

Direction : Direction des Métiers Scientifiques
Pôle : Qualité Pharmaceutique Biologique et Sécurité Virale
Personnes en charge : Guillaume BELLARD

Comité Scientifique Permanent
« Sécurité et Qualité des Médicaments »
Formation restreinte Sécurité Virale
Séance du 29 novembre 2022

Ordre du jour

Points	Sujets abordés	pour audition, information, adoption ou discussion
I	Introduction et point sur les déclarations publiques d'intérêt	Pour information
II	Dossiers thématique	Pour discussion
II.1	Introduction concernant le contexte technico-réglementaire du remplacement de techniques de contrôles d'agents adventices <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> par des techniques NGS (Next Generation Sequencing)	
II.2	Audition de Pathoquest : présentation de travaux scientifiques concernant des données comparant des contrôles <i>in vivo/in vitro</i> à des contrôles NGS	
III	Conclusion	Pour délibération

Participants

Nom des participants	Statut (modérateur, membre, évaluateur, ...)	Présent	Absent /excusé
Membres			
AUBIN Jean-Thierry	Membre	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
BERINGUE Vincent	Membre	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
DE ROUEMENT Alexis	Membre	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
PAYAN Christopher	Membre	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
POLLARD Hélène	Membre	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
AUDITIONNÉS – Société PATHOQUEST			
BREPSON Jean-François	Pathoquest	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
BEURDELEY Pascale	Pathoquest	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ELOIT Marc	Pathoquest	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
LOUAZANI Amina	Pathoquest	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
RENOUF Sébastien	Pathoquest	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ANSM			
BEAULIEUX Frédéric		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
BELLIARD Guillaume		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
BEREND Soline		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
CHENIVESSE Xavier		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
GOGUET-RUBIO Perrine		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
DE LIGNEVILLE Laure		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

I. Introduction et point sur les déclarations publiques d'intérêt

Le modérateur, après avoir vérifié que les membres n'ont pas de nouveaux liens à déclarer et que les DPI sont à jour, précise qu'aucune situation de conflit d'intérêts n'a été identifiée ou signalé au regard du dossier thématique à l'ordre du jour.

II. Dossiers thématique

II.1. Introduction concernant le contexte technico-réglementaire du remplacement de techniques de contrôles d'agents adventices *in vivo* et *in vitro* par des techniques NGS (Next Generation Sequencing)

La sécurité virale des produits de santé, dès lors qu'ils sont produits et/ou issus de produits d'origine biologique est basée sur trois approches complémentaires : i) la qualité du matériel de départ et des autres matières premières, ii) la capacité du procédé de fabrication à éliminer/inactiver les virus, iii) les contrôles virologiques effectués en cours de production.

En particulier, les contrôles virologiques peuvent être effectués par des techniques dites *in vivo* (inoculation des échantillons à tester chez des animaux, fréquemment des souris adultes, souris, cobaye, œufs embryonnés), *in vitro* (inoculation de cultures cellulaires de lignées cellulaires) et moléculaires (PCR, techniques moléculaires à large spectre).

Concernant les contrôles d'agents adventices *in vivo*, ceux-ci sont mis en œuvre pour la détection d'agents étrangers viraux dans les banques de cellules, les lots de semences et les récoltes de culture cellulaire. Leur usage est amené à se réduire notamment pour les raisons suivantes :

- Le contexte réglementaire européen, reprenant le principe dit des « 3R » (« remplacer » recourir à des méthodes substitutives à l'utilisation d'animaux, « réduire » limiter le nombre d'animaux utilisés et « raffiner » optimiser l'expérimentation pour améliorer le bien-être animal ; article 4 de la directive 2010/63/UE du Parlement européen et du conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques).

- les contrôles d'agents adventices *in vivo* ont pu montrer leurs limites dans certains cas, n'ayant pas permis de mettre en évidence la présence de virus contrairement à certaines techniques de détection moléculaire. La spécificité (susceptibilité des espèces animales à l'infection virale) et la sensibilité des contrôles *in vivo* sont variables et les données de validation de ces essais sont limitées ou inexistantes (Chapitre 5.2.14 « Substitution de méthode(s) *in vitro* aux méthodes *in vivo* pour le contrôle de la qualité des vaccins » de la Ph. Eur).

Par conséquent, la réglementation applicable (chapitres de la Ph. Eur. et guideline ICH Q5A en cours de révision (R2)), selon les produits d'origine biologique concernés, permet des alternatives à l'usage d'essais *in vivo* (aussi *in vitro*) et notamment les techniques de détection par méthodes moléculaires. Le chapitre 5.2.3 « Substrats cellulaires utilisés pour la production de vaccins pour usage humain » et le chapitre 2.6.16 « Essai des agents étrangers dans les vaccins viraux pour usage humain » disposent que « En accord avec l'Autorité compétente, des méthodes moléculaires à large spectre (séquençage à haut débit, par exemple) peuvent servir d'alternatives aux essais *in vivo* et aux techniques spécifiques d'amplification des acides nucléiques, ou être utilisées en complément ou à la place des essais de culture *in vitro*, sur la base d'une évaluation du risque ».

Le projet de guideline révisée ICH Q5A(R2) intègre cette possibilité, le paragraphe 3.2.3 *In Vivo Assays* recommande « NGS is encouraged as a replacement for *in vivo* assays because of the breadth of viruses it detects and because its use promotes the global objective to replace, reduce, and refine the use of animal testing. Use of NGS to replace *in vivo* assays may be justified by submitting a validation package. »

Un chapitre général sur le séquençage à haut débit pour la détection des agents étrangers (2.6.41) est en cours d'élaboration par l'EDQM, il comprendra notamment une description de la technologie et des recommandations relatives à la validation de la méthode. La question de la validation des méthodes de séquençage à haut débit est aussi discutée dans le cadre de groupes d'experts comme l'AVDTIG

(Advanced Virus Detection Technologies Interest Group) supervisé par la PDA (Parenteral Drug Association), les discussions de ce groupe portent sur : la sélection/préparation/traitement des échantillons selon les approches génomiques, viromiques, transcriptomiques), les réactifs de référence viraux, les bases de données (développement d'une base de données publique de référence sur les virus, complète et correctement annotée), l'optimisation des pipelines bioinformatiques pour l'analyse NGS et les stratégies de suivi pour confirmer un résultat positif.

Dans le cadre du CSP, une brève introduction concernant ces aspects a été présentée, la compagnie Pathoquest est ensuite auditionnée.

Pathoquest a développé une approche transcriptomique basée sur le séquençage de nouvelle génération pour la détection de l'infection par des virus adventices de cellules eucaryotes en collaboration avec le laboratoire Charles River (CRL). Les résultats d'une étude comparative de la sensibilité analytique de contrôles *in vivo* vs l'essai par la technique transcriptomique NGS proposée est présentée.

II.2. Audition de Pathoquest : présentation de travaux scientifiques concernant des données comparant des contrôles *in vivo/in vitro* à des contrôles NGS

Le séquençage de nouvelle génération (« Next Generation Sequencing » (NGS)), également connu sous le nom de séquençage à haut débit, est une technique moléculaire qui a démontré des capacités significatives dans la détection de divers virus. Sa grande sensibilité et sa capacité à détecter un large spectre de virus font du NGS une solution pour l'identification des virus adventices. Cette technologie permet de réduire la nécessité de la mise en œuvre d'essais sur les animaux, de raccourcir le temps nécessaire aux essais de sécurité virale des produits biologiques et d'améliorer la sécurité des produits.

Pathoquest a développé une approche transcriptomique basée sur le NGS pour la détection d'infections de cellules eucaryotes par des virus adventices. Cette approche implique l'utilisation d'essais « stranded RNA-seq NGS » afin d'améliorer l'interprétation des résultats positifs et augmenter la spécificité de la détection des virus. La méthode a été validée conformément à l'ICH Q2(R1).

En outre, Pathoquest a mené, en collaboration avec Charles River, une étude comparative pour évaluer la sensibilité analytique des essais *in vivo* conventionnels par rapport à la technique transcriptomique NGS pour l'analyse de la contamination virale dans les substrats cellulaires. L'objectif était de démontrer que la technique NGS peut servir de méthode alternative pour la détection d'agents adventices.

L'étude a été conçue sur la base de deux références principales. Premièrement, le chapitre 5.2.14 de la Pharmacopée européenne, qui suggère la possibilité de remplacer les méthodes *in vivo* par des méthodes *in vitro* pour le contrôle de la qualité des vaccins. Deuxièmement, sur la base d'une étude réalisée par Gombold *et al.* (2014) qui a évalué les essais *in vitro* et *in vivo* sur les virus adventices et a montré que les essais *in vitro* étaient plus performants que les essais *in vivo* en permettant la détection d'une plus large gamme de virus avec une plus grande sensibilité.

Les virus sélectionnés pour l'étude ont été classés comme suit en fonction de leur sensibilité dans les essais *in vivo* et *in vitro*, comme l'a démontré l'étude de Gombold : Les virus de la catégorie A, y compris le virus de la stomatite vésiculaire et le virus de l'influenza A, ont été choisis pour leur grande sensibilité dans les essais *in vivo*. On s'attend à ce qu'ils constituent les modèles les plus défavorables pour la détection par NGS. Les virus de la catégorie B, tels que le virus de l'herpès simplex de type 1, les virus Coxsackie A et B et des oreillons, ont été sélectionnés pour leur sensibilité modérée à faible dans les essais *in vivo*, mais plus élevée dans les essais *in vitro*. Les virus de la catégorie C, dont l'échovirus 11, la rougeole et le virus de la diarrhée virale bovine, qui n'ont pas été détectés *in vivo*.

Pour imiter plus précisément les matrices faisant l'objet de contrôles virologiques par les industriels, un modèle de cellule infectée a été développé dans lequel les cellules hôtes ont été infectées par ces virus respectifs. Cette approche diffère de la technique conventionnelle d'essais par surcharge virale, qui consiste à injecter directement des virus dans une matrice d'essai. Le modèle de cellule infectée représente mieux les schémas de synthèse d'acides nucléiques pendant les infections virales, y compris les transcrits d'ARN viral qui sont détectés à l'aide de l'approche transcriptomique NGS.

Les échantillons soumis aux essais NGS et *in vivo* ont été préparés à partir des mêmes cultures infectées. Les essais *in vivo* ont été effectués sur des souris allaitantes, des souris adultes et des œufs de poule embryonnés, en utilisant les méthodes les plus sensibles décrites dans la publication de Gombold *et al.* Pour le volet NGS, l'ARN a été isolé à partir de culots de cellules infectées congelées et dilué dans des extraits d'ARN provenant de culots de cellules non infectées afin de simuler la dilution du matériel infecté.

Des bibliothèques d' « ARN-seq » ont été préparées à partir des extraits d'ARN total et le séquençage a été effectué à l'aide d'un séquenceur « NextSeq ». Les paramètres Illumina ont été utilisés pour évaluer la qualité du séquençage. Le produit « PathoQuest Viral Safety » a été utilisé pour l'analyse bioinformatique agnostique virale, qui comprenait des étapes de prétraitement, d'assemblage *de novo* et d'assignation taxonomique, détaillées dans la figure 1 ci-dessous.

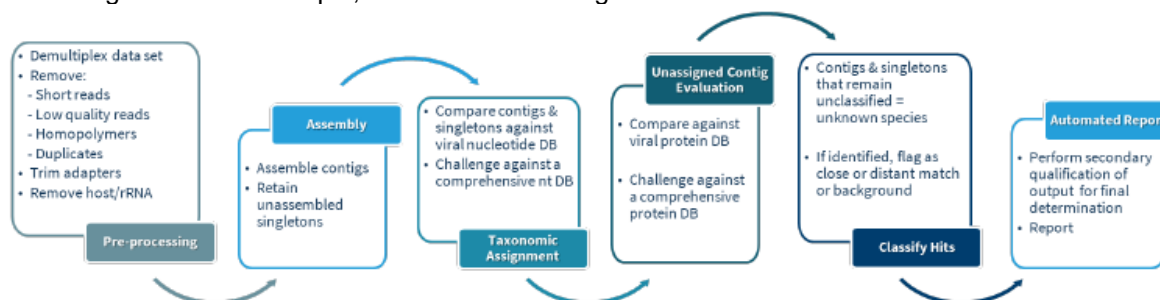


Figure 1- Bioinformatics analysis pipeline

Les résultats de l'étude comparant les limites de détection (LOD) pour les essais *in vivo* et NGS sont présentés dans la figure 2. La limite de détection a été définie comme la dilution la plus élevée qui donne un résultat positif. Elles sont exprimées en tant que ratio de cellules infectées/non infectées qui fournit un signal NGS (reads). Pour les essais *in vivo*, une dilution est considérée comme positive si au moins 20 % des animaux/œufs meurent.

Les résultats démontrent la grande sensibilité de la NGS dans la détection des cellules infectées, même dans des échantillons très dilués. La NGS a montré une sensibilité équivalente ou supérieure à celle des essais *in vivo* pour les virus des catégories B et C. Toutefois, pour les virus de la catégorie A, la sensibilité de la NGS était inférieure ou à peine inférieure à celle des essais *in vivo*, principalement en raison de la nature hautement proliférique de ces virus chez les animaux. La NGS a pu détecter une cellule infectée parmi 10^7 cellules non infectées, ce qui souligne sa grande sensibilité pour les virus de la catégorie A.

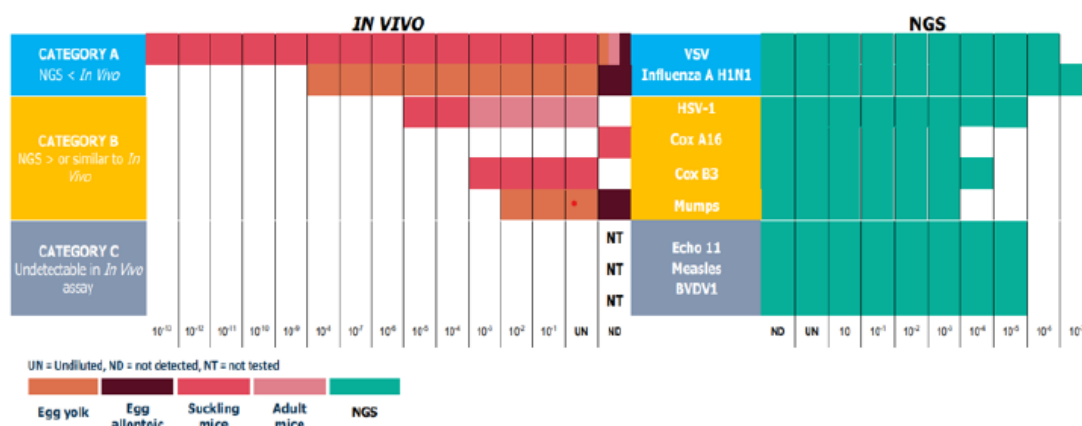


Figure 2- Summary of limits of detection of *in vivo* and NGS assays for model adventitious viral agents. Limits of Detection (LOD) are expressed in dilutions of infected cell into non infected cells for the *in vivo* assay (left) and NGS assay (Right).

Le large spectre de détection des essais par NGS permet d'identifier des virus qui ne peuvent pas être détectés par les essais *in vivo*, améliorant ainsi la sensibilité diagnostique des contrôles virologiques. Cette étude comparative confirme le potentiel de l'essai transcriptomique NGS en tant que

remplacement des stratégies traditionnelles d'essai *in vivo*, offrant une meilleure garantie de sécurité et ouvrant de nouvelles possibilités pour des produits biologiques et des thérapies innovants plus sûrs.

Des questions se posent quant à l'acceptation réglementaire de la technologie en tant qu'alternative aux essais *in vivo* et aux exigences technico-réglementaires pour l'implémentation des méthodes basées sur le NGS dans le cadre de la fabrication des produits biologiques et des stratégies de contrôle qualité des fabricants.

III. Conclusion

Au vu notamment

- Du contexte réglementaire européen, reprenant le principe dit des « 3R » (« remplacer » recourir à des méthodes substitutives à l'utilisation d'animaux, « réduire » limiter le nombre d'animaux utilisés et « raffiner » optimiser l'expérimentation pour améliorer le bien-être animal ; article 4 de la directive 2010/63/UE du Parlement européen et du conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques).
- Des limites des contrôles d'agents adventices *in vivo* dans certains cas, ceux-ci n'ayant pas permis de mettre en évidence la présence de virus contrairement à certaines techniques de détection moléculaire (notamment des techniques NGS). La spécificité (susceptibilité des espèces animales à l'infection virale) et la sensibilité des contrôles *in vivo* étant variables et les données de validation de ces essais étant limitées ou inexistantes (Chapitre 5.2.14 « Substitution de méthode(s) *in vitro* aux méthodes *in vivo* pour le contrôle de la qualité des vaccins » de la Ph. Eur).
- Du chapitre 5.2.3 de la Ph. Eur. « Substrats cellulaires utilisés pour la production de vaccins pour usage humain » (notamment applicable dans le cadre de la production de MTI, thérapie génique, Cf chapitre 5.14 « Médicament de transfert génétique à usage humain)) disposant que « En accord avec l'Autorité compétente, des méthodes moléculaires à large spectre (séquençage à haut débit, par exemple) peuvent servir d'alternatives aux essais *in vivo* et aux techniques spécifiques d'amplification des acides nucléiques, ou être utilisées en complément ou à la place des essais de culture *in vitro*, sur la base d'une évaluation du risque ».
- De la révision de la guideline ICH Q5A (R2) en cours (Draft version Endorsed on 29 September 2022, Currently under public consultation) intégrant notamment les dispositions citées.
- Des discussions avec les experts du CSP.

La position du CSP est la suivante concernant les questions posées :

Question 1

Sur la base des données présentées, les techniques *in vivo* sont-elles substituables par l'approche NGS transcriptomique de Pathoquest pour ce qui concerne le contrôle des cellules dans le cadre de la fabrication de médicaments de thérapie innovante (notamment les médicaments de thérapie cellulaire et génique), d'un point de vue réglementaire, pour les demandes d'autorisation d'essais cliniques en particulier, pour la qualification :

- Des banques cellulaires pour les produits de thérapie génique ?

Les techniques de contrôle *in vivo* peuvent être substituées par des contrôles selon l'approche NGS transcriptomique présentée pour les banques cellulaires utilisées dans le cadre de la production de MTI (notamment les médicaments de thérapie cellulaire et génique).

- Des matières premières à usage pharmaceutique et les produits finis dans le cadre des thérapies cellulaires et thérapies géniques ex vivo ?

Les techniques de contrôle *in vivo* (dès lors qu'elles seraient mises en œuvre) peuvent être substituées par des contrôles selon l'approche NGS transcriptomique présentée pour des matières premières (« starting material » cellulaires) et les produits finis (cellules).

Question 2

Sur la base des données présentées, les techniques *in vivo* sont-elles substituables par l'approche NGS transcriptomique de Pathoquest pour ce qui concerne le contrôle des cellules dans le cadre de la production de vaccins, d'un point de vue réglementaire, pour les demandes d'autorisation d'essais cliniques, en particulier, pour la qualification :

- Des banques de cellules (MCB, WCB) ?

Les techniques de contrôle *in vivo* des banques de cellules (MCB, WCB) utilisées dans le cadre de la production de vaccins peuvent être substituées par des contrôles selon l'approche NGS transcriptomique présentée.

- Des cellules non infectées (contrôles) en fin de production ?

Les techniques de contrôle *in vivo* des cellules non infectées utilisées dans le cadre de la production de vaccins peuvent être substituées par des contrôles selon l'approche NGS transcriptomique présentée.

Question 3

Les techniques de contrôle *in vitro* des banques de cellules (MCB, WCB, EOPC) utilisées pour la production de protéines recombinantes sont-elles en principe substituables par l'approche NGS transcriptomique de Pathoquest pour les demandes d'autorisation d'essais cliniques ?

Les techniques de contrôle *in vitro* des banques de cellules (MCB, WCB, EOPC) utilisées pour la production de protéines recombinantes sont substituables par une approche NGS transcriptomique dans le cadre de demandes d'autorisation d'essai cliniques. Le projet de guideline révisée ICH Q5A (R2) indique « When applicable, NGS should be considered to replace the *in vivo* test and may be used to supplement or replace the *in vitro* and other virus specific tests based on assay suitability and risk assessment. »

Quel type/niveau d'information serait alors attendu dans les dossiers correspondants ?

Les experts du CSP n'ont pas soulevé de question de principe concernant la stratégie de validation de la technique NGS transcriptomique de Pathoquest au regard des éléments présentés.

Quel usage pour le contrôle des vracs non purifiés*.

*Remarque pour le test du vrac non purifié, l'ICH demande de tester les cellules et le milieu car des particules infectieuses peuvent être relarguées dans le milieu ou rester associées aux cellules en fonction des virus. L'analyse NGS transcriptomique des ARNs cellulaires, qui n'existait pas lors de sa rédaction, permet d'identifier tous les virus infectant les cellules de production. Le milieu de culture n'étant pas pertinent pour cette analyse, il ne sera pas testé par NGS.

Les techniques de contrôle *in vitro* des vracs non purifiés utilisés pour la production de protéines recombinantes sont substituables par une approche NGS transcriptomique dans le cadre de demandes d'autorisation d'essai cliniques. La révision de la guideline ICH Q5A (R2) indique « *Adventitious virus testing should be routinely applied to each unprocessed bulk. This may include in vitro screening assays using several cell lines or broad molecular virus detection methods such as NGS* ». En particulier, concernant la matrice utilisée, l'utilisation de cellules en lieu et place du mélange de milieu et cellules pour le contrôle NGS proposé est admise.

Conclusions

En ce qui concerne les contrôles effectués à l'aide de méthode de séquençage de nouvelle génération, les données suivantes doivent être fournies :

- Certificat d'analyse ;

- Description de la méthode utilisée : préparation de l'échantillon (approche viromique, transcriptomique), normes et matériel de référence, plate-forme de séquençage, qualité des lectures, base de données de référence utilisée, analyse bioinformatique et algorithmes ;
- Documentation concernant la gestion et l'assurance de la qualité ;
- Rapports d'analyse complets comprenant notamment le pourcentage d'identité, la valeur E, la couverture du séquençage, les scores et les gènes détectés. Une discussion des résultats justifiant la conclusion est attendue ;
- Rapports de validation (in extenso, y compris la sensibilité analytique dans une matrice comparable : il est concevable que la validation prenne en compte dans son protocole la nature lourde de la technique, ce qui renforce la nécessité d'une description correcte des étapes pour permettre l'évaluation ;
- Une discussion étayée, avec les données qui ont permis de conclure à l'absence de virus adventice.

L'ANSM pourra tenir compte de l'éclairage des discussions du CSP dans ses processus d'évaluation.