

Annexe K3. E5 brique de sujet « Production de vecteurs viraux »

L'exemple proposé ci-dessous a vocation à illustrer la définition de l'épreuve E5 par un extrait ou brique de sujet, incluant les documents associés. La proposition ci-dessous a été élaborée en commission nationale, à la suite de la présentation de la démarche d'élaboration de sujet. Elle a un statut de « document de travail ».

Une entreprise produit des vecteurs viraux dans le cadre de thérapies géniques ciblant certaines formes de cancers. Ces vecteurs sont produits en respectant des normes strictes (BPF) pour répondre aux exigences cliniques et réglementaires. A l'issue de la production, ils seront injectés aux patients.

1. Production de vecteurs viraux à partir d'une culture cellulaire

Le fournisseur des cellules HEK293 n'est plus en mesure de fournir ces cellules. Le technicien propose de les remplacer par des cellules CHO. Le **document 1** présente les caractéristiques de ces cellules.

Cependant, le chef de production refuse cette proposition de remplacement.

Le cahier des charges pour la production des vecteurs viraux est présenté sur le **document 2**.

1.1. Expliquer le rôle du cahier des charges. (C3.1)

1.2. Justifier le refus du chef de production. (C3.2)

1.3. Argumenter le choix de l'utilisation de cellules humaines pour produire les vecteurs viraux. (C3.2)

1.4. Argumenter la « haute valeur ajoutée » du produit d'intérêt. (C3.1)

2. Montée en échelle de la bioproduction de vecteurs viraux

Dans le but de mettre en place cette production, l'entreprise doit acheter un bioréacteur. Les différentes options figurent sur le **document 3**.

2.1. Argumenter le choix du bioréacteur pour la production des vecteurs viraux. (C3.1)

Une fois le matériel choisi, il est nécessaire d'envisager l'aménagement des locaux.

Le plan des locaux figure sur le **document 4**. Les caractéristiques des différentes zones à atmosphère contrôlée sont indiquées sur le **document 5**.

L'organigramme de production et de purification est présenté dans le **document 6**.

2.2. Démontrer que le principe de la marche en avant est respecté sur le plan de l'infrastructure. (C3.3)

2.3. Argumenter les zones à atmosphère contrôlée adaptées pour les étapes de préparation des équipements et de remplissage aseptique. (C3.3)

Le **document 7** présente les tenues disponibles pour les opérateurs.

2.4. Argumenter le choix de la tenue adaptée pour réaliser l'étape de transfection des cellules. (C3.3)

Document 1. Caractéristiques des cellules HEK293 et CHO

HEK293 is an epithelial cell line derived from the kidney of a human embryo. It is widely used in industrial biotechnology and toxicology research, with applications in efficacy and virucide testing.

HEK293 Cell Line Information

- ✓ **Organism**
Human
- ✓ **Tissue Type**
Kidney; Embryo
- ✓ **Cell Type**
Epithelial

Donor Information

- 💡 **Age**
Fetus
- 💡 **Gender**
Unknown
- 💡 **Ethnicity**
Unknown

CHO Cell Line Information

- ✓ **Organism**
Animal
- ✓ **Tissue Type**
Ovary
- ✓ **Cell Type**
Epithelial

Donor Information

- 💡 **Age**
Adult
- 💡 **Gender**
Female
- 💡 **Origin**
Cricetulus griseus, hamster, Chinese

Sources : [Engineered HEK293 Cell Line - CellEDIT Service – Cytosurge](https://www.cytosurge.com/applications/cho-cell-line)
<https://www.cytosurge.com/applications/cho-cell-line>

Document 2. Extrait du cahier des charges pour la production de vecteurs viraux injectables

1. Objectif du projet

- **But principal** : Produire des vecteurs viraux de qualité clinique, adaptés à une administration injectable pour la thérapie génique ciblant le cancer.
- **Type de vecteurs viraux** : AAV (adenovirus-associated virus).
- **Indication clinique** : Tumeurs solides ou cancers hématologiques.
- **Mode d'administration** : Injection intraveineuse, intratumorale ou régionale.

2. Conformité réglementaire

1. **Normes à respecter** :
 - Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF).
 - Directives de l'EMA (European Medicines Agency) ou de la FDA (Food and Drug Administration) sur les médicaments de thérapie innovante (MTI/ATMP).
 - Normes ICH Q5A à Q5E (qualité des produits biologiques).
2. **Documentation** :
 - Dossier de lot complet (batch record).
 - Dossier Investigational Medicinal Product Dossier (IMPD) pour essais cliniques.
 - Validation des procédés, y compris les tests de stérilité, de pureté et d'efficacité.

3. Spécifications du produit final

1. **Caractéristiques physico-chimiques :**
 - Titre viral : $\geq 10^{12}$ unités infectieuses/mL.
 - Formulation stable à -80°C pour stockage ou 4°C pour un usage immédiat.
 - Osmolarité adaptée à l'injection humaine (270-330 mOsm/kg).
2. **Pureté :**
 - Contamination par l'ADN hôte ≤ 10 ng/dose thérapeutique.
 - Contamination par les protéines hôtes ≤ 100 ng/mL.
 - Endotoxines : $\leq 0,5$ EU/mL.
3. **Stérilité :**
 - Produit exempt de bactéries, champignons et mycoplasmes.
 - Absence de virus contaminants (test PCR et cultures cellulaires).
4. **Efficacité biologique :**
 - Taux d'infection ou de transduction validé in vitro et/ou in vivo.
 - Expression efficace du transgène cible.
5. **Immunogénicité :**
 - Profil immunologique évalué pour limiter les réactions inflammatoires.

4. Exigences en matière de production

1. **Ligne cellulaire de production :**
 - Lignée cellulaire certifiée GMP : HEK293
 - Maîtrise des risques liés à la contamination par des agents adventices.
2. **Moyens de production :**
 - Bioreacteurs de 2.5L pour cellules adhérentes.
 - Techniques de transfection/transduction pour l'amplification du vecteur.
3. **Environnement de production :**
 - Chaque étape se fera dans une Zone à Atmosphère Contrôlée adaptée.
4. **Échelle de production :**
 - Production pilote pour essais précliniques.
 - Montée en échelle pour la phase clinique (ex : ≥ 100 L pour essais de phase I/II).
5. **Purification :**
 - Techniques chromatographiques (affinité, échange d'ions).
 - Ultra-filtration pour la concentration.
 - Filtration stérile (pore $\leq 0,22$ μm).

5. Contrôle qualité (QC)

1. **Tests sur le produit final :**
 - Quantification du titre viral (PCR et ELISA).
 - Analyse de la pureté (SDS-PAGE et Western Blot).
 - Tests de stérilité (cultures et PCR).
 - Tests de stabilité à court et long terme (conservation à diverses températures).
2. **Validation de la fonctionnalité :**
 - Essais d'infection/transduction sur des cellules cibles.
 - Test d'expression fonctionnelle du transgène (protéine, ARN, ou effet thérapeutique).
3. **Tests de sécurité :**
 - Détection d'agents adventices (mycoplasmes, virus contaminants).
 - Profil d'immunotoxicité et de cytotoxicité.

Document 3. Caractéristiques de trois bioréacteurs

(1) Thermo Scientific™ HyPerforma™ Single-Use Bioreactor

- **Type :** Bioréacteur à usage unique à agitateurs, pouvant être utilisé avec des microporteurs.
- **Caractéristiques :**
 - Agitateurs à faible cisaillement pour éviter les dommages mécaniques aux cellules.
 - Design à usage unique pour éviter les risques de contamination croisée et réduire les coûts de nettoyage.
 - Système de contrôle de l'oxygénation, température et pH en temps réel.
 - Possibilité d'adapter la culture avec des microporteurs pour favoriser l'adhérence des cellules.

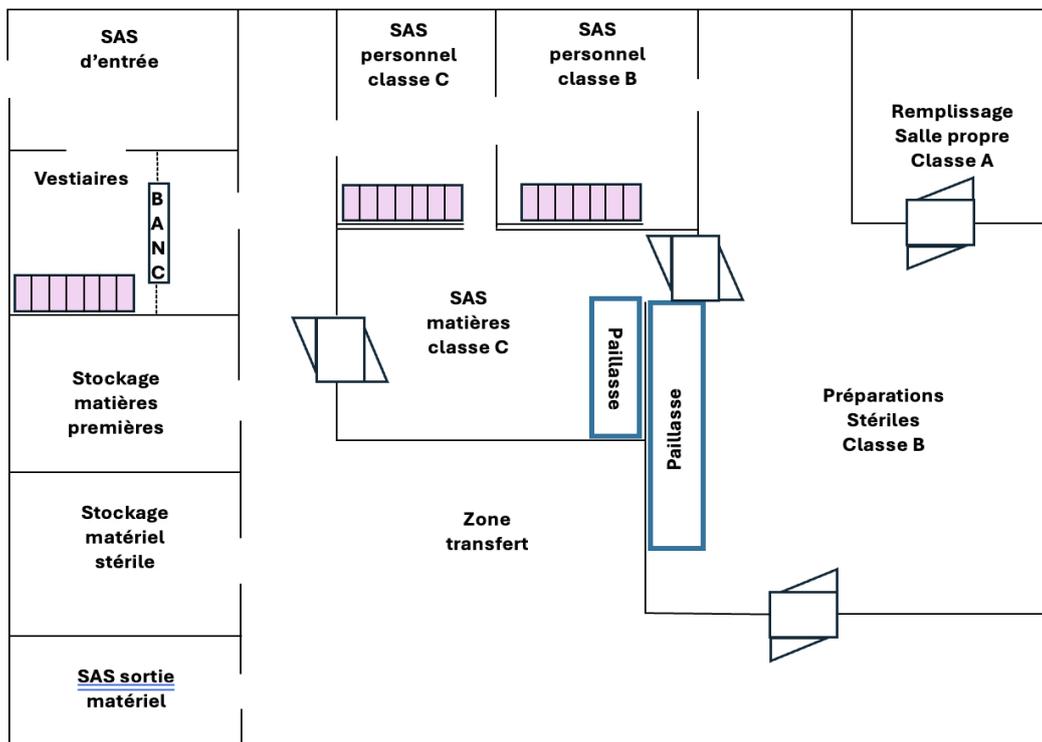
(2) Eppendorf Bioreactor Model 2.5 L

- **Type :** Bioréacteur à agitation adapté aux cultures en suspension, mais non recommandé pour des cellules adhérentes.
- **Caractéristiques :**
 - Conçu principalement pour la culture en suspension de cellules, comme les cellules CHO ou les levures.
 - Système d'agitation adapté à des cultures en suspension
 - Pas de microcarriers ou de surface d'adhérence intégrée.

(3) Applikon AppliFlex™

- **Type :** Bioréacteur à agitation pour culture en suspension de cellules de mammifères, avec des options de contrôle de la température, du pH et du dioxyde de carbone.
- **Caractéristiques :**
 - Offre une grande flexibilité dans les conditions de culture, destiné aux cellules en suspension.
 - Pas d'option spécifique pour les cultures de cellules adhérentes.

Document 4. Plan des locaux



Document 5. Caractéristiques des différentes zones à atmosphère contrôlée

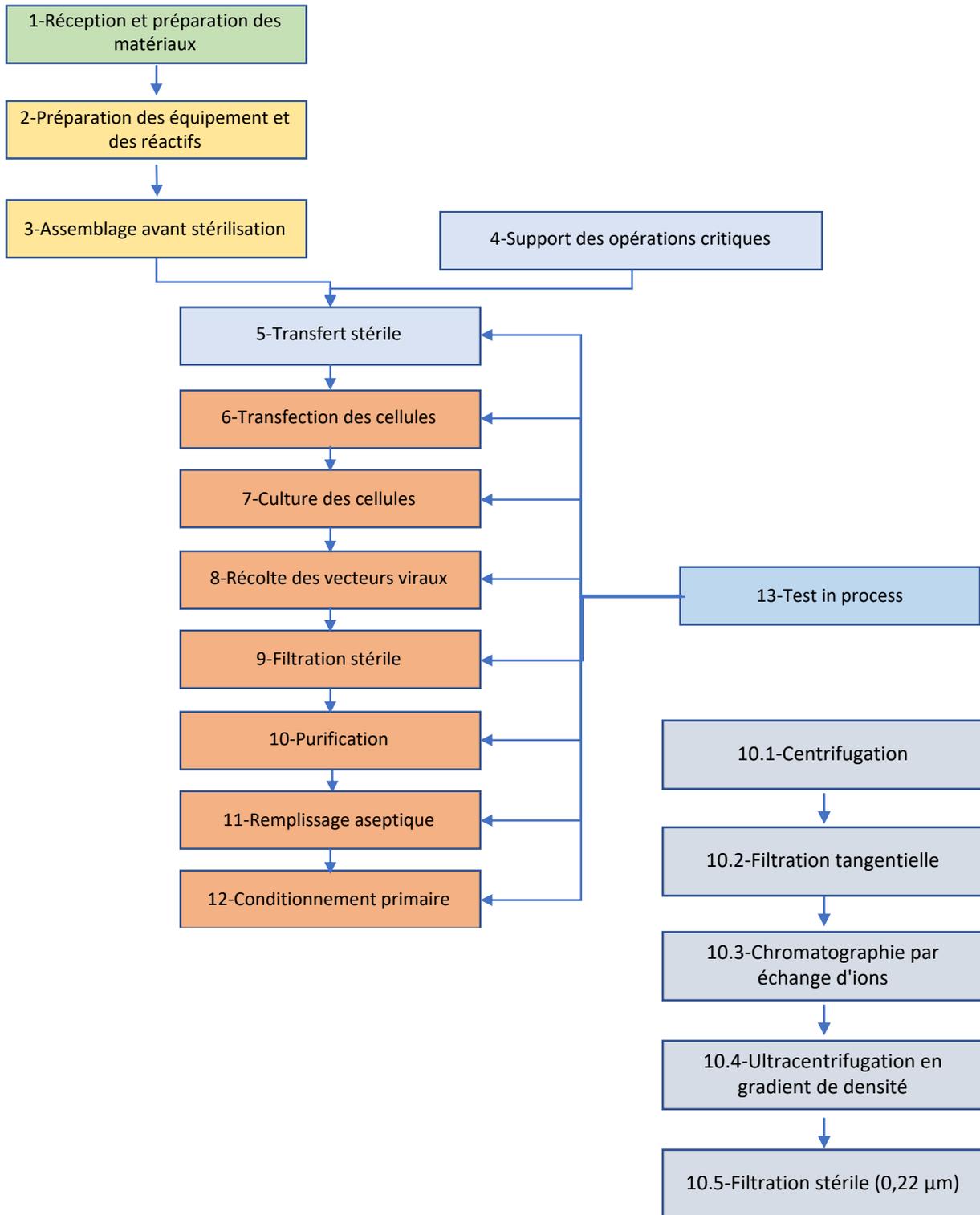
- **Zone ISO 5 / Classe A (GMP EU) :**
 - **Utilisation :** Manipulations critiques comme le remplissage aseptique, la filtration stérile, et le conditionnement primaire.
 - **Caractéristiques :**
 - Flux d'air unidirectionnel (laminaire) avec un débit de 0,36-0,54 m/s.
 - Moins de 3,5 particules $\geq 0,5 \mu\text{m}/\text{m}^3$.
 - Équipements : hotte à flux laminaire ou isolateur.

- **Zone ISO 7 / Classe B (GMP EU) :**
 - **Utilisation :** Environnement de fond pour les opérations de Classe A.
 - **Caractéristiques :**
 - Jusqu'à 352 000 particules $\geq 0,5 \mu\text{m}/\text{m}^3$.
 - Contrôle strict des paramètres de température, humidité, pression, et contamination biologique.

- **Zone ISO 8 / Classe C (GMP EU) :**
 - **Utilisation :** Préparation de matériaux non critiques (ex. réactifs) et stockage temporaire de vecteurs viraux.
 - **Caractéristiques :**
 - Jusqu'à 3 520 000 particules $\geq 0,5 \mu\text{m}/\text{m}^3$.

- **Zone ISO 9 / Classe D (GMP EU) :**
 - **Utilisation :** Zones d'entrée ou de transition pour la préparation des techniciens et des équipements.

Document 6. Diagramme des étapes de production et de purification



Document 7. Tenues professionnelles disponibles

Tenue vestimentaire conforme dans les zones de classes A et B



Tenue vestimentaire conforme dans les zones de classe C

