



I N S T I T U T
CENTRE RÉGIONAL DE LUTTE CONTRE LE CANCER
PAOLI-CALMETTES
PROVENCE - ALPES - CÔTE D'AZUR
Centre de Thérapie Cellulaire et Génique



Cancérologie et Thérapie Cellulaire

Société Française de Pharmacie Oncologique
Monte-Carlo. 16 & 17 octobre 2003

Dr. Christian CHABANNON

Plan de l'exposé

- Introduction
- Modalités de la Thérapie Cellulaire en Cancérologie
- Indications
- Conditions de mise en œuvre
- Perspectives

Qu'est ce que la Thérapie Cellulaire ?

- Ensemble de techniques thérapeutiques basées sur la réinjection ou la ré-implantation de cellules éventuellement transformées *in vitro*
 - différent de la greffe d'organes (pas d'anastomose vasculaire), avec laquelle elle partage cependant un certain nombre d'aspects éthiques et réglementaires
 - différent de la production de « spécialités pharmaceutiques » (médicaments) avec laquelle elle partage un certain nombre de règles de fonctionnement
 - différents types de greffes en fonction de l'origine des cellules
 - » greffes autologues: donneur = patient
 - » greffes allogéniques: le donneur est un individu différent du patient receveur, mais appartient à la même espèce
 - » greffes xénogéniques: greffes de cellules ou tissus d'origine animale (espèce différente; pas d'application à ce jour en onco-hématologie)

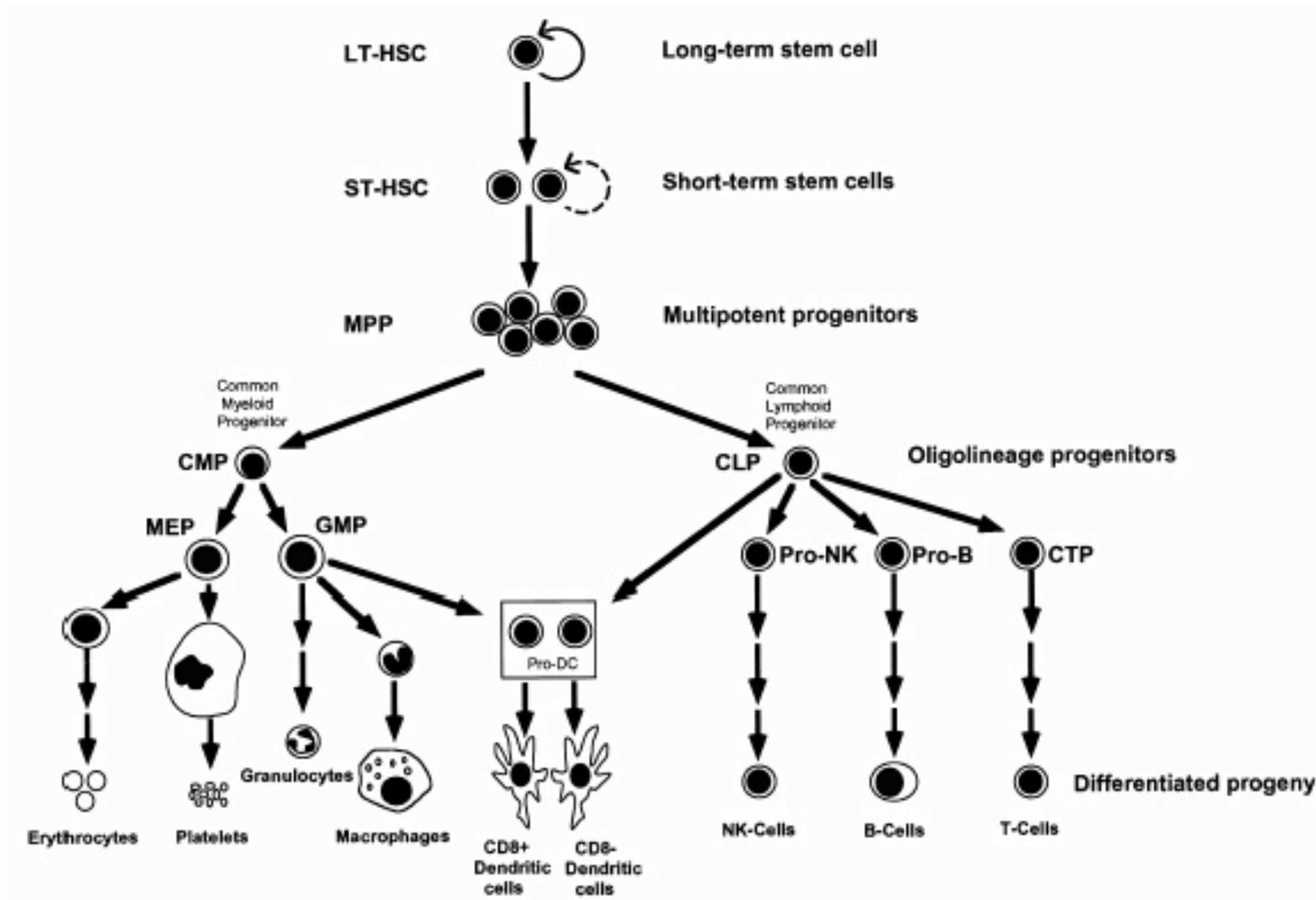
Quel est le domaine d 'application de la Thérapie Cellulaire ?

- Aujourd'hui les applications essentielles sont en onco-hématologie
 - greffes
 - » de cellules souches autologues: réparation du tissu hématopoïétique après chimiothérapie
 - » de cellules souches allogéniques: immunothérapie anti-tumorale
- De nouvelles stratégies sont en développement:
 - en onco-hématologie
 - » vaccinations (cellules dendritiques)
 - » transfert adoptif d 'effecteurs du système immunitaire (macrophages, lymphocytes ...)
 - dans d 'autres disciplines
 - » thérapie cellulaire réparatrice d 'affections traumatiques ou dégénératives (muscle, système nerveux, glandes endocrines ...)

Plan de l'exposé

- Introduction
- Modalités de la Thérapie Cellulaire en Cancérologie
- Indications
- Conditions de mise en œuvre
- Perspectives

L'hématopoïèse



Autogreffe

- Le principe est d'administrer une dose importante de chimiothérapie (en général supérieur aux recommandations de l'AMM pour le ou les cytotoxiques concernés)
 - tumeurs chimiosensibles
 - l'usage des autogreffes dépendra de l'usage des programmes de chimiothérapie à haute dose
 - bénéfique probable pour certaines hémopathies malignes (leucémies, lymphomes, myélomes ...), incertain pour les tumeurs non hématologiques (en particulier cancer du sein)
- Le greffon autologue permet de réduire la phase de neutropénie et de thrombopénie succédant à la chimiothérapie à haute dose (réduire la myélo-toxicité chimio-induite)
 - pas d'effet anti-tumoral du greffon
 - « soin de support »
- Le greffon autologue est aujourd'hui le plus souvent un greffon sanguin, prélevé par cytophérèse
 - après mobilisation des progéniteurs dans le sang périphérique par un facteur de croissance de l'hématopoïèse: le rhG-CSF, ou par certains types de chimiothérapie comme le cyclophosphamide ou l'étoposide (VP16)

Outils pour la chimiothérapie à haute dose

■ Agents cytotoxiques utilisables:

- alkylants
 - » cyclophosphamide, melphalan, busulfan
- thiotepa
- etoposide (utilisé en association avec le cyclophosphamide comme chimiothérapie de mobilisation)

■ Autres cytotoxiques associés, sans augmentation des doses

- anthracyclines
- sels de platine

■ « Top ten » parmi les cytotoxiques

- rituximab
- docétaxel
- épirubicine
- trastuzumab
- irinotécan
- fludarabine
- vinorelbine
- gemcitabine
- cytarabine

» source: enquête nationale sur les chimiothérapies anti-cancéreuses, menée par la CNAMTS

Allogreffe

- Le donneur est un individu différent mais HLA-identique au patient receveur
 - membre de la fratrie: greffe géno-identique
 - donneur volontaire de fichier: greffe phéno-identique
- L 'effet thérapeutique essentiel s'exerce via l 'effet Graft-versus-Leukemia (GvL) ou Graft-versus -Tumor (GvT)
 - résultat de la reconnaissance des cellules tumorales dérivant de l 'hôte par les lymphocytes dérivant du donneur
 - mais l 'alloréactivité s 'exerce également vis-à-vis des tissus sains de l 'hôte ⇨ maladie du greffon contre l 'hôte ou Graft-Versus-Host Disease, GVHD
- Les indications essentielles
 - hémopathies malignes (leucémies aiguës ou chroniques)
 - tumeurs non hématologiques (en cours d 'évaluation)
- Le greffon allogénique peut-être:
 - un greffon médullaire
 - un greffon sanguin (cytaphérèse), après préparation du donneur avec le rhG-CSF
 - un greffon de sang placentaire
- La difficulté essentielle est de réduire la toxicité de la procédure, tout en conservant l 'effet anti-tumoral

Plan de l'exposé

- Introduction
- Modalités de la Thérapie Cellulaire en Cancérologie
- **Indications**
- Conditions de mise en œuvre
- Perspectives

Quels sont les patients candidats à des programmes thérapeutiques incluant une autogreffe ou une allogreffe ?

■ Essentiellement en cancérologie

- hémopathies malignes
 - » leucémies aiguës
 - » lymphomes malins
 - » myélomes multiples
 - » autres ...
- néoplasies non hématologiques
 - » cancers du sein
 - » cancers de l'ovaire
 - » tumeurs testiculaires
 - » autres

Caractéristiques des patients candidats à des programmes thérapeutiques incluant une autogreffe ou une allogreffe en cancérologie ?

- Malades avec des facteurs de mauvais pronostic
 - exemple: myélomes stade II/III, ou cancer du sein avec un nombre important de ganglions axillaires envahis par la tumeur
 - importance de la définition des facteurs pronostiques, et des nouveaux outils dans ce domaine (puces à ADN ...)
- Malades à un stade avancé de leur maladie
 - exemple: lymphomes malins non Hodgkiniens en rechute
- Souvent une thérapeutique « de recours »
 - concerne une petite proportion des patients atteints de cancers

Intensification thérapeutique, autogreffe et myélomes multiples de stade II/III (1)

■ Attal et al, NEJM, 1996

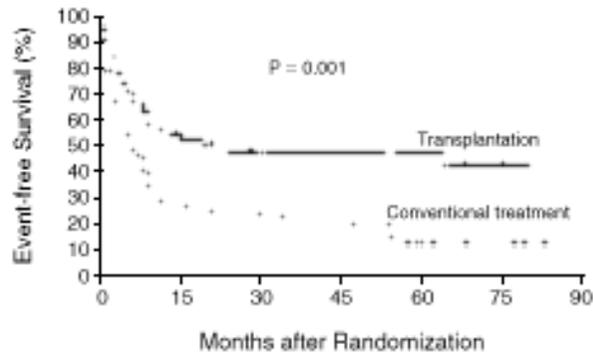


Figure 1. Kaplan-Meier Curves for Event-free Survival of Patients in the Transplantation and Conventional-Treatment Groups. The data are based on an intention-to-treat analysis. Tick marks represent censored data.

■ Attal et al, ASH Annual Meeting 2002

⇒ Les patients recevant une chimiothérapie intensifiée ont une survie prolongée, et une rémission sans rechute par rapport aux patients recevant une chimiothérapie standard

⇒ le melphalan à haute dose (200 mg/m²) produit les mêmes effets que l'association melphalan (140 mg/m²) et irradiation corporelle totale

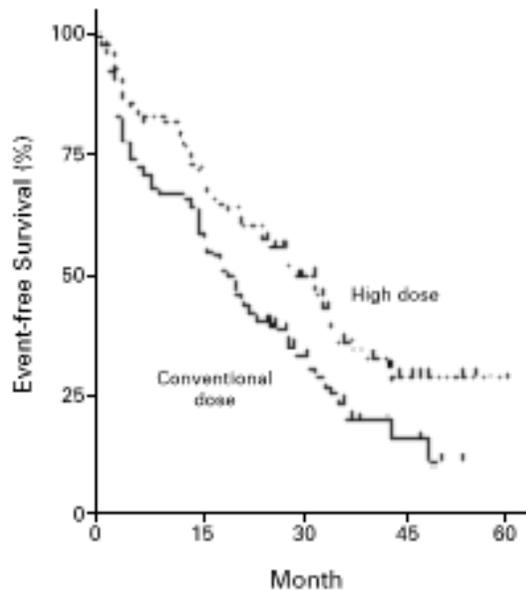
⇒ Une double intensification améliore la survie sans rechute des patients qui sont en rémission partielle à l'issue de la première intensification

Intensification thérapeutique, autogreffe et myélomes multiples de stade II/III (2)

- Incidence du myélome multiple croissante avec l'âge
 - environ X/100000 habitants
- Le débat sur l'intérêt des chimiothérapies intensifiées avec autogreffe n'est pas clos
 - évoluera avec l'introduction de nouveaux agents anti-méломateux comme les inhibiteurs du protéasome (Velcade)

Intensification thérapeutique, autogreffe et lymphomes malins non Hodgkiniens de haut grade en rechute

■ Philip et al, NEJM, 1995



Conventional dose	58 (48-68)	32 (23-42)	15 (7-28)	10 (3-27)
High dose	71 (61-79)	50 (39-55)	28 (18-40)	28 (18-40)

Figure 1. Event-free Survival According to Treatment Group. The numbers shown below the time points are probabilities of event-free survival (the percentages of patients surviving event-free) and 95 percent confidence intervals.

- ➔ Les patients en première rechute chimiosensible d'un lymphome malin non Hodgkinien B de haut grade, ont une survie améliorée après une stratégie thérapeutique incluant une autogreffe, plutôt qu'une chimiothérapie conventionnelle
- ➔ importance de la notion de chimio-sensibilité
- ➔ importance d'atteindre une rémission complète

Intensification thérapeutique, autogreffe et cancers du sein (1)

- Beaucoup d'espoir au milieu des années 1990, sur la base d'études cliniques de phase II/III
- Résultats préliminaires d'études randomisées de grande taille présentés au congrès annuel de l'ASCO en 1998
 - résultats négatifs ⇒ arrêt brutal des programmes d'autogreffe dans le cancer du sein (aux U.S.A.)
- Problèmes méthodologiques
 - malversation dans la conduite d'une des études pilotes
 - analyse trop précoce de certaines études
 - hétérogénéité des cohortes de patients
 - peu de patients traités dans des études de recherche biomédicales
 - » en France, protocoles PEGASE

Intensification thérapeutique, autogreffe et cancers du sein (2)

- Cancers du sein métastatiques
 - Stadtmauer et al, *NEJM*, 200; pas d'amélioration de la survie
- Cancers du sein inflammatoire
 - pas d'étude contrôlée permettant de conclure
 - taux de réponse pathologique intéressant dans certaines études pilotes (PEGASE 02)
- Cancers du sein avec des facteurs de mauvais pronostic: nombre élevé d'adénopathies envahies
 - Rodenhuis et al, *NEJM*, 2003, bénéfice sur la survie sans rechute pour les patients qui ne surexpriment pas erbB2
 - Tallman et al, *NEJM*, 2003; pas de bénéfice à l'intensification

Evolutions de l'allogreffe (1)

- Thomas et al, NEJM, 1975
 - L'allogreffe peut éradiquer la leucémie chez des patients réfractaires à la chimiothérapie
- Sullivan et al, NEJM & Blood, 1989
 - La survenue d'une GVH est associée à une probabilité réduite de rechute
- Maraninchi et al, Lancet, 1987
 - La T-déplétion induit une diminution de la GVH, mais une augmentation des rechutes après allogreffe
- Kolb et al, Blood, 1995
 - Chez les patients en rechute après une allogreffe, la ré-injection de lymphocytes du donneur peut induire une nouvelle rémission de l'hémopathie
- Collins et al, JCO, 1997

L'allogreffe est une modalité d'immunothérapie

Evolutions de l'allogreffe (2)

- Développement depuis quelques années des greffes à conditionnement non myélo-ablatif, ou greffes à conditionnement réduit (« mini-greffes »)
 - substitution des immuno-suppresseurs aux cytotoxiques dans le conditionnement
 - » fludarabine, busulfan à faible dose, sérum anti-lymphocytaire, irradiation corporelle ou nodale totale à faible dose
 - pas de manipulation du greffon
 - » pas de T-déplétion
 - » utilisation préférentielle de greffons sanguins à des greffons médullaires
 - après établissement du chimérisme donneur, injection de lymphocytes du donneur à titre prophylactique de la rechute tumorale

Evolutions de l'allogreffe (3)

- Elargissement des indications d'allogreffes
 - à des populations de patients plus fragiles
 - » patients plus âgés (au-delà de 45 ans)
 - à de nouvelles indications: hémopathies lymphoïdes chroniques
 - » leucémies lymphoïdes chroniques et autres
 - à de nouvelles indications: tumeurs non hématopoïétiques
 - » cancers du sein
 - Eibl et al, *Blood*, 1996
 - » cancers de l'ovaire
 - Bay et al, *Bone Marrow Transpl*, 2002
 - » cancers du rein
 - Childs et al, *NEJM*, 2000
 - » mélanomes malins: pas d'effet allogénique

La thérapie cellulaire s'insère et s'évalue dans le cadre d'une prise en charge pluridisciplinaire

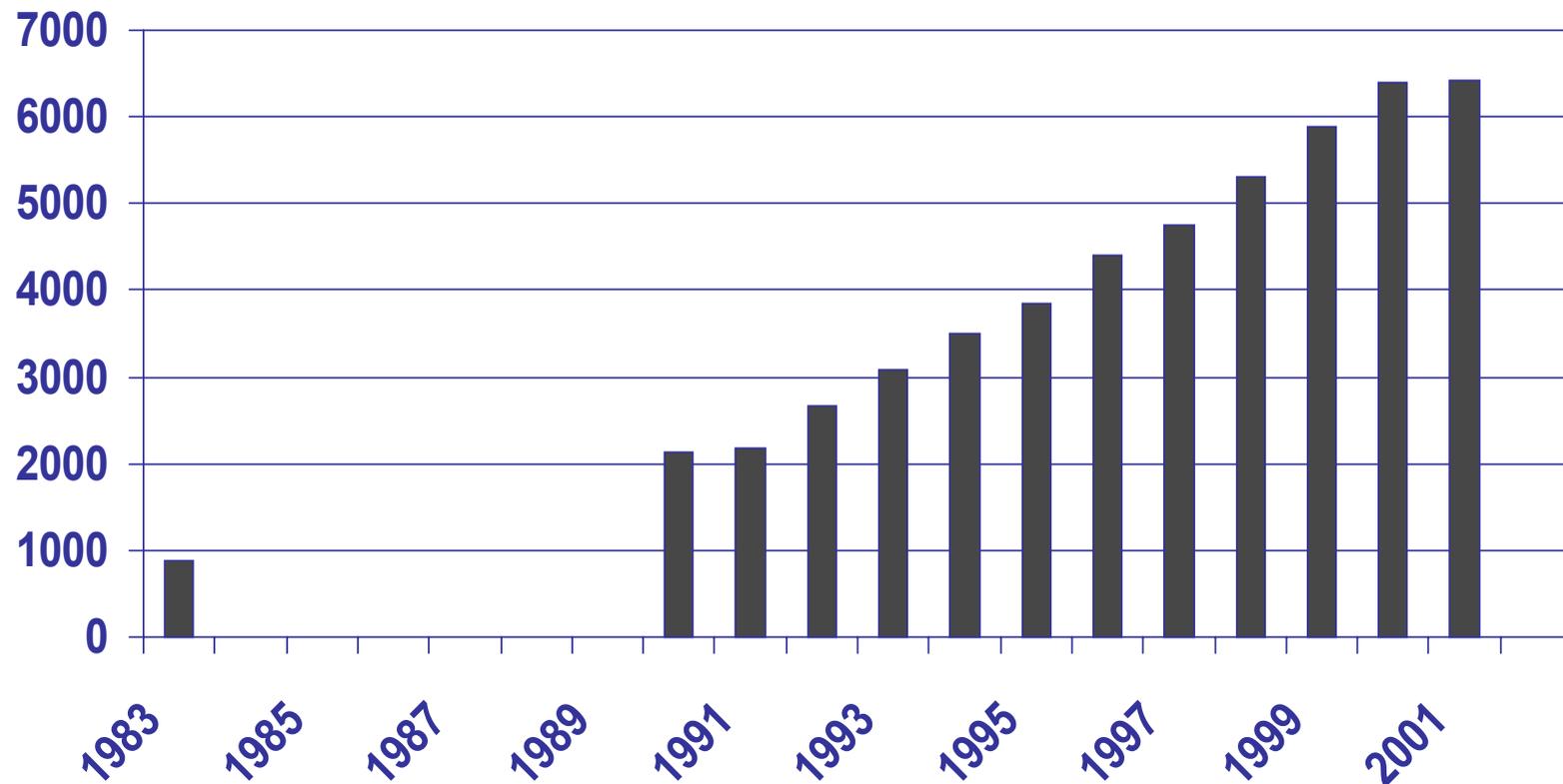
- L'autogreffe ou l'allogreffe est un « segment » du parcours thérapeutique
 - ex: la chimiothérapie à haute dose + autogreffe est essentiellement utile aux patients qui ont répondu à une chimiothérapie standard (patients en rémission), pour « consolider » ce résultat
- La place de la greffe peut changer en fonction de l'apparition d'autres modalités thérapeutiques
 - ex: la mise à disposition de l'imatinib (STI571, Gleevec®, inhibiteur de tyrosine kinase) a fait reculer les indications de greffe allogénique pour les leucémies myéloïdes chroniques

Quels sont les patients candidats à des programmes thérapeutiques incluant une autogreffe ou une allogreffe ?

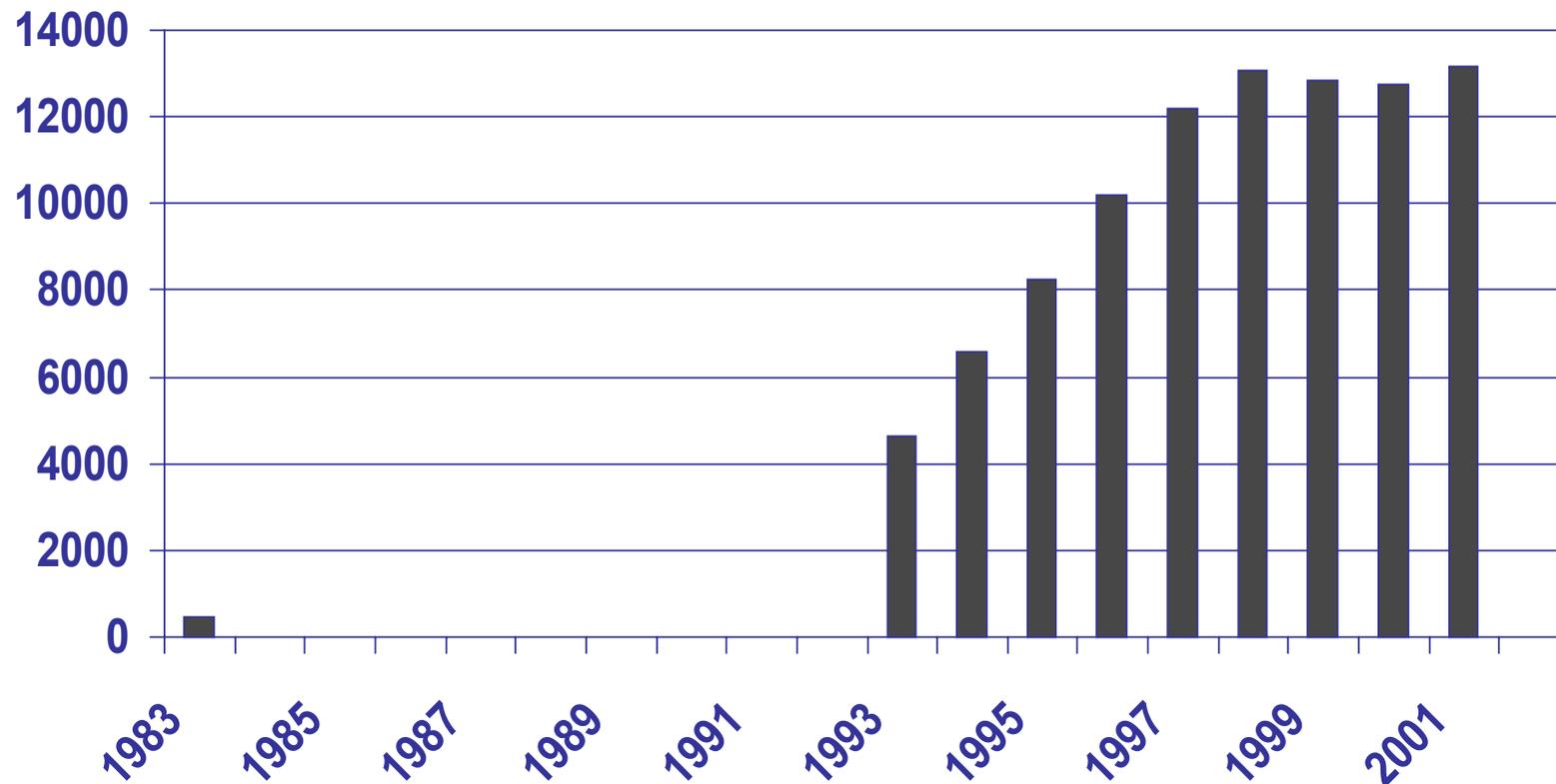
■ Hors oncologie

- maladies constitutionnelles ⇒ enfants ou adultes jeunes / allogreffes
 - » déficits immunitaires combinés sévères
 - » hémoglobinopathies (β -thalassémies, drépanocytose)
 - » enzymopathies
 - » autres ...
- Maladies acquises
 - » aplasies médullaires (allogreffe)
 - » maladies auto-immunes (autogreffe / allogreffe)
 - » autres

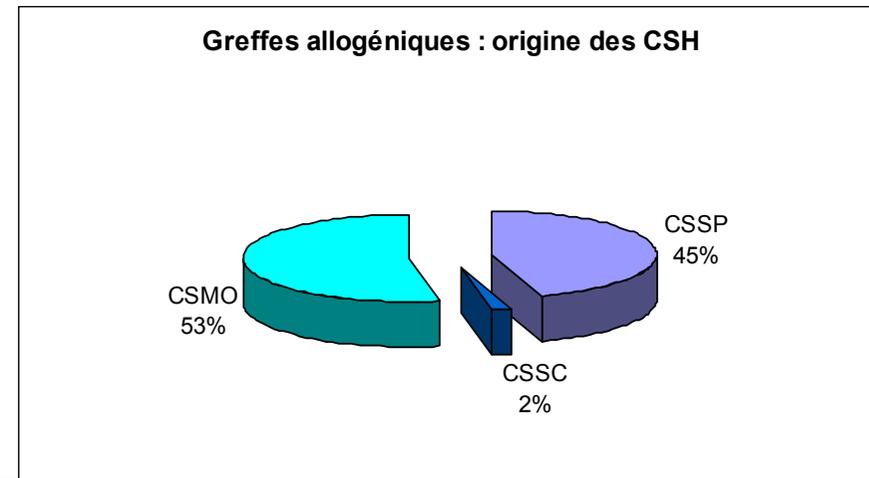
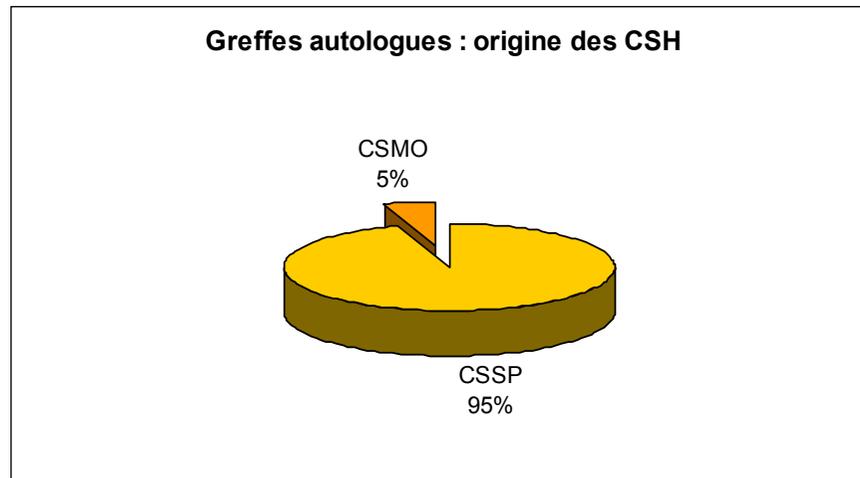
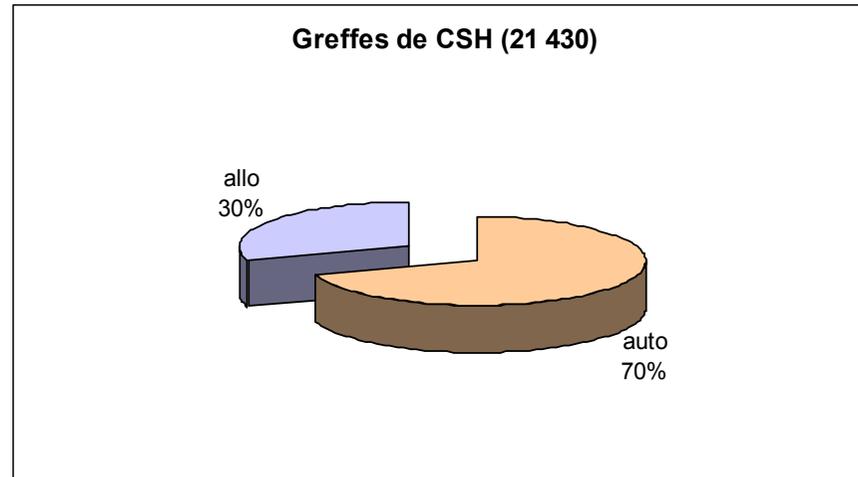
Evolution de l'activité de greffe allogénique en Europe (source : EBMT)



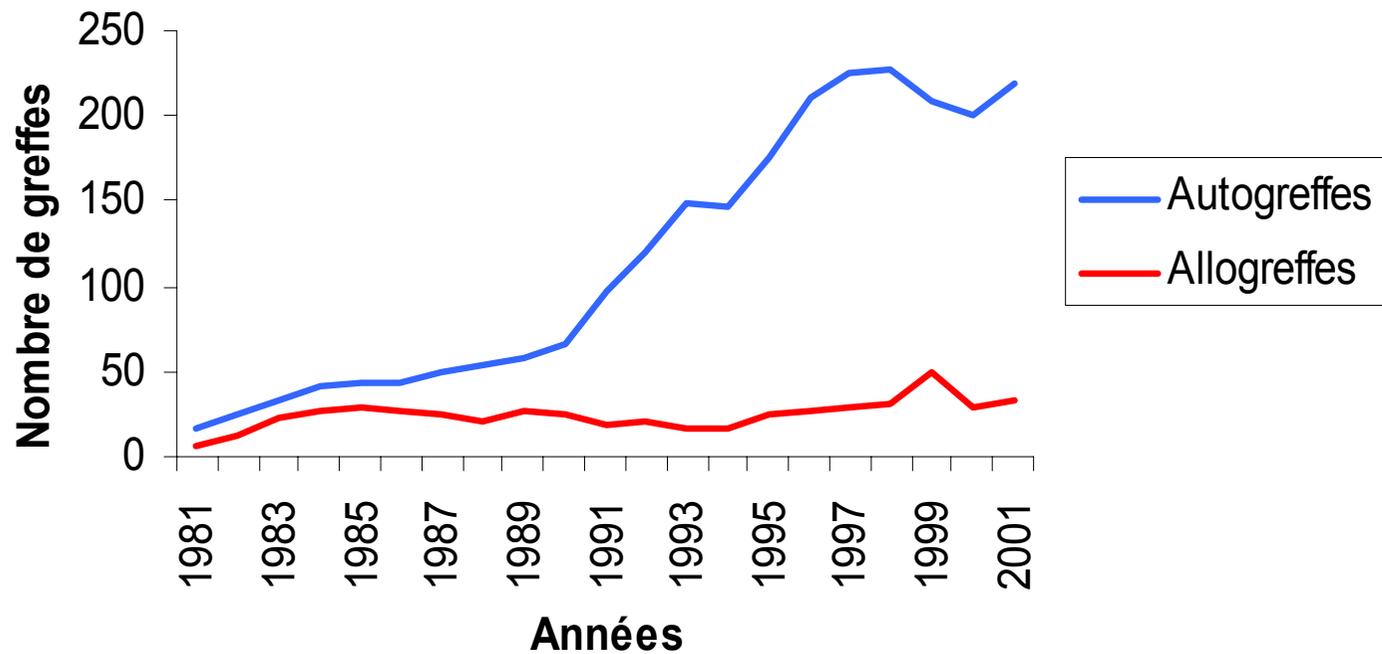
Evolution de l'activité de greffe autologue en Europe (source : EBMT)



Répartition des greffes de CSH EBMT, 1999



Evolution de l'activité de greffe à l'IPC



Plan de l'exposé

- Introduction
- Modalités de la Thérapie Cellulaire en Cancérologie
- Indications
- Conditions de mise en œuvre
- Perspectives

Les acteurs de la Thérapie Cellulaire

- L'unité de cytophérèse, responsable de l'organisation et de la réalisation du prélèvement des cellules.
- Le laboratoire de Thérapie Cellulaire, responsable de la transformation, du contrôle, de la conservation (cryo-préservation), et de la délivrance du Produit de Thérapie Cellulaire.
- Les unités de soins, responsables de la prise en charge du patient aux différentes étapes de son traitement, et donc de l'administration du PTC au patient, de la gestion des conséquences - positives et négatives - de la greffe
- Importance de la concertation et de la coordination entre ces partenaires

Environnement réglementaire (1)

■ Décret n° 97-928 du 9 octobre 1997

- relatif aux règles de sécurité sanitaire applicables à tout prélèvement d'éléments ou toute collecte de produits du corps humain et à leur utilisation à des fins thérapeutiques ...

■ Loi du 98-535 du 1° juillet 1998

- relative au renforcement de la veille sanitaire et du contrôle de la sécurité sanitaire des produits destinés à l'homme (portant création de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé ou AFSSaPS)

■ Arrêté du 16 décembre 1998

- Bonnes pratiques relatives au prélèvement, au transport, à la transformation, y compris la conservation des cellules souches hématopoïétiques issues du corps humain et des cellules mononucléées sanguines utilisées à des fins thérapeutiques

Environnement réglementaire (2)

■ Décret n° 2001-909 du 1° octobre 2001

- relatif aux cellules et aux produits de thérapie génique et cellulaires fixant les conditions d'autorisation des établissements, organismes, procédés, produits et protocoles d'essais cliniques et modifiant le code de la santé publique

■ Arrêtés du 03 février 2003

- fixant le contenu des dossiers d'autorisation, de renouvellement et de modification de l'autorisation des établissements ou organismes exerçant des activités de préparation, de conservation, de distribution et de cession de cellules et de produits de thérapies génique et cellulaire qui ne constituent pas des spécialités pharmaceutiques ou d'autres médicaments fabriqués industriellement
- fixant le contenu du dossier accompagnant la demande d'autorisation de procédés de préparation, de conservation et de transformation des cellules et des produits de thérapie cellulaire

L 'organisation des laboratoires de Thérapie Cellulaire (1)

- Des locaux confinés, à empoussièrement réduit, à accès limité et conçus autour de circuits fonctionnels (PTC, réactifs et consommables, déchets ...)
 - classes D / classes 100.000
 - classes C / classes 10.000
- Formation continue et évaluation des compétences du personnel
 - les personnels sont des techniciens de laboratoire
 - l 'encadrement est assuré par des médecins, pharmaciens ou scientifiques
- Système documentaire
- Système Assurance Qualité

Qualification des locaux

Classification des différentes qualités d'air requises pour les transformations des produits cellulaires

CLASSE (1)	DEGRÉ	EFFICACITÉ DU FILTRE terminal (3) (en %)	NOMBRE DE PARTICULES/M ³ DE TAILLE		NOMBRE MAXIMUM de micro-organismes par m ³
			0,5 μ	5 μ	
100	A2	99, 997	3 500	0	< 1
1 000	B		35 000	200	
10 000	C		350 000	2 000	
100 000	D	95	3 500 000	20 000	< 500

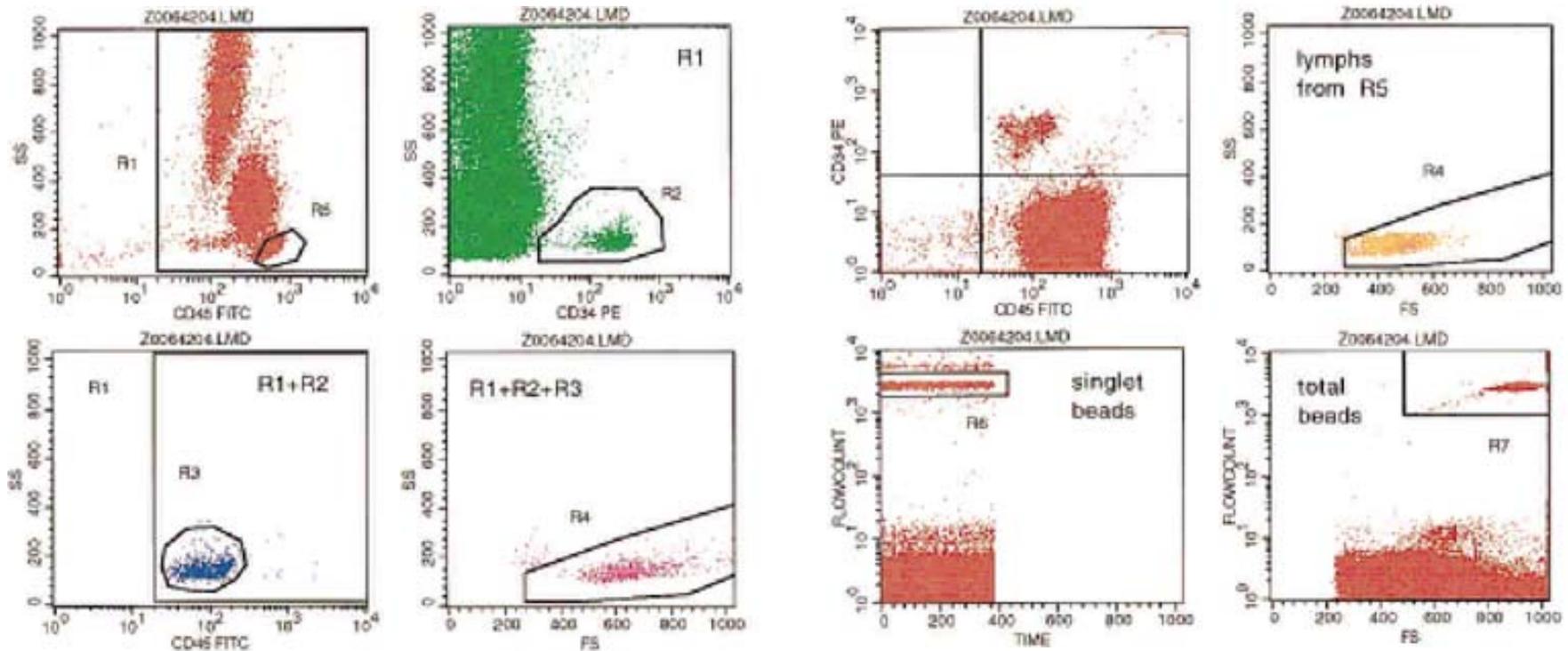
1 : US Federal Standard 209C.
 2 : Poste de travail à écoulement d'air unidirectionnel.
 3 : British Standards Institution 3928, Londres 1969.



L 'organisation des laboratoires de Thérapie Cellulaire (2)

- Enchaînement d 'actes techniques plus ou moins complexes et plus ou moins nombreux
- Deux types de tâches
 - transformation du PTC
 - contrôle de qualité
 - obligation légale de faire effectuer ces tâches par deux personnes différentes pour un PTC
 - » n 'exclut pas la polyvalence des personnels, et leur participation planifiée aux différentes tâches
- Documentation des actes effectués, et des écarts par rapport aux résultats attendus
 - » fiches d 'instruction, fiches d 'enregistrement - système documentaire +++

Numération des cellules CD34⁺ dans un produit de cytophérèse avec une trousse diagnostique



Greffe de cellules souches hématopoïétiques: schéma général

- **Mobilisation des progéniteurs circulants**
 - G-CSF +/- chimiothérapie (cyclophosphamide)

- **Collecte des progéniteurs**
 - ponctions médullaires sous anesthésie
 - cytaphérèse(s)

- **Evaluation de la qualité du greffon**
 - phénotypie (CD34), cultures clonogéniques
 - contamination tumorale et microbiologique

- **Cryopréservation du greffon**
 - descente en température programmée
 - conservation en azote liquide

- **Décongélation et injection du greffon**

Liaison avec les unités de soins

- Prélèvement:
 - ordonnance nominative
 - acte planifié, préparé
- Délivrance des PTC
 - ordonnance nominative, complète (identifiant unique patient, identifiant unique PTC, date de délivrance)
 - technique codifiée de ré-injection (procédure harmonisée entre les différentes unités de soins)
 - retour des résultats vers la laboratoire
 - » effets indésirables: BioVigilance
 - » effets thérapeutiques: prise de greffe, activité anti-tumorale

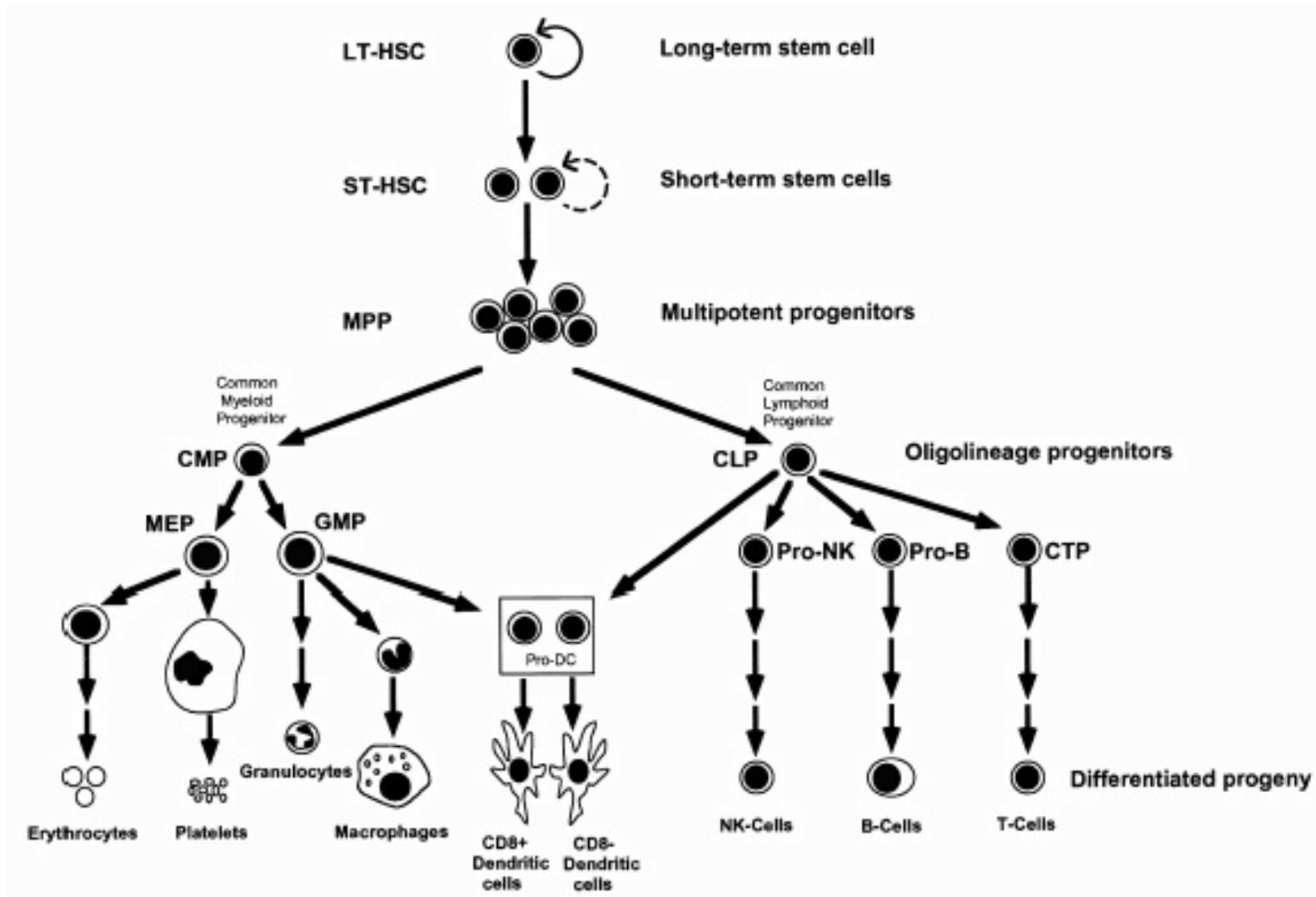
Les démarches d'accréditation

- Respect des textes opposables
 - bonnes pratiques de fabrication (*gmp*)
 - GBEA
- Différents référentiels
 - ISO
 - COFRAQ
 - JACIE (Joint Accreditation Committee for ISCT Europe and EBMT)
- Investissement important
 - mais culture déjà très présente dans les laboratoires de thérapie cellulaire ⇒ terrain assez favorable

Plan de l'exposé

- Introduction
- Modalités de la Thérapie Cellulaire en Cancérologie
- Indications
- Conditions de mise en œuvre
- Perspectives

L'hématopoïèse



Place des innovations dérivées des biotechnologies dans la manipulation des greffons, et la préparation de populations cellulaires bien caractérisée

- Outils pour la manipulation des cellules souches hématopoïétiques
 - sélection, amplification, manipulation génétique
 - très peu d'applications
- Outils pour l'immunothérapie
 - transfert adoptif de macrophages, de lymphocytes ...
 - vaccination anti-tumorale
 - en cours d'évaluation

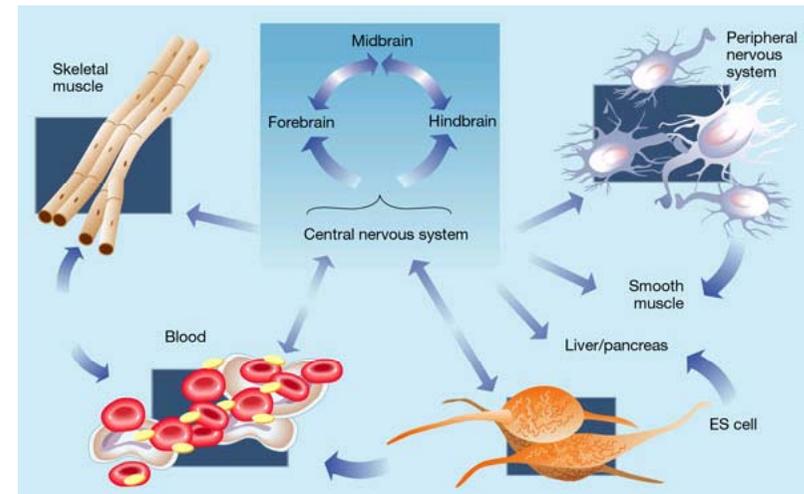
L 'évolution des concepts en matière de cellules souches

- Plasticité des cellules souches somatiques
 - la différenciation dépend de l 'environnement
 - problème quantitatif pour les applications en thérapie cellulaire
- Identification des cellules souches embryonnaires chez les primates
 - Thomson et al, Science, 1995
 - Exploration de la capacité de ces cellules à de différencier *in vitro* vers un ou plusieurs lignages définis
 - Disparition de la capacité tumorigène des cellules indifférenciées ?
 - Perspectives en thérapie cellulaire: aspects scientifiques, sociaux, philosophiques, religieux

Vers des développements thérapeutiques en dehors de l'onco-hématologie ?

■ Traitements de pathologies traumatiques ou dégénératives, à partir de cellules d'origine médullaire ?

- Cartilage, os
- Muscle strié, myocarde
 - » myocarde
 - » maladies vasculaires
- Neurologie
 - » pathologies traumatiques
 - » AVC
 - » Parkinson, Alzheimer
- Insuffisance hépatocytaire
- ...



La Thérapie Cellulaire: un outil pour la recherche clinique

- Développement de stratégies thérapeutiques innovantes, dans de nombreuses disciplines médicales, y compris en onco-hématologie
- Permet de tester de nouveaux outils biologiques
 - pour préparer le greffon (sélectionner, amplifier, activer ... une population cellulaire définie)
 - pour évaluer l'effet thérapeutique du traitement (exemple: le monitoring de la réponse immune anti-tumorale ou anti-infectieuse = immuno-monitoring)
- Intérêt des organismes de recherche (Inserm) pour avoir un accès aux plates-formes de Thérapie Cellulaire

GLOSSAIRE

■ Hématopoïèse

- processus ordonné et flexible par lequel une population très minoritaire de cellules souches hématopoïétiques est capable par différenciation et prolifération de donner naissance à tous les éléments figurés du sang

■ Cellule souche hématopoïétique

- cellule capable d'autorenouvellement et qui peut, sous l'effet de facteurs de croissance hématopoïétiques, se différencier vers différentes lignées

■ Progéniteurs clonogéniques

- cellules capables de multiplication mais déjà engagées dans une lignée et capables de former des colonies lorsqu'elles sont mises en culture en milieu semi-solide en présence de cytokines (CFU-GM, BFU-E ...)

■ CD34

- glycoprotéine membranaire exprimée aux stades précoces de l'hématopoïèse et utilisée pour identifier ou isoler les progéniteurs hématopoïétiques

GLOSSAIRE

■ **Conditionnement** (*traitement myéloablatif*)

- chimiothérapie à haute dose associée ou non à une irradiation corporelle totale à visée antitumorale et dont l'intensité nécessite une réinjection de cellules souches hématopoïétiques

■ **Mobilisation**

- passage des cellules souches hématopoïétiques dans le sang périphérique
 - » au moment de la sortie d'aplasie post-chimiothérapie
 - » sous l'effet de facteurs de croissance hématopoïétiques (G-CSF)

■ **Reconstitution hématopoïétique**

- seuils de $0,5 \cdot 10^9$ polynucléaires/l et $20 \cdot 10^9$ plaquettes/l au-delà desquels les risques infectieux et hémorragiques sont théoriquement réduits