qPCR)
- Recherche de virus = sécurité virale (Ph Eur 5.1.7)
  - => Si utilisation de produits animaux, par exemple SVF, recherche de virus associés aux bovins
- Recherche d'endotoxines

❖ Impuretés liées aux intermédiaires de production

- ❖ Dépend du procédé de fabrication et des produits utilisés
- ⇒ Chaque matériel connu pour se dégrader durant la production doit être caractérisé (recherche de trace de plastique, filtre de stérilité....)
- ⇒ Des spécifications doivent être établies et justifiées. → LoD des impuretés à établir et valider lors des études toxicologiques et cliniques.

⇒ test quantitatif biologique qui mesure l'activité du produit

⇒ Un test de potency doit être développé pour

- Mesurer l'activité biologique du produit
- Mesurer les propriétés spécifiques du produit
- Être quantitatif
- Inclure l'utilisation d'un standard de référence pour comparaison (si possible)

Exemple de tests de potency:

- Numération cellulaire / viabilité / temps de doublement (la viabilité cellulaire est un paramètre important pour l'intégrité du produit et doit être directement corrélée à l'activité biologique).
- Expression génique -> RT-qPCR/western- blot/ELISA
- Clonage cellulaire
- Test de restauration fonctionnelle → test quantitatif ou semi-quantitatif

Exemples:

- Kératinocytes capables de former un épiderme
- Cellules Beta de Langerhans capables de sécréter de l'insuline

- ❑ 2 types de tests de potency sont envisagés
  - *In vitro* -> utilisation d'un système cellulaire
  - *In vivo* -> utilisation d'un système animal

=> Les tests de potency sont généralement des tests à façon

⇒ Plusieurs tests (dans la mesure du possible) doivent être réalisés en parallèle pour confirmer le « potency » des produits issus de cellules souches

⇒ Le test doit être opérationnel avant le commencement du premier essai clinique et validé pour le premier essai pivot.

Attention ! Les marqueurs utilisés pour la pureté et ceux pour le potency ne doivent pas être recherchés dans la même analyse.

Une **date de péremption** et des **conditions de stockage** doivent être définies pour tout(e):

- Produit intermédiaire
- Composant du produit combiné
- Les substances actives
- Le produit fini

Il est très important de penser à déterminer:

- Une durée d'utilisation après ouverture
- Des conditions de stockage
- Des conditions de transport

Les méthodes de **congélations/décongélations** doivent être challengées et documentées

Les conditions de conservation et la date de péremption doivent être étayées par des données et justifiées.

Elles doivent être définies au cas par cas, car elles dépendent de la nature complexe du produit.

- Les tests libératoires doivent être basés sur les paramètres définis durant la caractérisation et le développement
- Le choix et la spécificité des tests sont propres au fabricant
- Liste des tests libératoires *a minima*:
  - Identité
  - Pureté/Impureté
  - Sécurité
  - Stérilité
  - Potency
  - Stabilité

**Cas particuliers** où certains tests ne peuvent pas être réalisés => A justifier

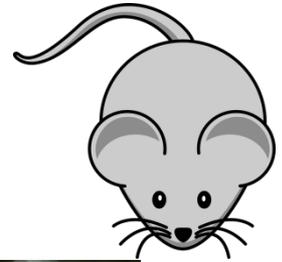


- Tests non réalisables sur le produit combiné pour des raisons techniques => résultat à baser sur le IPC
- Tests dont les résultats ne sont pas disponibles avant l'administration du produit (e.g. cellule autologue) => mettre une procédure en place avec les cliniciens
- La quantité de cellules est limitée et/ou les cellules ne sont pas stables

Tests	Type de contrôle	Spécification
Marqueur pluripotent	Identité & pureté	CD34 <5%
Analyse du caryotype	Sécurité	A définir en fonction du produit
Mycoplasme	Sécurité	Négatif
Stérilité	Sécurité	Négatif
Clairance des plasmides	Sécurité	A définir en fonction du produit
Génotypage	Pureté & identité	A définir en fonction du produit
Numération et viabilité cellulaire	Viabilité	A définir en fonction du produit % viabilité > 50%
Sécurité virale	Sécurité	A définir en fonction du produit

**Etude *in vivo***

- ⇒ La sélection du modèle et de l'espèce (ou des espèces) doit être justifiée scientifiquement
- Les petits animaux ne peuvent pas être utilisés dans le cas :
  - De certains produits cellulaires implantés chirurgicalement
  - D'une évaluation à long terme d'une régénération tissulaire

**Biodistribution**

- ⇒ Etude indispensable
- ⇒ Le design de l'étude doit tenir compte du destin des cellules et des différentes étapes du procédé (migration, niche, greffe, différenciation...)

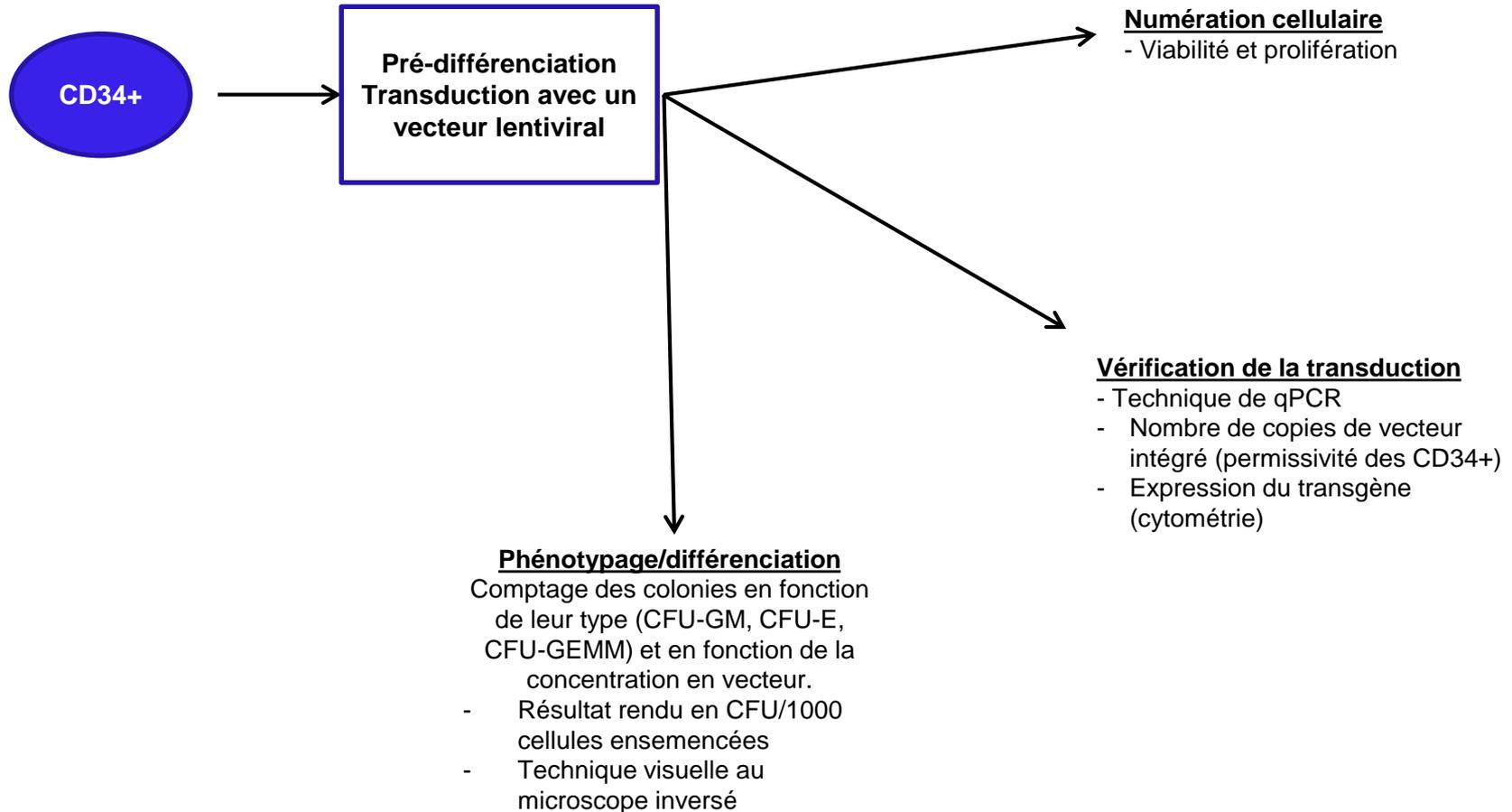
**Tumorigénicité**

⇒ La formation de tumeur dépend de l'origine des cellules (souches pluripotentes iPSC / hESC ou des cellules souches somatiques MSC/HSC), de leur manipulation et de la voie ou du site d'administration

Exemple: la formation de tératome est une caractéristique intrinsèque des cellules souches pluripotentes

- ⇒ Beaucoup de tests sont **développés à façon**
- ⇒ Les contrôles mis en place dépendent du **procédé de fabrication** et des **produit utilisés dans la fabrication**
- ⇒ Contrairement aux produits de synthèse chimique, les guidelines sont très génériques et ne rentrent pas dans le détail des tests à réaliser et à mettre en place. Il est donc de la responsabilité du fabricant de mettre en place les tests qui pourront lui garantir un produit sain, sécuritaire et efficace.
- ⇒ Discuter des contrôles qualités de son produit avec l'agence européenne le plus tôt possible dans le développement (scientific advice)

# Exemple: Tests réalisés à GenoSafe sur les cellules hématopoïétiques CD34+ transduites



**Merci de votre attention**