



HAL
open science

État des lieux et perspective des médicaments de thérapie innovante fabriqués à partir de cellules natural killer en oncohématologie

Élodie Proulx Kerjean

► **To cite this version:**

Élodie Proulx Kerjean. État des lieux et perspective des médicaments de thérapie innovante fabriqués à partir de cellules natural killer en oncohématologie. Sciences pharmaceutiques. 2022. dumas-03882143

HAL Id: dumas-03882143

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03882143v1>

Submitted on 2 Dec 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0
International License

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE

Soutenu le 15 / 11 / 2022

Par Mme PROULX KERJEAN Elodie
Né(e) le 18/05/1993

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 04 octobre 1988
tenant lieu de

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE

----oOo----

**ETAT DES LIEUX ET PERSPECTIVES DES MEDICAMENTS DE THERAPIE
INNOVANTES FABRIQUES A PARTIR DE CELLULES NATURAL KILLER
EN ONCOHEMATOLOGIE**

----oOo----

JURY :

Président : Madame le Professeur Florence SABATIER-MALATERRE

Membres : Monsieur le Professeur Christian CHABANNON

Monsieur le Professeur Pierre Antoine BONNET

Monsieur le Professeur Raynier DEVILLIER

Madame Sophie THEVENET

Madame Mélanie GAUTHIER

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, Mme Alexandrine BERTAUD, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, M. Philippe GARRIGUE, M. Guillaume HACHE, M. Thierry TERME
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID,
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Philippe CHARPIOT, M. Riad ELIAS
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Chloé SIMON
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE
Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC M. François DEVRED
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pierre REBOUILLON
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE ET BIOTHERAPIES
PHARMACO ECONOMIE, E-SANTE

M. Jérémy MAGALON
Mme Carole SIANI
Mme Muriel MASI

ENSEIGNANT CDI

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

A.H.U.

PHARMACOTECHNIE

Mme Mélanie VELIER

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE
Responsable : Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Mme Laurence CAMOIN-JAU
Mme Florence SABATIER-MALATERRE
Mme Nathalie BARDIN
M. Romaric LACROIX

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Edouard LAMY
Mme Alexandrine BERTAUD
Mme Claire CERINI
Mme Edwige TELLIER
M. Stéphane POITEVIN
Mme Sandra GHAYAD

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Aurélie LEROYER
Mme Sylvie COINTE

MICROBIOLOGIE

Mme Anne DAVIN-REGLI
Mme Véronique ROUX
M. Fadi BITTAR
Mme Isabelle PAGNIER
Mme Sophie EDOUARD
M. Seydina Mouhamadou DIENE

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Carole DI GIORGIO
M. Aurélien DUMETRE
Mme Magali CASANOVA
Mme Anita COHEN

BIOLOGIE CELLULAIRE
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

Mme Anne-Catherine LOUHMEAU
Mme Alexandra WALTON

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Amandine BONIFAY

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

PRATIQUE OFFICINALE

Mme Emmanuelle TONNEAU-PFUG

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Catherine BADENS

CHIMIE PHYSIQUE - PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. David BERGE-LEFRANC

CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE

M. Pascal RATHELOT
M. Maxime CROZET

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE

M. Patrice VANELLE
M. Thierry TERME

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne FAVEL
M. Quentin ALBERT

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Catherine DEFOORT
M. Alain NICOLAY
Mme Estelle WOLFF
Mme Elise LOMBARD
Mme Camille DESGROUAS
M. Charles DESMARCHELIER
M. Mathieu CERINO

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Duje BURIC
M. Pascal PRINDERRE

CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE MINERALE ET
STRUCTURALE

Mme Sandrine ALIBERT
Mme Caroline DUCROS
M. Marc MONTANA
Mme Manon ROCHE
Mme Fanny MATHIAS

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE
HYDROLOGIE

M. Armand GELLIS
M. Christophe CURTI
Mme Julie BROGGI
M. Nicolas PRIMAS
M. Cédric SPITZ
M. Sébastien REDON

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE

Mme Valérie MAHIOU-LEDDER
Mme Sok Siya BUN
Mme Béatrice BAGHDIKIAN
M. Elnur GARAYEV

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET
NUISANCES TECHNOLOGIQUES

M. Cyril PUJOL

DROIT ET ETHIQUE

Mme Laurie PAHUS

GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE
ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET
COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET
GESTION DE LA PHARMAFAC

Mme Félicia FERRERA

DISPOSITIFS MEDICAUX

Mme Valerie MINETTI-GUIDONI

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Bruno LACARELLE M. Joseph CICCOLINI
TOXICOLOGIE GENERALE	Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD Mme Marie-Anne ESTEVE
PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA Mme Anne RODALLEC M. Nicolas FABRESSE
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Pierre-Henri VILLARD

A.H.U.

PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE	Mme Anaïs MOYON M. Vincent NAIL
-----------------------------	------------------------------------

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire
Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint
M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire
M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie
Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché
M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier
M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 13 décembre 2021



LE DOYEN
F. DIGNAT-GEORGE

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont soutenu et encouragé avec bienveillance tout au long de mon parcours.

A Madame le Professeur Florence Sabatier –Malaterre

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury et d'évaluer mon travail

Merci pour votre bienveillance pendant mes études de Pharmacie

Trouvez ici toute ma gratitude

A Monsieur le Professeur Christian Chabannon

Pour avoir accepté de diriger cette thèse et de l'évaluer aujourd'hui,

Merci de m'avoir accueilli au sein du CTC et accompagnée pendant ces quatre années d'internat,

Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Pierre Antoine Bonnet

Pour avoir accepté de participer à cette soutenance de thèse et d'évaluer mon travail

Merci de vous être rendu disponible,

Veillez trouver ici mes sincères remerciements

A Monsieur Le Professeur Raynier Devillier

Pour avoir accepté de siéger dans ce jury et d'évaluer ce travail,

Merci de vous être rendu disponible,

Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

A Madame Sophie Thévenet

Pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse et à l'évaluation de mon travail,

Merci pour tes conseils bienveillants et ta bonne humeur,

Reçois ici mes sincères remerciements et toute mon amitié.

A Madame Mélanie Gauthier

Pour avoir accepté de participer à ce jury et de juger ce travail de thèse,

Merci de vous être rendue disponible,

Veillez trouver ici mes sincères remerciements

A l'équipe du CTC,

Merci pour tout ! J'ai beaucoup appris à vos côtés pendant ces quatre années tant sur le plan professionnel que sur le plan humain.

Merci à Claude et à Boris pour leurs conseils, leur accompagnement et leur bienveillance.

Merci tout particulièrement à Bechara qui m'a tout appris ! Merci pour ton énergie, ta bonne humeur, ton soutien, ta bienveillance et ta patience !

Merci également à Aurélie et Didier pour m'avoir supporté dans votre bureau pendant tout ce temps et pour m'avoir initiée aux sketches de rire et chansons

A Brian, mon mari, mon âme sœur,

Merci d'être à mes côtés au quotidien et pour ton soutien sans failles pendant toutes ces années.

Sans toi rien n'aurait été possible. Tu remplies ma vie de bonheur !

A ma fille, ma petite Maya,

Mon petit rayon de soleil et ma plus grande fierté ! Je te dédie cette thèse

Merci d'être arrivée dans ma vie ! Mon amour pour toi est infini

A ma famille et à mes amis d'ici et d'ailleurs,

Merci pour votre soutien, votre bienveillance et d'avoir cru en moi depuis toujours !

Vous êtes les meilleurs !!

« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »

TABLE DES MATIERES

Introduction générale	1
<u>PARTIE I : LES CELLULES NK</u>	3
I. Introduction	4
II. Classification, développement, phénotype et caractérisation des cellules NK	5
1) Classification	5
2) Développement	6
3) Phénotype et Caractérisation	8
III. Récepteurs membranaires activateurs et inhibiteurs	10
1) Récepteurs NCR (Natural Cytotoxicity Receptors)	12
2) Récepteurs de la superfamille des lectines de type C	13
3) Récepteurs KIR	14
4) Récepteurs LILR (Leucocyte Ig like Receptors)	16
5) Récepteurs de la famille NECL (Nectin and Nectin like)	16
6) CD16.....	17
7) Les molécules de co-stimulation	17
IV. Principales fonctions effectrices	19
1) Activité Cytotoxique	19
2) Propriétés immunomodulatrices et surveillance des tumeurs	21
<u>PARTIE II : APPLICATIONS POSSIBLES POUR LES CELLULES NK : ESSAIS CLINIQUES, PRINCIPAUX ACTEURS ET PERSPECTIVES</u>	23
I. Intérêt de l'utilisation des cellules NK en oncohématologie	24
II. Transfert adoptif de cellules NK	25
1) Cellules NK Autologues	25
2) Cellules NK Allogéniques	26
a. Essais cliniques évaluant les cellules NK stimulées	28
3) Cellules NK issues de lignées	33
4) Cellules NK modifiées génétiquement	33
a) CAR NK	34
b) Essais cliniques évaluant les CAR-NK et principaux acteurs	41
III. Autres stratégies et perspectives	47

PARTIE III : REGLEMENTATION APPLICABLE, FABRICATION DES CELLULES NK ET PRINCIPAUX ENJEUX 50

I. Définitions et classification des produits cellulaires et réglementation 52

 1) Définitions et classification 52

 2) Cadre réglementaire 56

II. Fabrication des cellules NK et principaux enjeux 60

 1) Principaux paramètres impactant la fabrication des cellules NK 60

 a) Sources de cellules NK 60

 b) Stratégies d'expansion 65

 c) Conditions de culture 68

 d) Ingénierie cellulaire 70

 e) Critères de libération 71

 2) Principaux enjeux 72

PARTIE IV : TRAVAIL EXPERIMENTAL 73

Introduction 74

I. Matériel et méthodes 75

 1) Matière première 75

 2) Purification et expansion des cellules NK 75

 3) Contrôles qualité 78

II. Résultats/Discussion 80

 1) Optimisations réalisées 80

 2) Résultats obtenus pour la déplétion CD3+/- sélection CD56+ et l'expansion
 des cellules NK 84

Conclusion 96

Conclusion Générale 98

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

SERMENT DE GALIEN

LISTE DES ABBREVIATIONS

AAV: Adeno Associated Virus

ADCC: Antibody Dependant Cell-mediated Cytotoxicity

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANSM : Agence Nationale du Médicament et des Produits de Santé

ATMP : Advanced Therapy Medicinal Product

BCMA: Antigène de maturation des lymphocytes B

BCR : B cell receptor

BiKEs: Bispecific Killer Engager

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

BPL : Bonnes Pratiques de Laboratoire

CAR: Chimeric Antigen Receptor

CAT: Comittee of Advanced Therapies

cATMP : Médicament combiné de Thérapie Innovante

CB : Cord Blood

CHU : Centre Hospitalo Universitaire

CIK : Cytokine Induce Killer

CLCC : Centre de Lutte Contre le Cancer

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMN : Cellules Mononuclées

CN : Cellules Nourricières

CNT : Cellules Nuclées Totales

CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes

CQ : Contrôle Qualité

CRCM : Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille

CRTAM : class I-restricted T cell-associated molecule

CSE : Cellules Souches Embryonnaires

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CSSC : Cellules Souches de Sang de Cordon

CSP : Code de Santé Publique

CSSP : Cellules Souches du Sang Périphérique

CTC : Centre de Thérapie Cellulaire

DC : Cellules Dendritiques (Dendritic Cells)

DLI : Donor Lymphocyte Infusion

DNAM : DNAX Accessory Molecule

EBV: Epstein - Barr virus

EFS: Etablissement Français du Sang

EMA: European Medicine Agency

EV: Extracellular Vesicle

FDA: Food and Drug Administration

FITC: Fluorescein Isothiocyanate

G-CSF : Granulocyte Colony Stimulating Factor

GCSH : Greffe de Cellules Souches Hématopoïétique

GMCSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

GMP : Good Manufacturing Practices
GTMP: Médicament de Thérapie Génique
GVHD : Graft Versus Host Disease
GVL : Graft Versus Leukemia
GVT : Graft Versus Tumor
HLA : Human Leukocyte Antigen
HM : Hémopathies Malignes
ICAD : Inhibitor of Caspase-Activated Deoxyribonuclease
IFN : Interferon
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
ILC : Innate Lymphoid Cells
ILT : Immunoglobulin Like Transcript
IPC : Institut Paoli-Calmettes
IPSC : Induced Pluripotent Stem Cells
ITAM: Immunoreceptor Tyrosin based Activating Motive
ITIM: Immunoreceptor Tyrosin based Inhibitory Motive
KIR: Killer cell Immunoglobulin-like Receptor
LAK: Lymphokine Activated Killer
LAL: Leucémie Aiguë Lymphoïde
LAM: Leucémie Aiguë Myéloïde
LB : Lymphocytes B
LBDGC : Lymphome B diffus à Grandes Cellules

LIR : Leucocyte Immunoglobulin Like Receptor
LILR : Leucocyte Immunoglobulin Like Receptors
LILRA :Leucocyte Immunoglobulin Like Receptors Activator
LILRI : Leucocyte Immunoglobulin Like Receptors Inhibitor
LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique
LMC : Leucémie Myéloïde Chronique
LMPP : Progéniteur multipotent lymphoïde
LNH : Lymphome Non-Hodgkinien
LT : Lymphocytes T
LTi : Lymphoïd Tissue Inducer
LV : Lentivirus
mAbs : Monoclonal Antibodies
MCTC : Médicament Combinés de Thérapie Cellulaire
MIC: Major histocompatibility Complex class I related Chain
MIT: Médicaments issus de l'Ingénierie cellulaire ou Tissulaire
MM : Myélome Multiple
MO : Moelle Osseuse
MTCS : Médicaments de Thérapie Cellulaire Somatiques
MTG : Médicaments de Thérapie Génique
MTI : Médicament de Thérapie Innovante
MTI-PP : Médicament de Thérapie Innovante Préparés Ponctuellement

NAM : Nicotinamide
NCAM: Neural Cell Adhesion Molecule
NCR: Natural Cytotoxicity Receptor
NECL: Nectin and Nectin Like
NK: Natural Killer
NKCE: Naturel Killer Cell Engager
NKG2D: Natural Killer Group 2D
OGM: Organisme Génétiquement modifié
ORR : Odds Ratio
PBMNC: Peripheral Blood Mononuclear Cells
PE : Phycoerythrin
PLC : Progéniteur Lymphoïde Commun
POC : Point Of Care
PTC : Produits de Thérapie Cellulaire
PVR : Polio Virus Receptor
RC : Rémission Complète
R&D: Recherche et Développement
RMC : Récepteur de mort cellulaire
RP : Rémission Partielle
RPMI: Rosewell Park Memorial Institute
RV : Rétrovirus
SCGM : Stem Cell Growth Medium
SCTMP : Médicament de Thérapie cellulaire Somatique
SLAM : Signaling Lymphocytic Activation Molecule

SMD : Syndrome Myélo Dysplasique
SOHO : Substances Of Human Origin
SP: Sang Placentaire
SRC : Syndrome de Relargage Cytokinique
SVF : Sérum de Veau Fœtal
TAA : Tumor Associated Antigen
TCR: T cell Receptor
TEP: Médicament issu de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire
TIGIT: T cell immunoreceptor with immunoglobulin and ITIM domain
TNF: Tumor Necrosis Factor
TRAIL: TNF Related Apoptosis Inducing Ligand
Tregs : Lymphocytes T régulateurs
TriKEs : Trispecific Killer Engager
TRUCK: T cells Redirected for Universal Cytokine Killing
ULBP : UL16 Binding Protein
USP : Unité de Sang Placentaire
UTC: Unité de Thérapie Cellulaire

TABLE DES FIGURES

- **Figure 1** : Fonctions immunes des Innate Lymphoid Cells (ILC) tirée de Vivier et al 2018
- **Figure 2** : Principales différences entre modèle linéaire et ramifié du développement des cellules NK tirée de la publication de Cichocki et al 2019
- **Figure 3** : Les Natural Cytotoxicity Receptors (NCR)
- **Figure 4** : Le Récepteur NKG2D
- **Figure 5** : Les Récepteurs CD94/NKG2
- **Figure 6** : Les Récepteurs KIR activateurs et KIR inhibiteurs
- **Figure 7** : Schéma récapitulatif des récepteurs activateurs et inhibiteurs des cellules NK
- **Figure 8** : Cascade de signalisation de l'apoptose médiée par le granzyme B
- **Figure 9** : Principales fonctions effectrices des cellules NK – tirée de Crinier et al 2020
- **Figure 10** : Construction d'un Chimeric Antigen Receptor (CAR)
- **Figure 11** : Les quatre générations de structures CAR
- **Figure 12** : Différentes sources possibles pour la fabrication des CAR-NK Xie et al 2020
- **Figure 13** : Différentes générations de structures CAR spécifiques aux cellules NK – Tiré de Rezvani et al 2021
- **Figure 14** : Carte du monde des essais cliniques portant sur des CAR-NK
- **Figure 15** : Approches thérapeutiques utilisées afin de restaurer l'activité lytique des cellules NK envers les cellules cancéreuses – tirée de Chiossone L et al 2018
- **Figure 16** : Construction et mécanisme d'action des BiKEs et des TriKEs tiré de Felices et al 2016
- **Figure 17** : Méthodes de transduction virales ou non virales des cellules NK – tirée de Heipertz et al 2021
- **Figure 18** : Le CliniMACS Prodigy ®
- **Figure 19a** : Concentrations en cellules NK (M/ml) selon le type de sérum utilisé (Test n°2)
- **Figure 19b** : Concentrations en cellules NK (M/ml) selon le type de sérum utilisé (Test n°2)
- **Figure 20a** : Pourcentage d'apoptose des cellules cibles selon le type de sérum utilisé (Test n°2) au ratio 1 :1
- **Figure 20b** : Pourcentage d'apoptose des cellules cibles selon le type de sérum utilisé (Test n°2) au ratio 0.5 :1
- **Figure 21** : Cytotoxicité (%) des cellules NK selon le ratio E:T utilisé et Taux d'expansion des cellules NK pour le test n°3

- **Figure 22** : Cytotoxicité (%) des cellules NK selon le ratio E:T utilisé et Taux d'expansion des cellules NK pour le test n°4
- **Figure 23** : Cytotoxicité (%) des cellules NK selon le ratio E:T utilisé et taux d'expansion des cellules NK pour le test n°5
- **Figure 24** : Taux d'expansion obtenu avec le CliniMACS Prodigy® versus les cultures dans des plaques 6 puits pour le test n°5
- **Figure 25** : Cytotoxicité (%) des cellules NK selon le ratio E:T utilisé et taux d'expansion des cellules NK pour le test n°7
- **Figure 26** : Comparaison du rendement cellulaire et de la pureté avec la technique manuelle durant l'essai clinique sur le CliniMACS Plus® vs avec la technique automatisée sur le CliniMACS Prodigy®
- **Figure 27** : Taux d'expansion obtenus pour les 3 tests concluants

LISTE DES TABLES

- **Tableau 1** : Principales différences entre les cellules NK CD56bright et CD56dim
- **Tableau 2** : Principaux essais cliniques portant sur les cellules NK allogéniques en oncohématologies regroupées selon la technique de stimulation utilisée
- **Tableau 3** : Tableau comparatif des différences entre CAR-NK et CAR-T cells
- **Tableau 4** : Essais cliniques classés par statut évaluant les CAR-NK en oncohématologie
- **Tableau 5** : Les 4 catégories de MTI et définitions– d’après le règlement européen 1394/2007/CE et la directive Européenne 2009/120/CE – Adapté de Boucher et Cras 2018
- **Tableau 6** : Principales différences entre MTI/ MTI-PP et PTC
- **Tableau 7** : Principaux avantages et inconvénients des différentes sources de cellules NK et procédés d’ingénierie cellulaire réalisables
- **Tableau 8** : Composants utilisés lors des deux séries de tests
- **Tableau 9** : Principales différences entre l’ancien protocole utilisé lors de l’essai de phase I et le nouveau protocole optimisé automatisé
- **Tableau 10** : Tableau des différents tests réalisés
- **Tableau 11** : Tableau des résultats bruts obtenus pour le test n°3
- **Tableau 12** : Tableau des résultats bruts obtenus pour le test n°4
- **Tableau 13** : Tableau des résultats bruts obtenus pour le test n°5
- **Tableau 14** : Tableau des résultats bruts obtenus pour le test n°7

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

L'utilisation de cellules effectrices de l'immunité dans la prise en charge des pathologies cancéreuses a permis d'élargir les possibilités de traitement pour les patients. Parmi elles, les cellules Natural Killer (NK), cellules effectrices de l'immunité innée, constituent une plateforme cellulaire très attractive de par leurs propriétés singulières à savoir leur cytotoxicité innée à l'égard des cellules transformées ou infectées mais également leur capacité d'immunomodulation entre autres. Différentes approches très prometteuses mettant à profit ces propriétés sont actuellement étudiées et de nombreuses études cliniques sont actuellement en cours.

Plusieurs enjeux de taille sont cependant à prendre en compte notamment la complexité des exigences réglementaires applicables à ce type de thérapeutiques (statut de médicament donc production dans le respect des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF)) et également des enjeux propres aux cellules elles même (entre autres une demi-vie réduite, fragilité cellulaire, étapes d'expansion nécessaires car nombre limité de cellules disponibles etc). Dans ce contexte, il apparaît essentiel de poursuivre l'optimisation des processus de production.

L'objet de ce travail de thèse consiste à faire un état des lieux des médicaments de thérapies innovantes produits à partir de cellules NK en cours d'évaluation et les perspectives possibles pour ces thérapeutiques. Etant donné la multitude d'applications possibles, seules les applications en oncohématologie seront abordées.

Dans une première partie, nous ferons un rappel des caractéristiques propres aux cellules NK, leur biologie, leur développement et leurs principales propriétés.

La seconde partie dressera un état des lieux des différentes thérapeutiques développées à partir de cellules NK actuellement en cours d'évaluation clinique ainsi que les perspectives à venir.

La troisième partie abordera les principaux enjeux relatifs au développement de thérapies innovantes (réglementation applicable/ enjeux liés au manufacturing).

Enfin, la quatrième et dernière partie, présentera les résultats préliminaires d'un travail expérimental mené au sein du Centre de Thérapie Cellulaire (CTC) de l'Institut Paoli Calmettes (IPC) dans le cadre de la validation d'un processus d'activation et d'expansion de cellules NK.

PARTIE I :

LES CELLULES NK

PARTIE I : LES CELLULES NK

Cette première partie portera sur les cellules Natural Killer (NK). Plusieurs points seront abordés dans les sous parties avec dans un premier temps quelques généralités sur cette population cellulaire, puis les modalités de leur développement et caractéristiques phénotypiques. Puis seront détaillés les différents types de récepteurs et voies de signalisation spécifiques à ces cellules. Enfin nous terminerons avec leurs principales fonctions effectrices des cellules NK à savoir leur activité cytotoxique naturelle et leurs propriétés immunomodulatrices.

I. Introduction

C'est dans les années 1960 lors d'études portant sur la cytotoxicité médiée par les lymphocytes T (LT) qu'une population de cellules lymphoïdes cytotoxiques possédant des propriétés anti-tumorales naturelles a été observée pour la première fois. [1] Ce n'est que plusieurs années plus tard que cette population cellulaire fut étudiée plus en détails, population connue aujourd'hui sous le nom de cellules NK [2–6]. Comme leur nom l'indique, ce sont des cellules « naturellement cytotoxiques » qui sont capables d'exercer une activité anti-tumorale et anti-infectieuse sans activation préalable. Il fut possible de les distinguer des autres populations lymphocytaires de par leur caractère non T et non B (absence d'expression des CD3/T Cell Receptor (TCR) et des CD19/ B Cell Receptor (BCR)) et leur incapacité à effectuer des réarrangements de gènes codant pour leurs récepteurs antigéniques. [7]

Pendant longtemps le consensus était de dire que la distribution tissulaire des cellules NK se limitait à la moelle osseuse (MO) et au sang périphérique. Plus récemment, de nouvelles études ont montré qu'elles sont également retrouvées au niveau des organes lymphoïdes secondaires, et non lymphoïdes tels que le foie, l'utérus, les poumons, la peau ou encore les intestins. [8]

Les cellules NK représentent 5 à 15 % des Cellules Mononuclées (CMN) du sang périphérique. Ce sont des cellules effectrices de l'immunité innée qui constituent l'un des acteurs de première ligne face aux pathogènes et face à la genèse de processus tumoraux. Elles sont capables de migrer au niveau des sites inflammatoires et jouent un rôle important lors de certaines infections virales. D'autre part, ces cellules sont impliquées dans l'immuno-surveillance des tumeurs et la prévention de leur dissémination métastatique. [9] [10]

Ce sont par définition des cellules effectrices de l'immunité innée mais en réalité, elles participent à la régulation de l'immunité adaptative en interagissant de façon étroite avec plusieurs types cellulaires impliqués dans la réponse adaptative.

Lorsqu'elles sont activées, elles libèrent de nombreux facteurs cytokiniques ainsi que des chemokines qui modulent la réponse inflammatoire et qui induisent l'activation des monocytes et des polynucléaires entre autres. [9] D'autre part, elles renforcent la réponse adaptative des LT. Depuis plusieurs années maintenant, les mécanismes inhérents à l'activité des cellules NK ont bien été identifiés et caractérisés d'un point de vue moléculaire. Les cellules NK disposent d'une machinerie sophistiquée avec un panel de récepteurs activateurs et inhibiteurs à leur surface qui régule leur activité. Elles sont capables de distinguer les cellules saines des cellules infectées par des virus ou tumorales grâce au principe du « soi manquant ». [11] En effet, il est fréquent que les cellules infectées ou cancéreuses présentent de nombreuses mutations et perdent l'expression de la molécule du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type I (CMH I). [12]

A leur contact va se produire une levée d'inhibition puis une activation des cellules NK qui vont pouvoir exercer leur activité cytotoxique et éliminer les cellules cibles.

Par ailleurs, les cellules NK sont étroitement impliquées dans la lutte contre les processus infectieux notamment viraux, l'auto-immunité, la prise de greffe dans le contexte de greffe de Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH), dans la transplantation d'organes et également en gynécologie dans le contexte de la grossesse. [13]

II. Classification, développement, phénotype et caractérisation des cellules NK

Les cellules NK représentent 5 à 15% des CMN du sang périphérique. [14] Le diamètre cellulaire des cellules NK est plus important que celui des LT ou Lymphocytes B (LB) avec un cytoplasme plus granuleux du fait de la présence de granules lytiques (perforines et granzymes). [15,16]

1) Classification

Les cellules NK appartiennent au compartiment lymphoïde inné ou Innate Lymphoid Cells (ILC) tout comme plusieurs autres sous-populations cellulaires. Elles n'expriment pas de récepteur spécifique d'antigènes issus de la recombinaison génique, qui est une particularité propre aux cellules du système adaptatif (LT, LB etc).

Les ILC ont été divisées en 3 groupes sur la base de critères fonctionnels [9,17,18] (résumé dans la figure 1 tirée de la publication de Vivier et al 2018) [17] :

- Le **groupe 1** regroupe les cellules NK ainsi que les ILC-1 qui produisent également des cytokines de type Th1 (IFN- γ)
- Le **groupe 2** est constitué des ILC-2 capables d'excréter plusieurs cytokines de type Th2 (IL-4 ; IL-5 ; IL-9 et IL-13)
- Le **groupe 3** est constitué des ILC-3 et des Lymphoid Tissue Inducer (LTI) qui excrètent différents médiateurs dont des cytokines de type Th17/Th22 (IL-17 et IL-22)

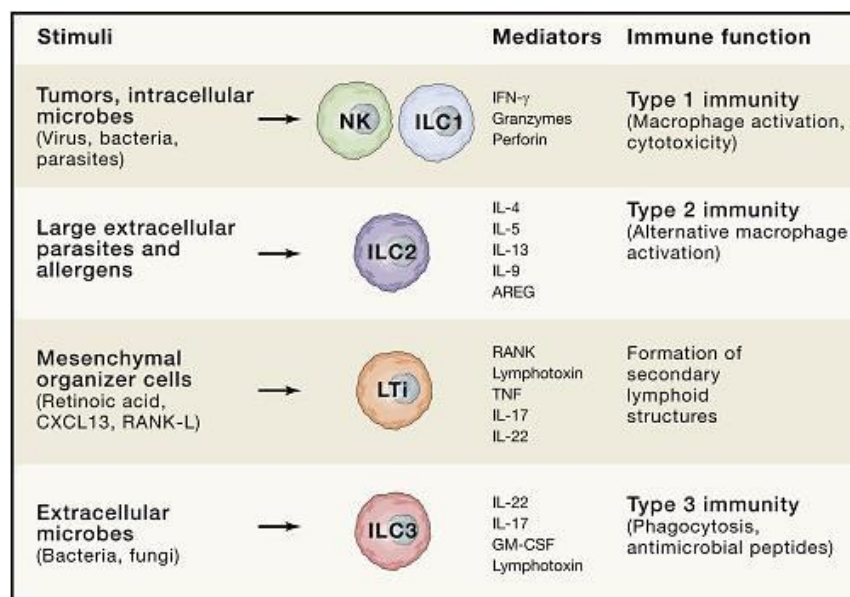


Figure 1: Fonctions immunes des Innate Lymphoid Cells (ILC) – tirée de Vivier et al 2018 [17]

2) Développement

Les cellules NK sont présentes chez l'homme dans la MO, dans le sang périphérique ainsi que dans les tissus lymphoïdes. On les retrouve également dans de nombreux tissus non-lymphoïdes comme le foie, les poumons, la peau, l'utérus (lors de la grossesse) ou encore les intestins. [19] A noter que ces localisations ainsi que les étapes de développement diffèrent chez la souris. [20]

Chez l'adulte, les cellules de la lignée lymphoïde débutent leur développement dans la MO et sont perpétuellement renouvelées à partir de ce tissu. [21] De même que les lymphocytes, les cellules NK se développent à partir d'un progéniteur hématopoïétique multipotent CD34+ qui se différencie dans un premier temps en progéniteur multipotent lymphoïde (LMPP) et ensuite en Progéniteur Lymphoïde Commun (PLC). [22]

A noter que l'ensemble des cellules appartenant aux ILC dérivent du PLC. [23]

Tandis que les LB et LT poursuivent leur éducation au sein du thymus, les cellules NK quant à elles poursuivent leur différenciation dans la MO. Le PLC s'engage de manière définitive dans la lignée NK à partir du moment où il exprime le CD122 (IL-2R β). [22] L'expression du marqueur CD56 marque quant à lui la transition du stade NK dit « immature » au stade NK « mature ». [22] De récentes études suggèrent que probablement plusieurs étapes de développement se déroulent en dehors de la MO au niveau des organes lymphoïdes secondaires tels que les amygdales, la rate ou encore les nœuds lymphatiques. [24,25]

Les cellules NK persistent dans le sang périphérique même lorsque la différenciation à partir du PLC est altérée et suggère qu'il existe un phénomène d'équilibre en périphérie. [26–28] Le turnover des cellules NK est d'environ 2 semaines dans le sang périphérique. [29]

Les étapes de développement des cellules NK chez l'homme ne sont pas encore élucidées en totalité. Le modèle linéaire regroupant 6 stades de développement fait aujourd'hui consensus, basé sur l'acquisition séquentielle des marqueurs CD34, CD117 (c-kit receptor), CD94 et CD16(Fc γ RIII) /CD56 et de compétences fonctionnelles.[25,30,31]

Plusieurs publications font par ailleurs mention d'un modèle de développement des cellules NK alternatif plus ramifié avec des populations de précurseurs se différenciant en plusieurs sous-types de cellules NK matures. [21,25] Ce modèle intègre de nouveaux marqueurs tels que NKp80 et CD57 à considérer pour une meilleure définition des stades de développement. 6 différents stades de développement sont décrits, chaque stade se différenciant les uns des autres via l'expression d'un panel de marqueurs de surface spécifiques à chacun. [22,30] Dans la figure 2, les lignes avec un trait plein représentent les relations entre les stades de différenciation et de maturation appuyés par des publications scientifiques. Quelques incertitudes demeurent vis à vis des relations entre plusieurs stades de développement (lignes en pointillés) soulignant la nécessité d'investigations plus poussées. [21]

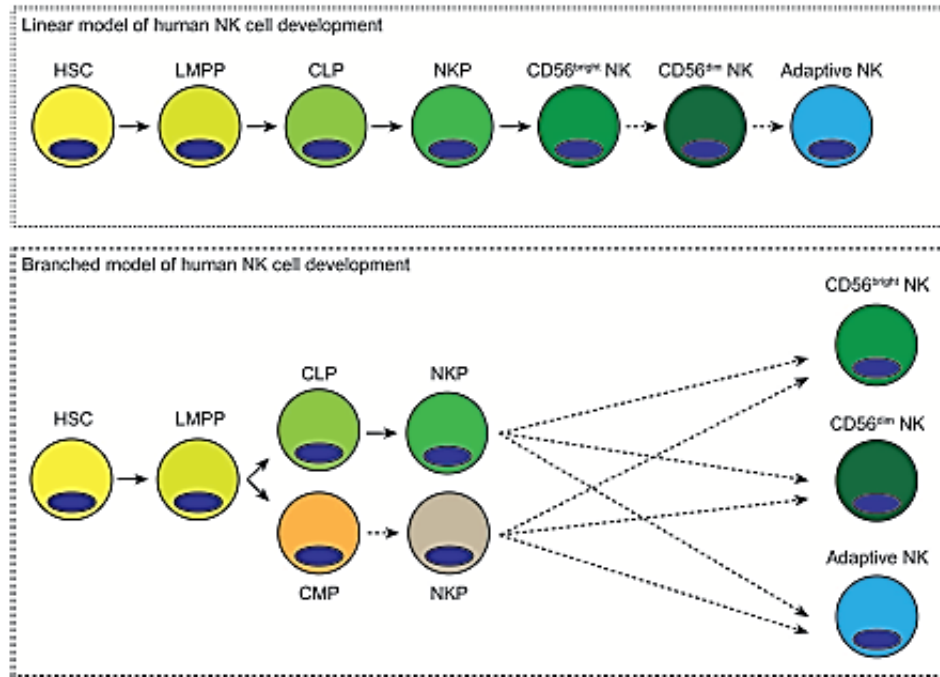


Figure 2 : Principales différences entre le modèle linéaire et ramifié du développement des cellules NK tirée de la publication de Cichocki et al 2019 [32]

3) Phénotype et caractérisation

D'un point de vue phénotypique, les cellules NK sont identifiables en routine par l'expression de l'antigène CD56 (de la famille des Neural Cell Adhesion Molecules (NCAM)), de CD16 (récepteur FcγRIIIA de faible affinité pour le fragment Fc des immunoglobulines qui joue un rôle majeur dans le mécanisme de cytotoxicité dépendante des anticorps médiée par les cellules (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity = ADCC), des récepteurs KIR (Killer Immunoglobulin-like Receptors), de l'hétérodimère CD94/NKG2 ainsi que du NKG2D. [33]

Deux populations de cellules NK coexistent et peuvent être différenciées par leur niveau d'expression du marqueur CD56. Ce marqueur est une glycoprotéine qui est spécifique aux cellules NK qui peut être soit « Bright » pour fortement exprimé soit « dim » pour une expression absente ou presque nulle. [14,22]

- Les **cellules NK CD56^{bright}** (cf tableau 1) sont retrouvées majoritairement dans les organes lymphoïdes et représentent environ **5-10%** du pool de cellules NK. [14] Elles expriment fortement le CD94 et le CD62L également appelé L-sélectine. Par ailleurs, elles n'expriment pas ou très peu le CD16 (FcγRIIIA) et les récepteurs KIR. De plus, elles expriment de façon constitutionnelle des récepteurs d'affinité intermédiaire et de haute affinité à l'IL-2 et de ce fait peuvent proliférer plus facilement in-vivo et in-vitro en réponse à des doses faibles d'IL-2. [34,35] Les cellules NK CD56^{bright} ont une activité cytotoxique limitée qui s'explique en partie par la faible quantité de perforines et de granzymes présentes au sein de leur cytoplasme. [36]

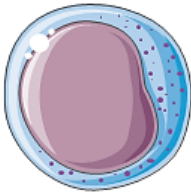
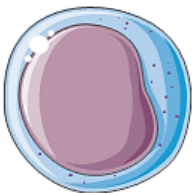
Par ailleurs, elles peuvent libérer plus tardivement des cytokines de façon importante comme l'Interféron Gamma (IFN- γ), en réponse aux cytokines libérées par les monocytes (IL-2, IL-12, IL-15) [37] ainsi que d'autres cytokines telles que le Tumor Necrosis Factor α (TNF- α), TNF β et le Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF).[38] Elles expriment le CD27 à leur surface qui traduit leur immaturité. [39]

Après activation par l'IL-2 ou IL-12, les cellules NK CD56^{bright} vont pouvoir exercer une cytotoxicité similaire aux cellules NK CD56^{dim}. [36,40]

- Les **cellules NK CD56^{dim}**, (cf tableau 1) représentent le phénotype dominant soit plus de **90%** des cellules NK et sont majoritairement retrouvées dans le sang périphérique. [14] A la différence des cellules CD56^{bright}, elles expriment fortement le CD16 (FcγRIIIA), les récepteurs KIR et beaucoup moins le CD62L et le CD94. Par ailleurs, elles expriment le marqueur de maturité CD57 et des récepteurs d'affinité intermédiaire à l'IL-2 leur permettant de proliférer in vitro de façon limitée même en présence de hautes doses d'IL-2. [34,35,39] Lanier et al ont montré en 1986, que les cellules NK CD56^{dim} ont la plus forte cytotoxicité [41] ce qui s'explique par une forte concentration en perforines et granzymes, et vont pouvoir ainsi éliminer les cellules avec des molécules de CMH-I altérées ou absentes. Le phénomène d'ADCC est caractéristique de cette sous-population de NK.

A la différence des cellules NK CD56^{bright}, elles libèrent des cytokines plutôt en réponse à une interaction directe avec une cellule cible et induisent une réponse inflammatoire adaptée. [42]

Le tableau 1 résume les différences entre les deux populations.

Tableau 1: Principales différences entre NK CD56 ^{dim} et NK CD56 ^{bright}		
	NK CD56 ^{dim}	NK CD56 ^{bright}
		
RATIO	90-95 %	5-10%
LOCALISATION	Sang périphérique	Organes lymphoïdes
CD16	+++	Dim/-
AUTRES MARQUEURS DE SURFACE	CD62 ↓ et CD94 ↓ KIR ↑ CD57	CD62L ↑ et CD94 ↑ KIR ↓ CD27
CYTOTOXICITE	+++++++ Contact cellule à cellule (ADCC)	++ Tardive en réponse à des signaux cytokiniques
FACTEURS SOLUBLES SECRETES	Perforine / Granzyme B	IFN-γ, TNFα, TNFβ, IL-10 GMCSF

A noter qu'il existe plusieurs théories sur les relations existant entre ces deux sous-types. Plusieurs études évoquent la possibilité que les cellules NK CD56^{bright} soient les précurseurs directs des cellules NK CD56^{dim} [43], d'autres penchent plutôt pour des voies de développement et des précurseurs distincts pour les deux sous-types avec un rôle majeur de l'environnement cytokinique. [44]

III. Les récepteurs membranaires activateurs et inhibiteurs

Les cellules NK expriment un large panel de récepteurs à leur surface. A la différence des LT et LB dont les récepteurs membranaires spécifiques résultent d'une recombinaison génétique, les cellules NK expriment des récepteurs de manière constitutionnelle, [12] récepteurs qui régulent à la fois leur développement et leurs fonctions effectrices.

Ces récepteurs vont transmettre des signaux soit activateurs soit inhibiteurs ; c'est la résultante de l'ensemble des signaux produits par les récepteurs qui va déterminer la façon dont les cellules NK vont interagir avec leur cible. [45,46]

Récepteurs activateurs et molécules de co-stimulation :

Les récepteurs activateurs jouent un rôle clé dans la régulation des fonctions effectrices des cellules NK. Ils transmettent des signaux via différentes voies de signalisation qui peuvent même parfois agir en synergie [47].

C'est seulement lorsque plusieurs récepteurs activateurs sont engagés simultanément et que le signal résultant dépasse le seuil nécessaire à l'activation des cellules NK, que les cellules NK peuvent exercer une activité cytotoxique, soit directe, soit via la sécrétion de cytokines.[48]

Ce mécanisme permet de prévenir l'activation non maîtrisée des cellules NK en réponse à des stimuli environnementaux. Les récepteurs activateurs reconnaissent les ligands de stress exprimés par les cellules infectées ou transformées.

Il existe plusieurs catégories de récepteurs :

Récepteurs activateurs

- Les **Natural Cytotoxicity Receptors (NCR)** : NKp30, NKp44, NKp46
- **Les Récepteurs de la superfamille des Lectines de Type C**
 - NKG2D
 - CD94/NKG2-C, -E, -F
- **Les Récepteurs KIR (Killer cell Immunoglobuline Like receptors) activateurs**
- DNAM-1
- CD16
- Molécules de co-stimulation (2B4, CD137, CD27, OX40 ...)

Récepteurs inhibiteurs:

Les récepteurs inhibiteurs ont pour rôle de contrebalancer les signaux activateurs transmis par les récepteurs activateurs. Ces récepteurs garantissent que les cellules saines soient épargnées par les cellules NK. Il existe 3 grandes catégories de récepteurs inhibiteurs :

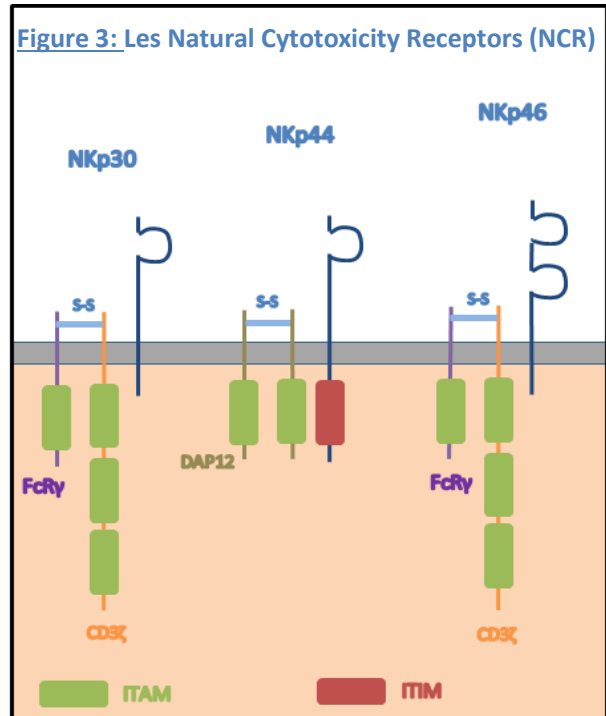
- Les récepteurs **KIR (Killer cell Immunoglobuline Like Receptors) inhibiteurs**
- Les récepteurs **LIR (Leucocyte Immunoglobulin-like Receptors) et ILT (Immunoglobulin Like Transcript)**
- Les complexes **CD94/NKG2-A et -B** appartenant à la superfamille des Lectines type C

Principales catégories de récepteurs :

1) Les Natural Cytotoxicity Receptors (NCR)

Les **Natural Cytotoxicity Receptors (NCR)** sont des récepteurs activateurs exprimés majoritairement par les cellules NK mais également par d'autres types cellulaires tels que les ILC1, ILC3 et LT $\gamma\delta$ [49].

Ce sont des protéines transmembranaires appartenant à la superfamille des Immunoglobulines. Leur domaine extracellulaire se compose d'un ou deux domaines Immunoglobuline-like leur permettant de se lier à leurs ligands. Leur domaine intracytoplasmique présente quant à lui plusieurs motifs activateurs appelés Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (ITAMs) [50] présentés pour certains par les protéines adaptatrices CD3 ζ et FcR γ . (Figure 3) Trois sous types ont été décrits :



NKp30 (ou NCR3 ou CD337) ; **NKp44** (ou NCR2 ou CD336) ; **NKp46** (ou NCR1 ou CD335) chacun possédant plusieurs isoformes. [51] NKp30 et NKp46 sont exprimés par toutes les cellules NK tandis que NKp44 est exprimé seulement par les cellules NK activées. [52]. L'acquisition des récepteurs NCR est d'ailleurs corrélée avec l'apparition de l'activité cytotoxique des cellules NK à l'encontre des cellules cancéreuses ou infectées par des virus. [48,53,54]

A l'inverse, une diminution de l'expression de ces récepteurs est corrélée avec une activité cytotoxique limitée. [55]

Leurs ligands sont des ligands d'origine virale, des heat shock-associated protéines ou encore des antigènes de tumeur (B7-H6, MLL5, BAT-3...) [52,56]. Chaque NCR interagit avec différents pathogènes ou molécules exprimées par des cellules cibles ou sécrétées.[57]

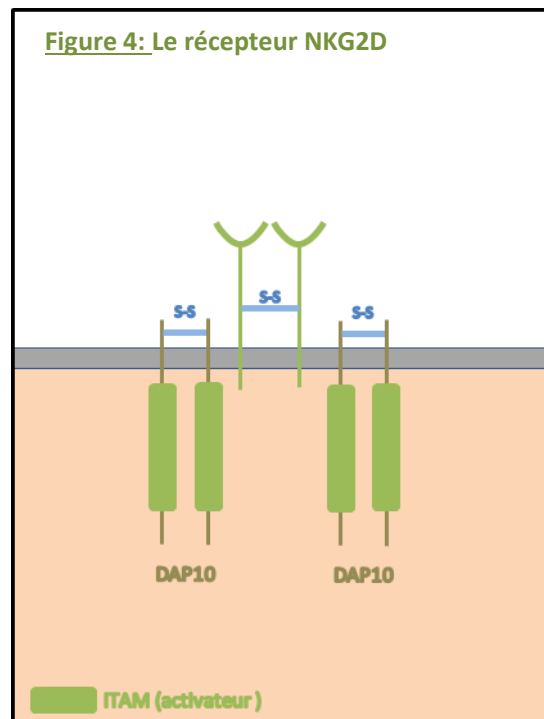
Parmi eux, B7-H6 le ligand pour NKp30, a été retrouvé comme fortement exprimé dans certains cancers et sa forme soluble sB7-H6 est corrélé avec la charge tumorale et la dissémination des cellules cancéreuses. NKp30 apparait comme une cible thérapeutique prometteuse car elle est impliquée dans plusieurs types de cancers (cervicaux, gastro-intestinaux, hématologiques, neuroblastome etc). [48]

2) Les Récepteurs de la superfamille des Lectines de Type C

• NKG2D

Le récepteur NKG2D (Natural Killer Group 2D) également appelé CD314 a été identifié dans les années 1990. [58,59] C'est un récepteur activateur transmembranaire qui appartient à la superfamille des lectines de type C et qui est présent à la surface des cellules sous forme d'homodimères. Il est exprimé constitutionnellement par l'ensemble des cellules NK mais également par d'autres types cellulaires comme les LT ($\gamma\delta$, CD4+ et CD8 $\alpha\beta$) et NKT.[60] Le récepteur NKG2D joue un rôle majeur dans la reconnaissance et l'élimination des cellules infectées et malignes. Plusieurs ligands de NKG2D ont été identifiés. Parmi eux, les molécules de stress MICA et MICB (Major Histocompatibility complex class I related chain A and B), molécules apparentées aux molécules de CMH de type I mais également les ligands de la famille des UL16 binding proteins (ULBP 1 à 6). [60,61]

Ce sont généralement des cellules en situation de stress qui sur-expriment ces ligands lorsqu'elles sont infectées, transformées, lorsqu'elles ont subi un choc oxydatif, thermique ou lorsque leur ADN a subi des dommages. [62] Une fois liées à leur ligand, ces récepteurs vont transmettre chez les cellules NK via leurs sous unités adaptatrices DAP10, des signaux de survie, de prolifération, induire également une dégranulation et la production de cytokines. [63] (Figure 4) Par ailleurs, les cytokines vont moduler l'expression de NKG2D par les cellules. L'IL2, IL7, IL12 et IL15 vont induire une augmentation de l'expression du NKG2D tandis que les IFN, TGF β et IL21 vont avoir l'effet inverse. [61] Ce sont le plus souvent les tumeurs primaires/précoces qui expriment des ligands de NKG2D. Cependant, plusieurs mécanismes d'échappement ont été identifiés malgré l'expression de NKG2D par les cellules NK par exemple la sécrétion par les tumeurs de ligands NKG2D solubles faisant de ce récepteur, une cible thérapeutique d'intérêt. [64,65]



- **CD94/NKG2**

CD94/NKG2 est une famille de récepteurs appartenant également à la superfamille des lectines de type C.

Ce sont des hétérodimères composés d'une sous-unité commune le CD94 lié de façon covalente à une chaîne distincte codée par un gène de la famille NKG2. Il existe 6 différents types de transcrits appartenant à la famille NKG2 (A,B,C,E,F et H) au potentiel soit activateur soit inhibiteur.[66] (Figure 5)

Les cellules NK ainsi que certains types de LT comme les LT CD8+ les expriment de façon constitutionnelle. Ils se lient de manière spécifique aux molécules de la famille CMH de type I non classiques, HLA-E.

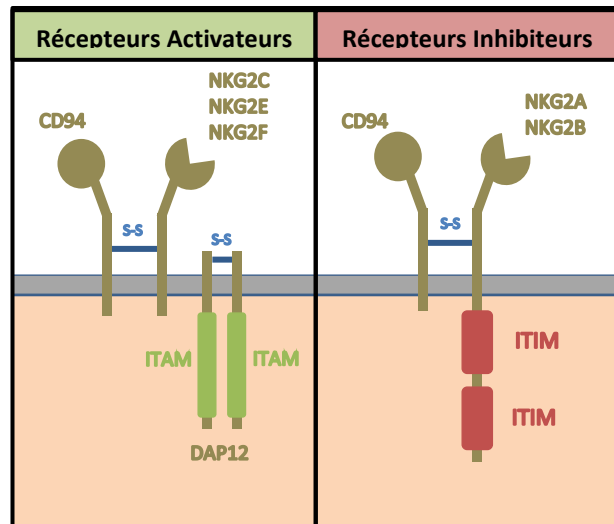
Les complexes CD94/NKG2C, CD94/NKG2E et CD94/NKG2F transmettent un signal activateur, tandis que CD94/NKG2A et CD94/NKG2B transmettent un signal inhibiteur.

NKG2C est bien connu pour être le récepteur qui permet la reconnaissance des peptides du Cytomégalo virus (CMV) et permet ainsi l'expansion des cellules NK pour lutter contre ce pathogène. [67]

3) **Les Récepteurs KIR**

Parmi le panel des récepteurs présents à la surface des cellules NK, les récepteurs de la famille des Killer Immunoglobulin like (KIR) prédominent. Ce sont des récepteurs transmembranaires qui reconnaissent les molécules de CMH de type I (HLA-A, -B et -C). [68]. De nombreux gènes codant pour les récepteurs KIR ont été identifiés et se situent sur le chromosome 19. Ces gènes vont s'exprimer de façon aléatoire pendant le développement et selon l'état de méthylation de l'ADN. [69,70] Chaque gène code pour un récepteur KIR différent de par ses domaines intra et extra cellulaires.

Figure 5: Les récepteurs CD94/NKG2



Leur nomenclature est établie selon le modèle suivant :

- D correspondant au nombre de domaines Immunoglobuline extracellulaires avec soit 2 soit 3 domaines (2D ou 3D).
- L ou S correspondant à la longueur de leur domaine intra-cytoplasmique avec L pour « Long » et S pour « Short ».

Les récepteurs KIR sont soit inhibiteurs soit activateurs avec une prédominance de récepteurs inhibiteurs. [48,71] (Figure 6) Ce sont eux qui régulent le développement de la tolérance médiée par le CMH type I, des NK vis-à-vis des cellules du soi. [72] La découverte d'anticorps dirigés contre la partie extra cellulaire des récepteurs KIR inhibiteurs ou activateurs a été une découverte majeure et a permis de mieux comprendre les mécanismes de la cytotoxicité médiée par les cellules NK.

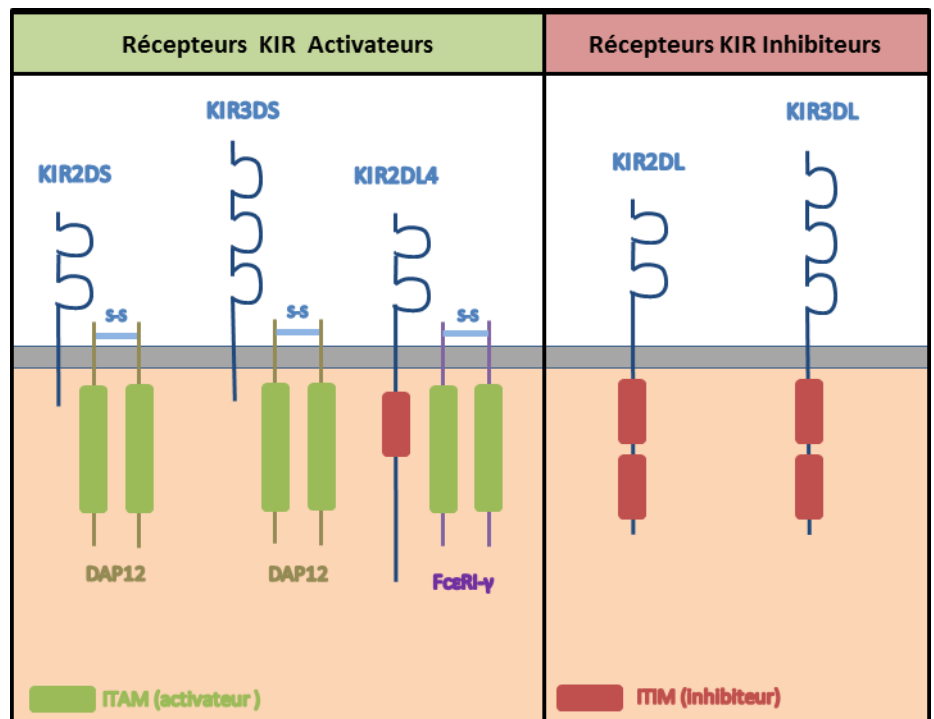
Le domaine extra cellulaire d'un récepteur KIR détermine quelle molécule de CMH de type I peut être reconnue par la cellule NK. Tandis que le domaine intracellulaire transmet soit un signal inhibiteur soit activateur.

Les **récepteurs KIR activateurs** présentent un court domaine intra-cytoplasmique associé à des motifs intracellulaires activateurs ITAMs.

Ces motifs interagissent avec une tyrosine kinase qui va ensuite générer un signal activateur. Ils sont également associés de manière non covalente à une molécule transmembranaire activatrice DAP12 qui permet la transmission des signaux. [71]

Les **récepteurs KIR inhibiteurs** présentent de longs motifs intracellulaires appelés Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs (ITIMs) qui une fois phosphorylés, recrutent des tyrosines phosphatases inhibant l'activation des cellules.[71]

Figure 6: Les récepteurs KIR Activateurs et Inhibiteurs



KIR2DL4 fait exception à ces règles, car malgré un long domaine intracellulaire, il est activateur et son domaine intra-cellulaire est composé d'une molécule adaptatrice FcεRI-γ associée à un motif ITAM.[71] A noter que les inhibiteurs de l'ADN méthyltransférase augmentent le nombre de récepteurs KIR transcrits. [73]

Dans le contexte allogénique, l'incompatibilité KIR/HLA entre donneur et receveur (mismatch) est à l'origine de la stratégie visant à favoriser l'activation des cellules NK du donneur présentes dans le greffon et l'éradication des cellules tumorales du receveur.

4) Les récepteurs LILR (Leucocyte Immunoglobulin Like Receptors)

Les Leucocyte Immunoglobulin Like Receptors (LILR) comptent 11 récepteurs. Ils ont comme leur nom l'indique, une structure similaire aux Immunoglobulines car possèdent deux des quatre domaines extra-cellulaires. [74] Ils sont exprimés par plusieurs types cellulaires dont les cellules NK, NKT, plusieurs catégories de LT, LB et autres cellules présentatrices d'Ag (CPA). Ils sont divisés en 2 catégories : récepteurs Activateurs (LILRA) et Inhibiteurs (LILRI) en fonction de la présence ou l'absence de motifs tyrosine au niveau de leur domaine intra cytoplasmique. Les cellules NK expriment majoritairement des récepteurs LILRI.

Ces récepteurs permettent aux cellules NK de reconnaître des molécules du CMH de type I. [75]

5) Les récepteurs de la famille NECL (Nectin and Nectin like)

Les récepteurs de la famille NECL (Nectin and Nectin Like) comptent parmi eux plusieurs récepteurs dont DNAX Accessory Molecule -1 (DNAM-1) également appelé CD226, CRTAM (class I-restricted T cell-associated molecule), CD96 et TIGIT (T cell immunoreceptor with immunoglobulin and ITIM domains) pour les principaux, exerçant une action synergique. Ils sont exprimés par les cellules NK et les LT CD8 principalement. [76]

Ils vont pouvoir se lier avec des molécules de nectine ou assimilées aux nectines (Polio Virus Receptor (PVR) (= CD155)/ Nectin-2 (CD112)) et induire une réponse cytotoxique. Les molécules nectines et nectines-like sont des molécules d'adhérence exprimées par de nombreuses tumeurs. Elles jouent un rôle suppresseur de tumeur et induisent la lyse des cellules tumorales par les cellules NK notamment. [76]

Cependant, certaines tumeurs développent divers mécanismes d'échappement pour outre passer l'activité anti-tumorale de ces récepteurs. [49]

6) CD16

Le CD16 également appelé Fc γ RIII appartient à la superfamille des immunoglobulines (Ig). C'est un récepteur activateur de faible affinité du fragment Fc des IgG. C'est également un marqueur de maturité cellulaire ; il est principalement exprimé par les cellules NK CD56dim mais également par les macrophages/monocytes et par les mastocytes. [14] Le CD16 est engagé lorsque les cellules NK se lient à des cellules cibles recouvertes d'anticorps ; il transmet alors un signal d'activation permettant ainsi l'activité cytotoxique via le phénomène d'ADCC. La liaison d'une Ig avec le CD16 entraîne une phosphorylation du motif ITAM intracellulaire et la cascade de signalisation qui s'en suit permet l'activation de la cellule NK.

Le CD16 est le seul récepteur qui peut activer de manière autonome les cellules NK sans signal d'activation additionnel produits par d'autres récepteurs. [50]

7) Les molécules de co-stimulation

Plusieurs molécules de co-stimulation exprimées par les cellules NK ont été identifiées. Parmi elles, OX40(ou CD134), 2B4 (CD244), CD137 (4-1BB) et CD27 sont les plus étudiées. 2B4 est une glycoprotéine de surface appartenant à la superfamille des immunoglobulines qui se lie au CD48.[77] Tandis que CD137, OX40 et CD27 appartiennent à la superfamille des récepteurs au TNF. [48] Elles relaient toutes un signal activateur une fois stimulées et sécrètent à leur tour de l'IFN- γ permettant l'interaction avec d'autres effecteurs immunitaires.

Plusieurs anticorps monoclonaux ciblant ces molécules de co-stimulation ont été développés et sont aujourd'hui évalués en clinique ; entre autre l'Urelumab qui cible le CD137 et le Varlilumab qui cible le CD27. Ces thérapeutiques sont évaluées dans des indications d'oncohématologie ainsi que dans les tumeurs solides seules ou en association. [48]

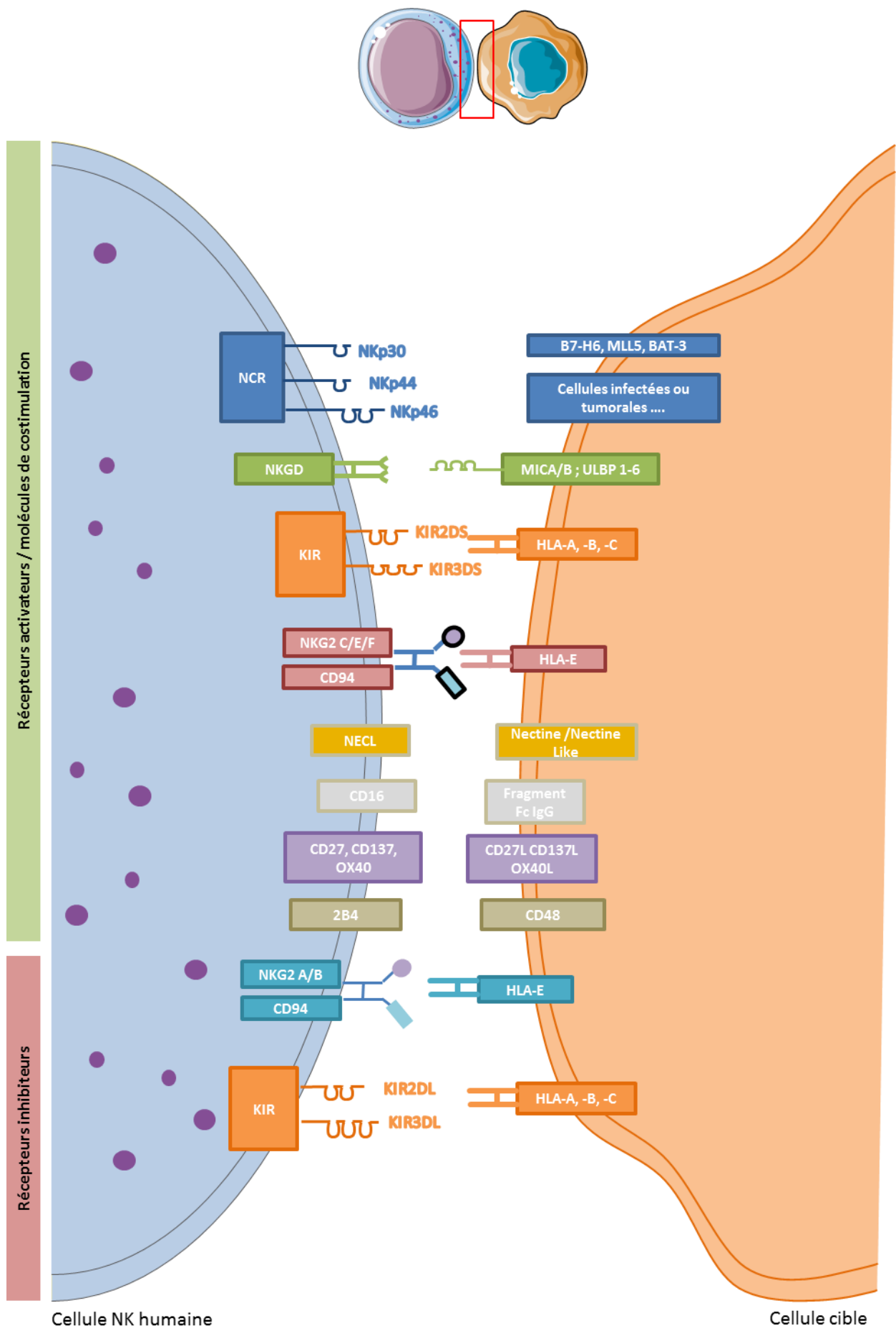


Figure 7 : Schéma Récapitulatif des récepteurs activateurs et inhibiteurs des cellules NK

IV. Principales fonctions effectrices des cellules NK

Les cellules NK sont des cellules qui exercent une activité cytotoxique à l'encontre des cellules infectées et tumorales entre autres. Par ailleurs, elles assurent un rôle important d'immuno-surveillance afin de prévenir les processus infectieux et tumoraux. Ce sont des cellules effectrices de l'immunité innée bien qu'elles participent également à la mise en place d'une réponse adaptative à travers de nombreuses interactions avec d'autres types cellulaires et la sécrétion de médiateurs. Le système de détection des cellules anormales par les cellules NK résulte d'un fin équilibre entre récepteurs activateurs et inhibiteurs.

C'est également l'intégration de voies antagonistes en lien avec les populations cellulaires présentes dans l'environnement cellulaire qui gouverne l'équilibre dynamique régulant l'activation des cellules NK et qui va déterminer si les cellules vont être activées pour éliminer les cellules cibles.

1) Activité Cytotoxique

Comme leur nom l'indique, les cellules NK sont des cellules « tueuses ». Par le passé, plusieurs expériences ont mis en évidence une activité cytotoxique naturelle des cellules NK lorsqu'elles sont en présence de cellules étrangères, stressées, endommagées, tumorales ou infectées par des virus. On va retrouver chez ces cellules dites « cellules cibles », des molécules de CMH de type I altérées ou absentes qui vont être reconnues par les récepteurs inhibiteurs (KIR/LIR) des cellules NK, à l'origine d'un signal activateur (hypothèse du « missing self »). [78–80] Plus récemment, une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à cette activité cytotoxique suggère que les cellules NK en état de quiescence rentrent dans une phase d'activation médiée par un large panel de récepteurs activateurs et inhibiteurs présents à leur surface. [47] L'intégration de multiples signaux activateurs et inhibiteurs va aboutir ou non à l'activation des cellules NK et à leur activité cytotoxique.

Il existe plusieurs mécanismes de cytotoxicité médiés par les NK : cf figure 9

- **Cytotoxicité dépendante de l'exocytose de granules cytolytiques**
 - **Cytotoxicité directe ou dite « naturelle »**
 - **Cytotoxicité cellulaire médiée par les Anticorps (ADCC)**
- **Cytotoxicité liée à l'interaction avec des récepteurs de mort cellulaire**

■ La **cytotoxicité directe dite « naturelle »** ainsi que la **cytotoxicité médiée par les Anticorps (ADCC)** sont tous deux des mécanismes de cytotoxicité dépendants de l'exocytose de granules cytolytiques. Les granules cytolytiques sont des lysosomes sécrétoires spécialisés qui sont présents de façon constitutionnelle dans le cytoplasme des cellules NK. Elles contiennent essentiellement des perforines et des granzymes. [81]

Ces granules sont libérées au niveau d'une synapse immunologique (zone de contact entre cellule NK et cellule cible). La **perforine** est une protéine qui est capable d'altérer la perméabilité membranaire des cellules cibles en se polymérisant et ainsi forme des pores à leur surface. [81,82] Les **granzymes** quant à elles sont des molécules appartenant à la famille des sérines protéases. Elles vont pénétrer dans les cellules cibles par l'intermédiaire des pores créés par la perforine et activer la voie intrinsèque des caspases aboutissant à un signal d'apoptose pour ces cellules. [81,83] (cf figure 8 ci-après)

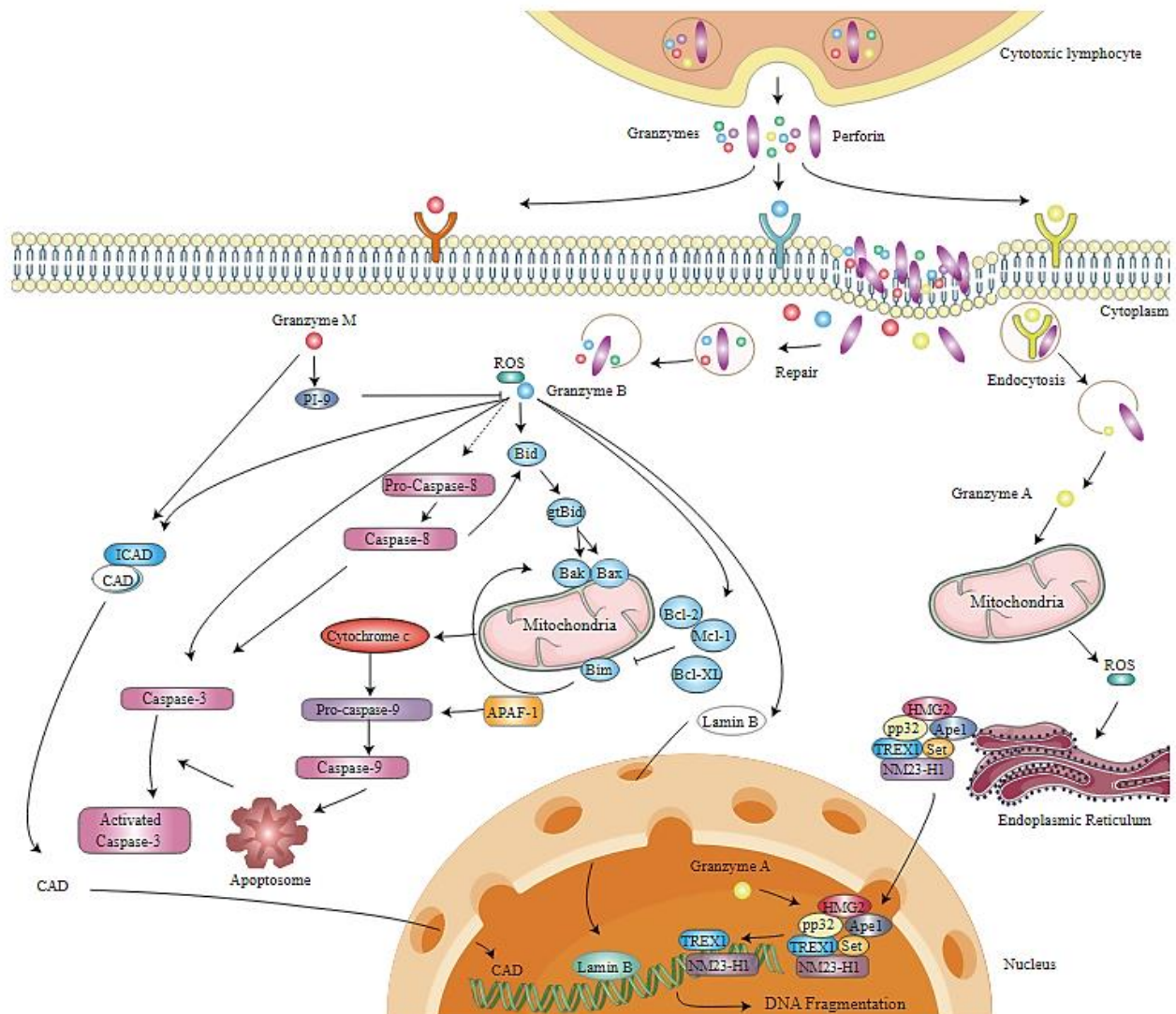


Figure 8: Cascade de signalisation de l'apoptose médiée par le granzyme B <https://www.creative-diagnostics.com/perforin-granzyme-apoptosis-pathway.htm>

Les cellules NK et plus particulièrement les cellules NK CD56^{dim} ont la capacité de lyser les cellules cibles par l'intermédiaire d'anticorps, appelé phénomène d'ADCC. Le récepteur CD16 également appelé FcγRIII se lie au fragment Fc des anticorps (le plus souvent des IgG) présents à la surface des cellules cibles et induit la dégranulation des cellules NK. [84]

■ Cytotoxicité liée à l'interaction avec les récepteurs de mort cellulaire (RMC)

Un autre mécanisme de cytotoxicité est possible via l'interaction des ligands présents à la surface des cellules NK avec des récepteurs de mort cellulaire (RMC) présents à la surface des cellules cibles.

La superfamille des RMC se caractérise par la présence d'un domaine intra cytoplasmique qui leur permet d'activer la voie de signalisation des caspases. [85–87].

Ce sont par exemple les interactions Fas (CD95) avec Fas ligand (Fas-L= CD95L) ou encore TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) avec son ligand correspondant TRAIL-L. [88]

A noter, que l'expression cellulaire des RMC à la surface des cellules cibles peut être induite par les cellules NK à travers la production d'IFN-γ. [89]

Ces interactions mènent à un phénomène d'apoptose et jouent un rôle important dans la veille immunologique.

2) Propriétés immunomodulatrices et surveillance des tumeurs

En complément de leur rôle d'effecteur de l'immunité innée, les cellules NK jouent un rôle majeur dans l'induction de la réponse adaptative. Elles interagissent étroitement avec d'autres effecteurs cellulaires via la production de cytokines et autres médiateurs (chemokines / facteurs de croissance) et régulent leur activité. [90,91] Il est à noter que ce sont les cellules NK CD56^{bright} qui produisent principalement des cytokines.

Les cellules NK favorisent la maturation et l'activation des cellules Dendritiques (DC), des LT et des macrophages via la production de cytokines telles que l'IFNγ et le TNF qui sont des cytokines pro-inflammatoires, mais également via un contact direct des cellules dépendant d'interactions récepteur/ligand (cf figure 9) Elles vont par ailleurs être capables de lyser les cellules trop réactives ou immatures. [9] Ces cellules une fois activées vont à leur tour produire des cytokines (IL-12/IL-15/IL-18) créant ainsi un environnement propice à l'activation des cellules NK.

Les cellules NK sécrètent également de l'IL-10, IL-13, TNF- β et GM-CSF. Elles peuvent par ailleurs induire le recrutement d'autres cellules effectrices de l'immunité au niveau des sites inflammatoires à travers la production de chemokines telles que CCL3, CCL4, CCL5 (RANTES).

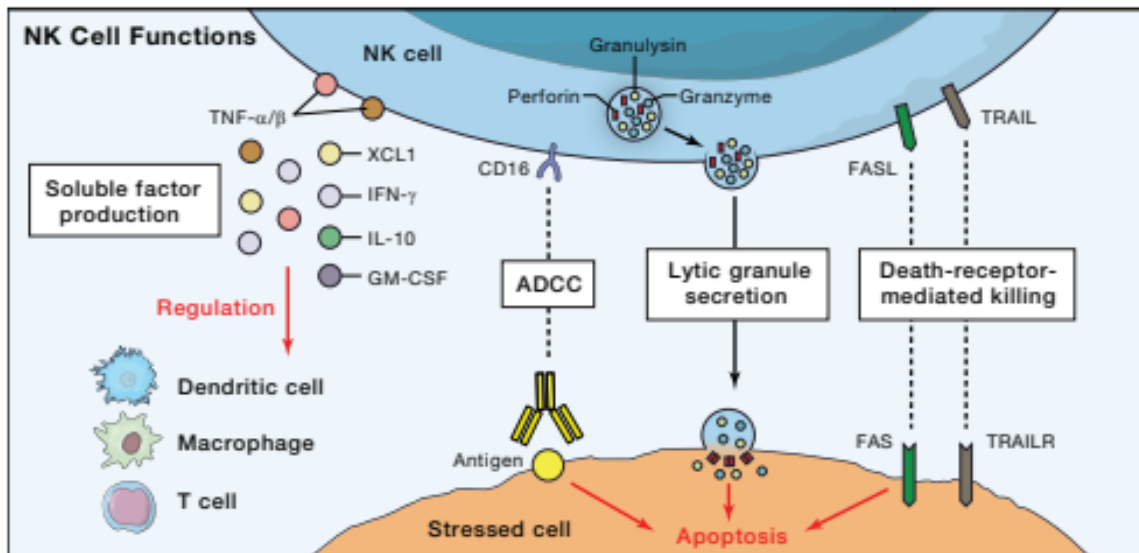


Figure 9 : Principales fonctions effectrices des cellules NK tirée de Crinier et al 2020 [20]

Comme mentionné précédemment, les cellules NK jouent un rôle majeur dans la surveillance des cellules tumorales et le développement de métastases notamment en oncohématologie. Ceci a d'ailleurs bien été mis en évidence sur des modèles précliniques. [92,93] Le rôle joué par les cellules NK et les implications cliniques pour la genèse des cancers hématologiques ont été récemment revus par Gonzalez-Rodriguez et al (2019) [94].

PARTIE II :

APPLICATIONS POSSIBLES POUR LES CELLULES NK EN ONCOHEMATOLOGIE: ESSAIS CLINIQUES, PRINCIPAUX ACTEURS ET PERSPECTIVES

PARTIE II : APPLICATIONS POSSIBLES POUR LES CELLULES NK EN ONCOHEMATOLOGIE: ESSAIS CLINIQUES, PRINCIPAUX ACTEURS, ET PERSPECTIVES

Dans cette seconde partie, sera rappelé dans un premier temps le rationnel derrière l'utilisation des cellules NK en clinique. Ensuite sera fait un état des lieux des applications possibles en oncohématologie pour les cellules NK à travers les essais cliniques en cours et les différents acteurs impliqués dans leur développement. Enfin, seront présentées plusieurs autres thérapeutiques ayant une action sur les cellules NK actuellement développées et les perspectives.

I. Intérêt de l'utilisation des cellules NK en oncohématologie

L'immunothérapie est une approche innovante utilisée pour le traitement des tumeurs. Elle consiste à utiliser les capacités du système immunitaire pour cibler les cellules anormales (tumorales, infectées etc).

Les cellules NK sont d'excellentes candidates de par leur capacité à reconnaître les cellules transformées et à les éliminer à travers différents mécanismes comme expliqué précédemment.

La sécurité d'utilisation des cellules NK autologues a été démontrée dans plusieurs études. [95] Elles permettent d'accroître le nombre de cellules NK circulantes fonctionnelles notamment en cas de masse tumorale importante. Cependant, cette approche n'a pas permis d'obtenir un effet thérapeutique suffisant en oncohématologie ainsi que dans d'autres indications. De plus, leur fonctionnalité et leur capacité d'expansion était moindre en comparaison des cellules NK allogéniques. [95,96]

C'est pour cela que les équipes de recherche se sont plutôt tournées vers le développement de protocoles utilisant des cellules NK allogéniques.

Les patients atteints d'hémopathies malignes peuvent être éligibles à la greffe de cellules souches hématopoïétiques (GCSH). Pour rappel, la GCSH allogénique est un traitement curatif permettant au patient de reconstituer un système immunitaire fonctionnel dans le cas des hémopathies malignes. [97] Il est à noter que les cellules NK sont la première des populations lymphocytaires à être reconstituée en post-greffe. [98] La GCSH est utilisée par ailleurs comme « médecine régénérative » dans le cadre des pathologies non cancéreuses.

L'injection de plusieurs doses de cellules NK allogéniques purifiées prend alors tout son sens car cela permet de renforcer leur activité anti tumorale grâce à l'élimination des cellules résiduelles, de prévenir la rechute post-greffe et de lutter contre les infections.[99] Les greffons contiennent un nombre variable de LT. Lorsqu' ils sont présents en trop grande quantité, ils peuvent induire une maladie du greffon contre l'hôte (Graft versus Host Disease = GVHD) plus ou moins sévère selon les patients.

Par la suite, c'est lors des premières greffes haploidentiques qu'a réellement été démontré l'intérêt des cellules NK dans le cadre de l'allogreffe. En effet, le mismatch existant entre les récepteurs KIR inhibiteurs exprimés par les cellules NK du donneur haploidentique et le receveur permet l'activation des cellules NK par levée d'inhibition à l'encontre des cellules leucémiques reconnues comme étant anormales et ce chez des sujets atteints de Leucémie Aigüe Myéloïde (LAM). [100] C'est ce que l'on appelle l'effet Graft versus Leukemia (GVL). De plus, il n'y a pas de GVHD induite par les cellules NK en post allogreffe. [100–103]

Plus tard, les cellules NK allogéniques activées et expandues ex vivo ont également été utilisées en clinique en dehors du contexte de greffe. [104]

II. Transfert adoptif de cellules NK

Il existe 4 principales stratégies pour le transfert adoptif de cellules NK utilisables en tant qu'immunothérapie : les cellules NK autologues, les cellules NK allogéniques, les cellules NK issues de lignées et enfin les cellules NK modifiées génétiquement.

1) Les cellules NK Autologues

Les cellules NK autologues sont des cellules issues du patient lui-même. Historiquement, les premiers protocoles cliniques d'immunothérapie cellulaire autologues consistaient en l'administration de plusieurs populations hétérogènes de cellules mononuclées (notamment avec les cellules NK, NKT (CD3+/CD56+) ou LT CD8+) combinées à de fortes doses de cytokines notamment l'IL-2 appelées LAK (Lymphokine-Activated Killer). [105] Cette approche permettait de générer des cellules activées à fort potentiel cytotoxique.

Les cytokines utilisées étaient alors injectées directement chez le patient afin de permettre la prolifération des cellules in vivo (la plus utilisée étant l'IL-2). Ces protocoles ont été à l'origine d'importantes toxicités systémiques à cause des fortes doses l'IL-2 utilisées. [106] C'est pourquoi rapidement les cellules furent plutôt activées et expandues ex-vivo. [107]

Afin d'augmenter le nombre de cellules NK fonctionnelles présentes dans le sang circulant, le transfert adoptif de cellules NK autologues est apparu comme étant une approche simple à mettre en œuvre. Les principaux avantages étant qu'il n'est pas nécessaire de conditionner le patient, ni de trouver de donneur compatible, il n'y a aucun risque d'induire de GVHD ou de transmettre de pathogènes.

Récemment, une thérapie développée à partir de cellules NK autologues cryopréservées (Cellprotect) a obtenu le statut de médicament orphelin par la Food and Drug Administration (FDA). Une étude de phase I (NCT04558853) a été menée à l'hôpital universitaire Karolinska chez des patients atteints de Myélome Multiple (MM) autogreffés. Aucun effet indésirable grave n'a été signalé et sur les 6 patients inclus dans l'essai, 4 avaient une maladie encore active au moment de l'injection des cellules NK et ont répondu cliniquement. [108]

Cependant, les résultats des études cliniques évaluant les cellules NK autologues n'ont globalement pas été concluants. La fonctionnalité des cellules NK et leur expansion était souvent faible probablement pour plusieurs raisons [72,109] :

- les patients sont souvent lourdement pré-traités et les cellules NK ont bien souvent leur phénotype et leurs fonctionnalités altérés.[95,110]
- L'activité des cellules NK peut être inhibée par la présence de molécules de CMH-I. [111]
- L'activité des cellules NK peut également être inhibée en présence de LT ou LT régulateurs (Tregs) car ils fixent l'IL-2 avec plus d'affinité.

Plusieurs essais cliniques évaluent encore aujourd'hui l'utilisation de cellules NK autologues combinées cette fois à plusieurs stratégies complémentaires pour pallier à ce manque d'efficacité (anticorps / inhibiteurs du protéasome etc). On note cependant une nette tendance au développement de thérapies allogéniques et off-the shelf afin de diminuer drastiquement le délai d'attente des patients pour accéder à ces thérapeutiques ou les échecs de fabrication.

2) Les cellules NK Allogéniques :

La seconde stratégie de transfert adoptif consiste en l'utilisation de cellules NK allogéniques. Les cellules NK sont collectées chez un donneur sain, activées et expandues ex vivo puis réinjectées au patient. Comme mentionné précédemment, il a été montré que les cellules NK sont la première population cellulaire lymphocytaire à être reconstituée en post allogreffe de CSH. [98]

De ce fait, elles jouent un rôle crucial en matière de défense contre les cellules tumorales résiduelles et contre le risque infectieux avant que les autres populations lymphocytaires soient reconstituées. [99]

A la différence des cellules NK autologues, la cytotoxicité des cellules NK allogéniques n'est pas inhibée par la présence de molécules de CMH-I et elles proviennent de donneurs sains permettant ainsi d'avoir une matière première plus fonctionnelle. [101]

Les LT du donneur ont été clairement identifiés comme étant à l'origine de la GVHD et des différentes atteintes d'organes rencontrées dans cette pathologie. C'est pourquoi, ont été développées des thérapies à partir de cellules NK obtenues à partir de prélèvements déplétés en LT associées ou non à une greffe de CSH. [112]

De nombreuses études cliniques ont démontré l'innocuité d'utilisation des cellules NK à la fois dans les hémopathies malignes mais également dans les Tumeurs solides. [95]

La spécialité oNKord® de Glycostem (NK allogéniques off the shelf obtenus à partir de progéniteurs CD34+ issus de sang de cordon) a reçu le statut de médicament orphelin par l'EMA en 2014 et la Food and Drug Administration (FDA) en 2016. oNKord® peut être utilisé chez des patients atteints de LAM non éligibles à l'allogreffe. Cette autorisation a été obtenue grâce aux résultats de l'étude clinique multicentrique de phase I/II (NCT04632316) qui a montré que oNKord améliore la survie à un an des patients âgés traités (80%) vs le bras contrôle (35%). [113]

Il existe plusieurs sources possibles de cellules NK allogéniques : les prélèvements de cellules mononuclées de sang périphérique (CMNSP), les unités de sang placentaire (USP), cellules souches embryonnaires (CSE), CSH CD34+, Induced Pluripotent Stem Cells (IPSC). A noter que le cas particulier des cellules NK issues de lignées sera abordé dans la partie 3) ci-après. Les principaux avantages et inconvénients de chacune de ces sources de cellules NK seront discutés dans la partie III.

Il est nécessaire d'obtenir des quantités importantes de cellules NK afin d'être en mesure de produire les doses adéquates prévues par les différents protocoles. La grande majorité des études de phase I vont globalement dans ce sens et cherchent également à déterminer la/les dose(s).

a) Essais cliniques évaluant les cellules NK stimulées

Les cellules NK peuvent être cultivées en présence de cytokines (seules ou associées le plus souvent IL-2/IL-15/IL-21/IL-27) de dérivés acellulaires ou bien en présence de cellules nourricières (CN également appelées feeder cells) permettant ainsi de favoriser leur activation et leur expansion. Les CN sont préalablement irradiées pour supprimer leur capacité à proliférer. Les conditions de culture des cellules NK seront abordées en détail dans la partie III. [114]

Les protocoles utilisés pour l'activation et l'expansion des cellules NK sont très variés d'un essai clinique à l'autre (durée d'incubation / technique utilisée/ nature et concentration des cytokines / milieu de culture choisi / source de cellules NK / quantité de cellules NK réinjectées / fréquence et moment des réinjections/ combinaisons de techniques etc).

L'utilisation de cytokines permet aux cellules NK d'augmenter leur activité cytotoxique à l'égard des cellules tumorales mais également leur persistance in-vivo. L'IL-2 ou l'IL-15 entre autres sont les cytokines clés qui sont le plus largement utilisées à ces fins. Elles sont présentées plus en détails dans la partie III ci-après. [115]

Le tableau 2 reprend les principales études d'intérêt portant sur les cellules NK allogéniques transférées adoptivement. Elles ont été regroupées selon la technique de stimulation utilisée. A noter que plusieurs études ne sont pas mentionnées notamment les études chinoises car il n'y a que très peu d'informations disponibles sur les protocoles utilisés.

Cellules NK stimulées par des cytokines

L'utilisation de l'IL-2 seule injectée en IV ou en sous cutané est de loin la méthode la plus répandue dans les essais cliniques clôturés et actuels pour la stimulation des cellules NK.

En 2016, une étude de phase I/II (NCT02955550) financée par Cellularity a évalué le PNK-007 en post autogreffe chez des patients atteints de LAM et de MM. PNK-007 est fabriqué à partir de cellules NK allogéniques dérivées de cellules CD34+ issues de sang placentaire combiné ou non à de l'IL-2 humanisée injectée en sous cutané.

L'essai a montré que les cellules persistent dans le sang et la moelle pendant au moins 1 mois et que l'utilisation PNK-007 n'a pas été à l'origine de toxicités. Sur les 15 patients traités, 10 avaient une maladie résiduelle négative à 3 mois et 7 à 1an. . [116]

Deux autres études de phase II ont ensuite ouvert en 2020 pour évaluer CYNK-001 dans la LAM (NCT04310592) et dans le MM (NCT04309084). CYNK-001 correspond à la version optimisée de PNK-007. Il est également dérivé de cellules CD34+ issues de sang placentaire off the shelf et cette fois ci cryopréservé. Plus récemment, la FDA a accordé le statut de fast-track à CYNK-001 dans la LAM et de médicament orphelin dans le gliome et les cancers gastriques.¹

Les doses de cellules NK obtenues par stimulation avec de l'IL-2 varient grandement d'un protocole à l'autre 1×10^6 à 3×10^9 cellules NK par kg.

Trois essais cliniques évaluent l'efficacité de l'IL-15 dans la stimulation des cellules NK. L'étude NCT05304754 ayant ouvert récemment, évalue l'efficacité d'une stimulation des cellules NK ex-vivo par de l'IL-15 en post allogreffe haploidentique chez des patients pédiatriques. Tandis que les études NCT02395822 (IV) et NCT01385423(SC) évaluent l'efficacité d'injections de doses croissantes d'IL-15 in vivo sur 12 jours après administration de cellules NK. Les patients de l'étude NCT01385423 ont reçu de l'IL-15 en sous cutané et ont présenté des toxicités telles qu'un syndrome de relargage cytokinique (SRC) pour 56% d'entre eux associé à une neurotoxicité dû à une augmentation du taux plasmatique en IL-6. Les auteurs de l'étude ont conclu que l'association médicamenteuse utilisée pour la lymphodéplétion (Cyclophosphamide/ Fludarabine) semble être à l'origine du développement du SRC par accumulation d'IL-15. [117]

Enfin, l'étude NCT00823524 a évalué la combinaison entre l'IL-15 et l'IL-21 pour la stimulation des cellules NK en post allogreffe. Les cellules NK ont été administrées 2 à 3 semaines post GCSH à des doses croissantes sans provoquer d'effet indésirable chez les patients quelle que soit la dose. (Dose médiane totale administrée 2×10^8 cellules NK/kg) L'étude a mis en évidence une diminution de la progression leucémique significative. [118]

Cellules NK stimulées par des composés acellulaires +/- cytokines

Le Nicotinamide (NAM) est un composé dérivé de la vitamine B3 utilisé dans les milieux de culture pour booster la prolifération cellulaire. Il joue le rôle d'inhibiteur allostérique des enzymes NAD-dépendantes et constitue une alternative intéressante aux CN pour la culture des cellules NK. [119]

¹ <https://celularity.com/celularity-receives-fast-track-designation-from-u-s-fda-for-its-nk-cell-therapy-cynk-001-in-development-for-the-treatment-of-aml/>

Gamida Cell développe actuellement une thérapeutique : le GDA-201 à partir de cellules NK allogéniques activées et expandues ex-vivo grâce à une combinaison d'IL-15 et de NAM. Le potentiel de migration, de prolifération et la cytotoxicité des cellules NK ont été grandement améliorés grâce à ces conditions de culture (taux d'expansion d'environ 40). GDA-201 a été évalué en clinique dans une étude de phase I (NCT03019666) combiné à du rituximab chez des patients atteints de lymphomes en rechute ou réfractaires.

Les résultats de l'étude sont encourageants et montrent une bonne tolérance du traitement sans SRC ou neurotoxicité ou de toxicité de grade 3 ou 4. Les cellules GDA-201 ont été retrouvées dans le sang circulant jusqu'à 14 jours post injection. Parmi les 20 patients inclus, 19 étaient évaluables avec 13 patients en Rémission Complète (RC) (65%) et 1 en Rémission Partielle (RP). La survie sans progression à 1 an était de 50% et de 35 % à 2 ans. La survie globale était de 78%. Il n'y a pas eu de SRC, de toxicité neurologique ou encore de GVHD chez les patients inclus.[95,120]

En juin 2022, Gamida a annoncé l'ouverture d'une étude de phase I/II (NCT05296525) afin d'évaluer la version cryopréservée du GDA-201 combinée au rituximab toujours chez des patients atteints de lymphome B diffus ou lymphome folliculaire.

Cellules NK stimulées par des CN in vitro +/- cytokines in vitro or in vivo

Les CN sont largement utilisées afin de favoriser la prolifération et l'activation des cellules NK en créant un microenvironnement favorable (CMH type I altéré et sécrétion de cytokines entre autres).

Deux essais cliniques de phase I ont permis d'évaluer l'efficacité et la sécurité d'utilisation de cellules NK issues de donneurs haploidentiques activées et expandues in vitro en présence d'IL-2 et de CN de lignée leucémique de grade clinique modifiées génétiquement pour exprimer de l'IL-15 membranaire et le ligand 4-1BB (K562-mbIL15-4-1BBL) préalablement irradiées. Au total 18 enfants et jeunes adultes atteints de leucémie en rechute ou réfractaire de mauvais pronostic ont été traités par chimiothérapie de rattrapage puis ont reçu une injection de cellules NK après chaque cycle de chimiothérapie associé à de faibles doses d'IL-2. Sur les 18 patients traités, 13 ont été mis en RC (72%). La dose médiane de cellules NK réinjectées était de $6.76 \times 10^6 / \text{kg}$ [0.7 à 34.2] avec une très faible contamination en LT. Les cellules NK ont été bien tolérées. Sur les 14 patients ayant reçu la totalité des doses de cellules NK, 4 sont toujours vivants et en rémission à plus de 750 jours post-injection. [121]

Une étude de phase II multicentrique a évalué l'utilisation de cellules NK haploidentiques activées et expandues en présence de CN modifiées génétiquement (K562-mbIL15-41BBL) et transférées adoptivement chez des patients atteints de LAM (NCT02763475). Ce transfert adoptif s'inscrit dans une stratégie de consolidation chez des patients avec une LAM à risque favorable ou intermédiaire traités par chimiothérapie. De faibles doses d'IL-2 étaient administrées en SC après l'injection des cellules NK. Seuls 7 patients ont été inclus et chacun d'entre eux a reçu 13 doses de cellules NK avec une dose médiane de $36.4 \times 10^6/\text{kg}$ [6.9 à 193.2]. Le suivi médian des patients était de 33 mois avec 6 patients toujours en RC. Etant donné le faible nombre d'inclus, il est difficile de tirer des conclusions. [122]

Un grand nombre d'études évaluent l'utilisation de cellules NK activées et expandues en présence de CN génétiquement modifiées exprimant l'IL-21 (K562-mbIL21-4-1BBL). L'étude de phase I/II menée par le MD Anderson (Texas, USA) (NCT01904136) évalue en post allogreffe haploidentique l'innocuité du transfert adoptif de cellules NK issues du même donneur et injectées à 3 temps distincts (en frais à J+2 /décongelé à J+7 et J+28) à la dose de 1×10^8 cellules/kg (dose déterminée lors de l'étude initiale de phase I) chez des donneurs atteints d'hémopathies myéloïdes.

80% des patients évaluable (19/24) ont reçu comme prévu les trois doses de cellules NK. Aucun effet indésirable notable n'a été déclaré. La survie sans progression à 1 an post-greffe était de 70.8% et 66.1% à 3 ans. En conclusion, les résultats de l'étude confirment la sécurité d'emploi et l'efficacité de l'utilisation de cellules NK activées par ces CN post-allogreffe haploidentique. [123,124]

Technique de stimulation utilisée	Source de cellules NK/ Protocole utilisé	Taux d'expansion (TE) dose + durée d'incubation	Numéro NCT ou publications	Commentaires
CYTOKINES				
IL-2	UCB CD34+ (PNK-007) +/- SC rhIL-2	10 à 30x10 ⁶ NK/kg 14 jours	NCT02955550 (MM)	Bonne tolérance Persistance des cellules à 1 mois
		1,3 ou 10x10 ⁶ NK/kg 35 jours	NCT02781467 (LAM)	Bonne tolérance – 1 CRS
	UCB CD34+ +/- SC rhIL-2 (Aldesleukin)	1-3 x10 ⁹ NK/kg	NCT04347616	Pas encore de résultats
	Frozen UCB CD34+ + SC rhIL-2 (CYNK-001) ALM/MM		NCT04310592 NCT04309084	Bonne tolérance
	MG4101 +/- Rituximab		NCT03349502 10.1182/blood-2020-133518	
Ex: Décitabine + Aldesleukin		NCT02316964 NCT01853358 NCT01823198 NCT01106950	Bonne tolérance	
IL-15			NCT05304754 NCT02395822 (SC) NCT01385423 (IV)* 10.1182/bloodadvances.2018028332	Bonne tolérance excepté pour l'essai NCT02395822 pour lequel 56% des patients ont eu un CRS + neurotoxicité
IL-15 + IL-21		TE 3.7 [0,8 à 70] Dose Med : 2x 10 ⁸ cells/kg 2-3 semaines	NCT00823524 Choi 2014	Bonne tolérance Diminution de la progression de la leucémie (74% to 46%)
COMPOSES ACELLULAIRES +/- CYTOKINES				
NAM + IL-15 + IL2 Rituximab	PBMC	TE 40 12.4 [2-26] x 10 ⁷ GDA cells/kg 14-16 jours	NCT05296525 (cryopreserved) NCT03019666	Bonne tolérance – toxicités attendues avec le rituximab 13/19 CR et 1/19 PR PFS (1an) = 50% / PFS (2ans) = 35% OS (2ans) = 78%
FEEDER CELLS +/- CYTOKINES				
Combiné à un anti-CD52	Alemtuzumab	TE 7,2 après 10j	NCT02689453 10.1182/bloodadvances.2021006440	3/11 RP - 2/11 RC Diminution des cellules malignes d'environ 38% - Augmentation ADCC et récepteurs activateurs NKp46 et NKG2D
Feeder cells génétiquement modifiées K562-41BB+ IL-15		Dose méd: 6,8x 10 ⁶ cells/kg [0,7-34,2] Dose méd: 36,4x 10 ⁶ cells/kg [6,9-193,2]	NCT01944982 NCT02074657 10.1016/j.canlet.2018.02.033 NCT02763475 10.1016/j.cml.2021.01.013	Bonne tolérance
K562-41BB+ IL-21			NCT05272293 NCT04220684 NCT03348033 NCT02809092 NCT04327037 NCT01823198 NCT01787474 NCT02763475 NCT01904136 10.1182/blood-2019-123936	Bonne tolérance

Tableau 2 : Principaux essais cliniques portant sur les cellules NK allogéniques en oncologie regroupés selon la technique de stimulation utilisée

3) Les cellules NK issues de lignées

La 3^{ème} stratégie pour obtenir des cellules NK consiste en l'utilisation de cellules NK issues de lignées. Ces cellules sont obtenues à partir de clones malins de cellules NK issues de patients atteints d'hémopathies malignes. Elles doivent être irradiées au préalable afin d'éviter tout risque de prolifération in vivo.

Il existe 7 lignées principales de cellules NK : NK92, NKG, NKL, NK-YS, KHYG-1, SNK-6 et IMC-1. [125] La plupart des lignées ne disposent pas d'une cytotoxicité importante et constante à l'égard des cellules tumorales à l'exception de la lignée NK92.

La lignée NK92 est de loin la plus étudiée et est actuellement la seule évaluée en clinique. Elle provient initialement d'un patient atteint d'un lymphome non hodgkinien et prolifère en présence d'IL-2. [126,127]

Les cellules NK92 ont été évaluées lors de 2 essais cliniques dans la LAM et autres hémopathies malignes en rechute post autogreffe. [128,129]. Actuellement, plusieurs études cliniques de phase I évaluent l'efficacité de CAR-NK générés à partir de cellules NK92 notamment les études financées par PersonGen (Chine) et Allife Medicine (Chine). 3 protocoles de PersonGen sont actuellement ouverts avec un statut inactif ou inconnu pour des indications en oncohématologie. (cf figure 14) A noter que NantKwest est un autre acteur industriel important spécialisé dans le développement de thérapeutiques à partir de cellules NK-92 dans les tumeurs solides.

4) Cellules NK modifiées génétiquement

Depuis plus de dix ans, de nombreuses méthodes d'ingénierie cellulaire ont été développées afin de modifier génétiquement les cellules NK utilisées à visée thérapeutique et ainsi tenter de pallier aux principales difficultés rencontrées avec cette population cellulaire. En effet, il est souvent difficile d'obtenir suffisamment de cellules NK même après amplification. De plus, leur persistance est limitée dans le temps après injection. [130] Selon l'indication thérapeutique, la stratégie utilisée diffère.

Les premières méthodes développées consistaient à transduire les cellules NK avec de l'ADN circulant (ADNc) codant pour l'IL-2 améliorant ainsi leur persistance. Ainsi, les cellules NK pouvaient produire de l'IL-2 endogène et il n'était plus nécessaire de fournir aux cellules de l'IL-2 par la suite. [131] Il en est de même pour l'IL-15. [132] Les méthodes se sont ensuite diversifiées avec l'amélioration de la reconnaissance antigénique afin de limiter l'impact des

effets inhibiteurs du microenvironnement tumoral. La plupart des techniques d'ingénierie cellulaire utilisées sur les cellules NK utilisent des vecteurs viraux transportant une large variété de transgènes.

a) CAR-NK

La technologie CAR

Les récepteurs Chimériques aux Antigènes ou Chimeric Antigen Receptors (CAR) sont des récepteurs de synthèse capables de rediriger de façon précise les fonctions et la spécificité des cellules effectrices de l'immunité à l'égard d'un antigène particulier. Ils sont constitués de plusieurs modules :

- Le **domaine extracellulaire** est construit à partir :

→ du domaine variable de liaison à l'antigène d'un anticorps (segments V_H et V_L) également appelé fragment variable simple chaîne (scFv)

→ du domaine charnière (hinge) qui confère de la flexibilité au CAR et lui permet de pouvoir se positionner par rapport à l'antigène

- Le **domaine transmembranaire** assure l'ancrage

- Le **domaine intracellulaire** qui est constitué d'un à plusieurs domaines de co-stimulation selon les générations de CAR le tout étant associé au domaine intracellulaire de signalisation de la chaîne CD3 ζ du TCR. (cf Figure 10)

Il permet de transmettre des signaux en intracellulaire lorsque le CAR se lie à sa cible et ainsi d'activer les cellules mais également d'induire leur expansion et leur persistance.

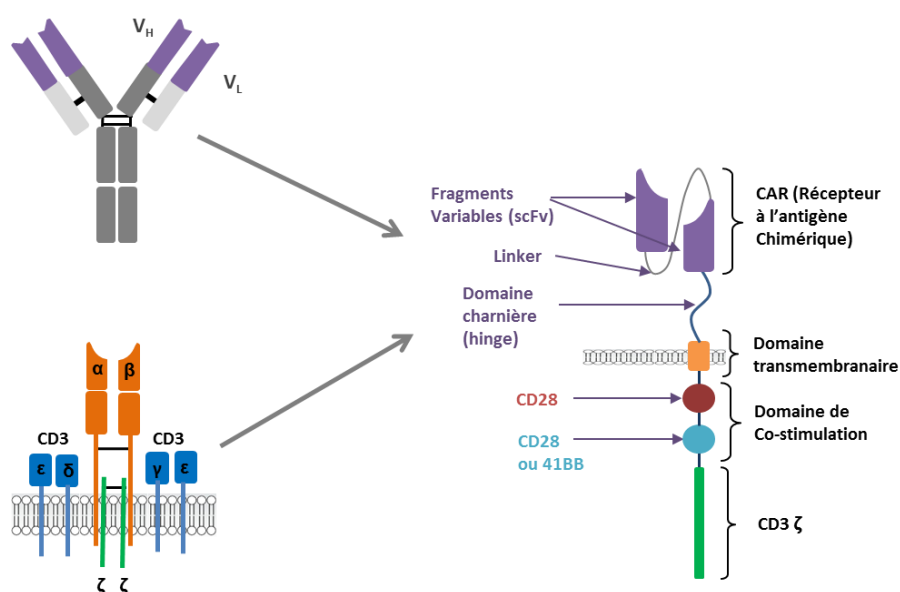


Figure 10 : Construction d'un Chimeric Antigen Receptor (CAR) [133]

La 1^{ère} génération de CAR présente un design simple avec un domaine primaire de signalisation, le CD3ζ mais leur efficacité était limitée car ils étaient parfois inactivés par les tumeurs.[47] Les CAR de 2^{ème} génération ont ensuite été développés pour pallier à cette problématique et comportent un domaine de co-stimulation CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 ou ICOS combiné au domaine CD3 ζ. A noter que CD28 et 4-1BB sont les plus fréquemment utilisés. A partir de la 3^{ème} génération, les CAR combinent deux domaines de co-stimulation pour maximiser la prolifération et la persistance des CAR in vivo. [134,135] (cf figure 11)

Depuis plusieurs années maintenant, une 4^{ème} génération de CAR également appelés TRUCK (T cells redirected for Universal Cytokine Killing) a fait son apparition.

Leur construction comprend une cassette d'expression génique inducible par le CAR permettant de sécréter des molécules de stimulation (ligands, cytokines, chemokines, gènes suicide ...) suite à la reconnaissance antigénique et permettent ainsi une meilleure persistance et une meilleure prolifération des cellules. [136]

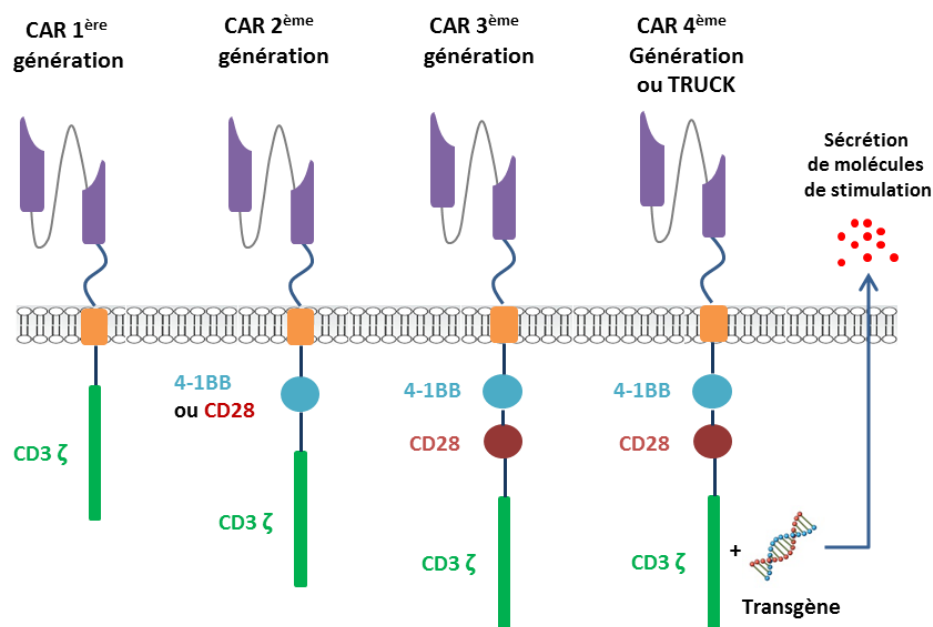


Figure 11 : Les quatre générations de structures CAR

La technologie CAR a été appliquée en premier lieu aux LT avec de nombreuses indications possibles. Les deux premiers CAR-T cells autologues commercialisés en 2018 sont : Axicabtagene ciloleucel YESCARTA® de Kite/Gilead indiqué en 3eme ligne dans le Lymphome B diffus à grandes cellules (LBDGC) et tisagenlecleucel KYMRIA® de Novartis avec pour indication le LBDGC ainsi que la LAL en 3eme ligne chez l'enfant et l'adulte jeune de moins de 25ans. A noter que YESCARTA® pourra très prochainement être utilisé en 2^{ème} ligne de traitement.

Depuis, plusieurs autres spécialités ont fait leur entrée sur le marché (Brexucabtagene autoleucel TECARTUS® de Kite/Gilead dans le lymphome du manteau et la LAL de l'adulte, Idecabtagene vicleucel ABECMA® de Celgene/BMS dans le MM, le lisocabtagene maraleucel BREYANZI® de Celgene/BMS dans le LBDGC en 2^{ème} ligne de traitement) et enfin le Ciltacabtagene autoleucel CARVYKTI® de Janssen dans le MM. [137,138]

Cependant, la production de CAR autologues présente de nombreuses limitations notamment liées au fait que ce sont des thérapeutiques très coûteuses avec une production longue pour un patient donné. La qualité de la matière première (PBMNC) et du produit fini est variable d'un patient à l'autre. Les patients s'exposent également à de nombreux effets indésirables en plus des effets indésirables liés au conditionnement notamment le SRC associé ou non à une neurotoxicité qui peuvent mettre en jeu leur pronostic vital ou même entraîner le décès. [139]

La production de CAR-T cells allogéniques « off the shelf » serait une alternative intéressante pour résoudre en partie certaines des problématiques notamment réduire les coûts et les délais de production car ils seraient disponibles à la demande. Cependant, le caractère allogénique des cellules implique une complication supplémentaire notamment une GVHD chez le receveur, pouvant mettre en jeu son pronostic vital. [140]

C'est pourquoi d'autres options ont été évaluées en vue d'adapter la technologie CAR à d'autres types de cellules (NK, Treg, T $\gamma\delta$, NKT, cellules de lignées etc). En effet, l'efficacité des CAR est à la fois déterminée par leur construction mais également par le type de cellule immunitaire utilisé.

Application aux cellules NK

Initialement l'application de la technologie CAR aux cellules NK paraissait compliquée de par leur persistance limitée dans le sang périphérique. [130] Les cellules NK connaissent actuellement un intérêt grandissant en tant que plateforme pour la production de CAR-NK allogéniques. Cela s'explique par leurs propriétés biologiques uniques à savoir leur activité cytotoxique à l'égard des cellules transformées, leur profil de tolérance favorable et la possibilité de pouvoir être produits à grande échelle, principalement en allogénique.

Les CAR-NK allogéniques représentent une alternative intéressante aux CAR-T cells car ils permettent de s'affranchir ou presque de la toxicité liée à l'alloréactivité car ils ne provoquent pas de GVHD. [141–143]

Par ailleurs ils ne sont que très rarement impliqués dans la survenue de SRC ou de neurotoxicité car ils sécrètent principalement des granzymes/perforines, de l'INF γ et du GM-CSF tandis que le panel de cytokines sécrétées par les LT notamment l'IL2, IL6 et IL10 entre autres sont clairement associés à ces toxicités. [144]

Par ailleurs, leur persistance limitée est finalement un avantage car cela permet de limiter le risque de cytotoxicité vis-à-vis des cellules saines exprimant l'antigène d'intérêt (effet dit « on target/off tumor »).

Il est possible de générer des CAR-NK à partir de cellules NK issues de plusieurs sources : [145,146] (cf figure 12)

- de lignées cellulaires (NK92 principalement)
- de sang périphérique [147]
- de sang de cordon [148,149]
- de cellules souches embryonnaires [150]
- à partir de progéniteurs hématopoïétiques CD34+ [151] ou d'IPSCs [152]

Il est important également de préciser que l'efficacité de la transduction peut différer grandement selon le type de cellules NK choisi et également selon le mode de transduction choisi.

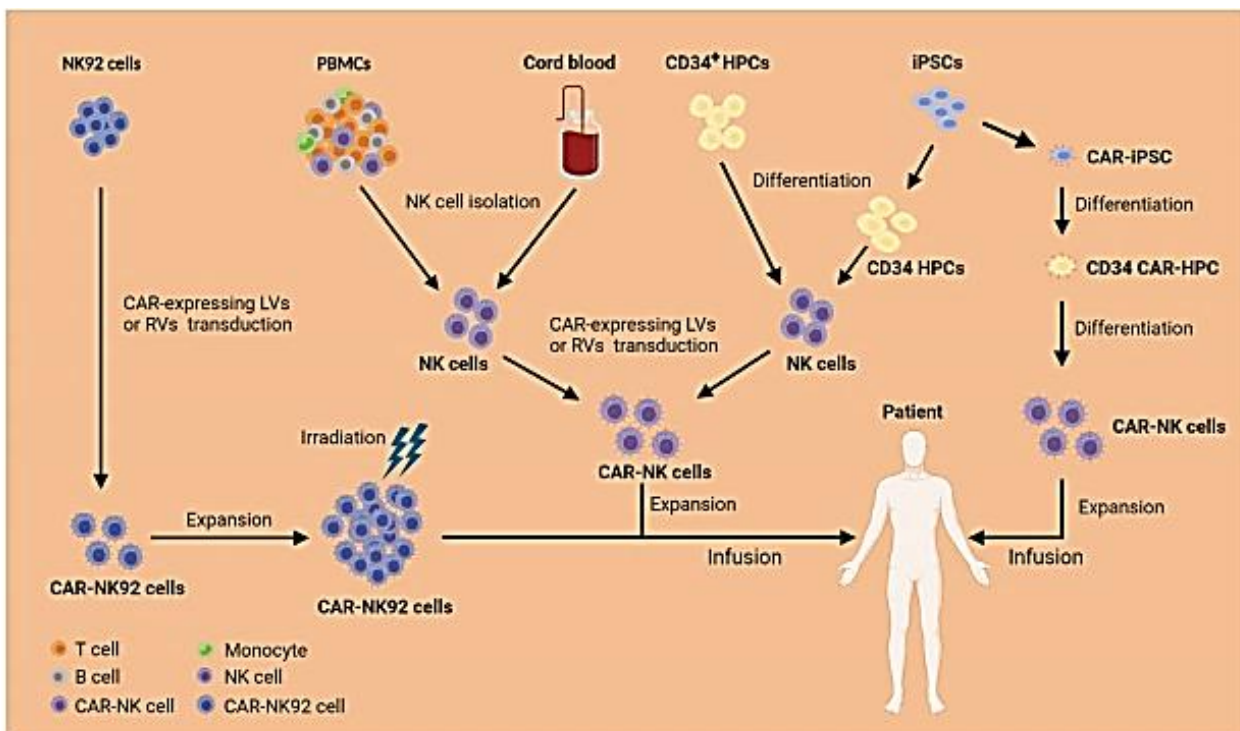


Figure 12 : Différentes sources possibles pour la fabrication des CAR-NK G. Xie et al 2020 [145]

Les premiers essais de production de CAR-NK ont été menés sur des lignées cellulaires de NK (NK-92), car elles sont capables de s'expandre de façon presque illimitée in vitro et résistent plus facilement aux étapes de congélation/décongélation répétées. [153]

Plusieurs études évaluent actuellement les CAR-NK92 de grade clinique dans plusieurs indications en oncohématologie.

La plupart des CAR actuellement étudiés possèdent un domaine intracellulaire composé d'une chaîne CD3 ζ et d'un domaine de co-stimulation CD28 ou 4-1BB. Cependant, le CD28 n'est pas exprimé par les cellules NK en temps normal.[154] Cela a souligné le besoin de créer/optimiser les domaines de co-stimulation pour adapter les CAR existants aux cellules NK.[155] Plusieurs équipes ont travaillé au développement de structures CAR spécifiques pour les cellules NK. L'utilisation de domaines de co-stimulation tels que 2B4, DAP10, DAP12, DNAM1 ou NKG2D a permis aux CAR-NK d'être plus persistants, d'augmenter leur cytotoxicité ainsi que la production de cytokines et de proliférer plus rapidement. [157,158,159]

2B4 est un récepteur activateur qui appartient au groupe des protéines SLAM (signaling lymphocytic activation molecule). Il est impliqué entre autres dans la transmission des signaux de transduction. [159] Les molécules DAP10 et DAP12 quant à elles, sont des molécules adaptatrices qui se composent d'une succession de motifs ITAM à l'origine d'un signal activateur pour les cellules NK. [159]

DAP 10 joue un rôle critique en permettant la transmission les signaux médiés par le récepteur activateur NKG2D. DAP12 quant à lui, est impliqué dans la médiation de signaux transmis par plusieurs récepteurs notamment plusieurs KIR activateurs, NKG2C et le NCR (NKp44). [160]

La figure 13 fait le résumé des structures CAR actuellement étudiées et le tableau 3 reprend les principales différences existant entre les CAR-T cells et les CAR-NK.

Plusieurs constructions CAR de 4^{ème} génération appliquées aux NK ont également été développées.[145]

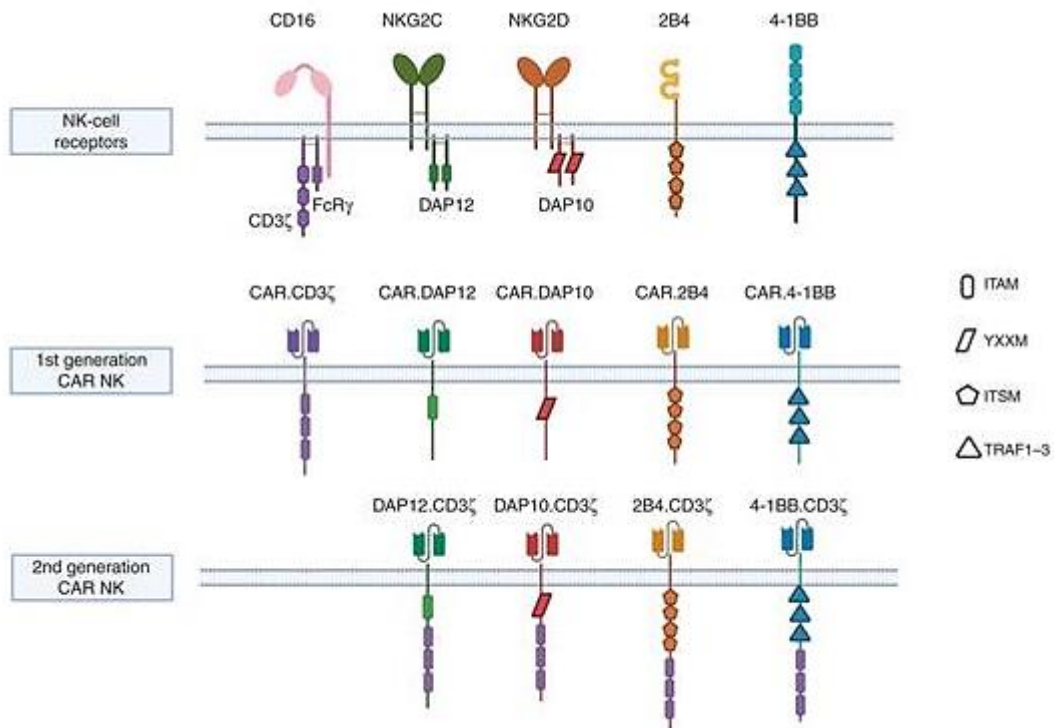


Figure 13 : Différentes générations de structures CAR spécifiques aux cellules NK – Tiré de Rezvani et al 2021 [159]

Les CAR-NK peuvent éliminer les cellules cibles grâce à la reconnaissance antigénique médiée par la structure CAR mais également de façon CAR- indépendante grâce à leur panel de récepteurs de surface et au mécanisme ADCC notamment. [145]

Tableau 3

Tableau comparatif des différences entre CAR-NK et CAR-T cells [146,161–164]

	CAR-NK	CAR-T cells
Sources de cellules	Sang périphérique / Sang de cordon / IPSC / Cellules souches embryonnaires / Cellules CD34+ / Lignées cellulaires	Sang périphérique / Sang de cordon / IPSC / ES/ Cellules CD34+
Usage	Autologue ou allogénique	Autologue ou allogénique
Mode d'action	CAR dépendant + CAR indépendant (propriétés cellulaires intrinsèques)	CAR dépendant
Techniques de production	Transfection virale (RV / LV ++) ou non virale (électroporation, lipofection/trogocytose/ nanoparticules)	Transfection virale (RV / LV) ou non virale (électroporation, lipofection/trogocytose/ nanoparticules)
Efficacité de la transfection	limitée	Satisfaisante
Autres paramètres à prendre en compte	<p>Avantages:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Absence de GVHD/CRS/ Neurotoxicité - Pas de restriction HLA <p>Inconvénients:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Faible persistance - Expansion ex-vivo limitée - Sensibilité des cellules à la congélation/décongélation (sauf pour les lignées de NK) - Faible taux de cellules NK circulantes 	<p>Avantages:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bonne tolérance à la congélation/décongélation - Expansion ex-vivo facile - Quantités importantes de LT circulants <p>Inconvénients:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Risque de GVHD - CRS/ Toxicité neurologique - Restriction HLA - Ratio cellules CD4+/CD8+ variable d'un donneur à l'autre - Rechute liée à la perte d'antigène

b) Essais cliniques évaluant des CAR-NK et principaux acteurs

A ce jour, les études évaluant des CAR-NK sont plutôt peu nombreuses par rapport à celles évaluant des CAR T cells avec au total 31 études tous statuts confondus répertoriées sur le site <https://www.clinicaltrials.gov/> (dernière consultation le 12 Octobre 2022) dont 22 avec un recrutement en cours ou pas encore ouvertes mais mises à jour récemment. Ces études sont essentiellement des études de phase I précoce, phase I ou phase I/II. (cf tableau 5 présentant les essais cliniques portant sur des CAR-NK). Ce sont essentiellement des études américaines et chinoises à promotion industrielle, avec quelques études financées par des centres hospitaliers. A noter qu'il est assez difficile de trouver des informations détaillées sur plusieurs des études chinoises.

La plupart des CAR-NK actuellement évalués en clinique ciblent des marqueurs de lignées dans des indications d'oncohématologie (CD19 / CD22 / CD33 / BCMA ou encore CD7 - CD19 étant l'antigène le plus courant). La majeure partie des essais cliniques en cours étudient des CAR-NK obtenus à partir de cellules NK issues de sang périphérique, de lignées (NK-92) et plus rarement de sang de cordon ou d'iPSC.

En novembre 2020, l'étude multicentrique NCT04623944 a débuté et évalue un CAR-NK le NKX101 développé par Nkarta ciblant le ligand NKG2DL chez des patients atteints de LAM ou de Syndrome Myélodysplasique (SMD). Une deuxième étude a débuté en 2021 NCT05020678 évaluant le NKX019 ciblant le CD19 dans les tumeurs à LB.

D'après un communiqué fait par Nkarta datant d'avril 2022², les résultats préliminaires des deux essais sont encourageants. Les deux CAR-NK n'ont pas induit de toxicités (GVHD ou SRC)

Pour NKX101, 3 des 5 patients atteints de LAM en rechute ou réfractaires traités par le régime de 3 doses à 1 million ou 1.5 millions de CAR-NK par dose sont actuellement en rémission complète (soit 60%). 2 sur les 3 patients n'ont pas de maladie résiduelle.

Pour NKX019, 5 des 6 patients atteints de Lymphome non Hodgkinien (LNH) traités avec le régime de 3 doses à 1 million de CAR-NK par dose ont répondu au traitement (83% ORR). Parmi eux, 3 sur les 6 sont en RC.

² <https://ir.nkartatx.com/news-releases/news-release-details/nkarta-announces-positive-preliminary-dose-finding-data-two-lead>

Un essai clinique de grande envergure a débuté au MD Anderson, Texas USA en 2017 (NCT03056339). Il évalue un CAR-NK allogénique dérivé de sang de cordon et ciblant le CD19 dans les pathologies lymphoïdes B. La structure CAR est classique (anti CD19-CD28-CD3 ζ) combinée avec un gène codant pour l'IL-15 et un gène suicide transduit par un vecteur rétroviral. Les résultats préliminaires de l'étude sont publiés et très encourageants. [144] En effet, l'étude permet de montrer la faisabilité du processus de production avec un délai de production d'environ 2 semaines. 7 patients parmi les 11 inclus sont entrés en RC démontrant ainsi une efficacité précoce et également la sécurité d'emploi du CAR-NK car aucun patient n'a présenté d'évènement indésirable grave (GVHD, SRC ou neurotoxicité) même en situation de KIR mismatch (cas de 5 patients inclus sur 11). Les résultats encourageants de cette première étude ont mené à une étude de phase II (NCT05020015) en partenariat avec Takeda qui a débuté en 2021 (TK-007). Cette étude évalue le TK-007 qui est un CAR-NK anti-CD19 cette fois-ci cryopréservé et est indiqué chez les patients atteints de Lymphomes B en rechute ou réfractaires.

Le CD33 est exprimé par les cellules blastiques myéloïdes chez un grand nombre de patients atteints de LAM. Les CAR-T cells ciblant le CD33 ont été responsables de toxicité importante chez les patients (SRC /Neurotoxicité) Par ailleurs, les résultats d'une étude chinoise financée par PersonGen (NCT02944162) évaluant un CAR-NK92 anti-CD33 dans la LAM a montré que l'utilisation des CAR-NK92 est sécuritaire et n'entraîne pas de toxicités liées au traitement. [165] Les CAR étaient détectables jusqu'à 1 semaine post-injection et l'efficacité anti-tumorale était modeste pour des doses totales de 5 milliards de CAR-NK injectées.

Fate Therapeutics et Century Therapeutics produisent des CAR-NK à partir d'iPSC. FT516 et FT596 sont évalués dans le traitement des patients atteints de lymphomes B en rechute ou réfractaires. FT516 a été créé de manière à exprimer un récepteur Fc CD16 non clivable afin d'améliorer la cytotoxicité médiée par l'ADCC des cellules NK.

FT596 quant à lui, a été créé de manière à co-exprimer à la fois le récepteur Fc CD16 non clivable, un CAR CD19 ainsi qu'un récepteur à l'IL-15 fusionné afin d'augmenter la persistance des NK.[166] Il est actuellement évalué dans un essai de phase I (NCT04245722).

Le processus de production utilise un vecteur lentiviral (LV). La construction du CAR comprend un gène codant pour l'IL-15 couplé au gène codant pour le récepteur à l'IL-15 permettant ainsi une production autonome d'IL-15 pour booster l'activation et la fonctionnalité du CAR-NK. Les résultats ne sont pas encore disponibles, de même que pour les autres études ouvertes.

Les données préliminaires de ces essais sont encourageantes et montrent que les patients répondent au traitement.

Century Therapeutics est sur le point de lancer son essai de phase I ELiPSE-1 (NCT05336409) évaluant CNTY-101 seul ou associé à de l'rhIL-2 SC chez des patients en rechute ou réfractaires atteints d'hémopathies à LB CD19+. CNTY-101 est dérivé des iPSC et a été conçu de manière à apporter une meilleure persistance, sécurité d'emploi (ajout d'un safety switch EGFR) et fonctionnalité aux cellules NK. L'administration de Cetuximab permet une élimination rapide des CAR-NK en cas de besoin. La carte du monde présentée par la figure 14 fait le résumé des essais cliniques portant sur des CAR-NK en oncohématologie

IDENTIFIANT NCT	DEBUT	PHASE	INDICATION(S)	CIBLE ET SOURCE DE NK	PROTOCOLE	CENTRE PROMOTEUR / SPONSOR
ESSAIS CAR NK OUVERTS n = 16						
NCT05563545	2022	I	R/R LAL	CD19	1 à 3 × 10 ⁷ CAR positive NK cells/kg	Hebei Yanda Ludaopei Hospital, Sanhe, China
NCT05472558	2022	I	R/R B Cell NHL	CD19	2.5 × 10 ⁸ à 1 × 10 ⁹ cells/kg, Dérivées de sang de cordon	Zhejiang University Hanzhou China
NCT05410041	2022	I	R/R Hémopathies Lymphoïdes à cellules B	CD19	1.0 × 10 ⁷ , 2.0 × 10 ⁷ and 3.0 × 10 ⁷ CAR positive NK cells / kg	Beijing Boren Hospital
NCT05379647	2022	I	R/R B-LAL B/ lymphome à cellules B seul ou combiné avec Rituximab in	CD19	QN-019a	He Huang, Zhejiang University
NCT05247957	2022	I	R/R LAM	NKG2D	CAR-NK dérivés de sang de cordon 2 puis 6 puis 18 × 10 ⁶ /kg à J0 et J7	Hangzhou Cheetah Cell Therapeutics Co., Ltd
NCT05008575	2021	I	R/R LAM	CD33		China Xinqiao Hospital of Chongqing
NCT05182073	2021	I/II	MM	BCMA	iNK, hnCD16/IL15RF + CD38KO + CAR BCMA +/- mAb anti CD38 (daratumumab)	Fate Therapeutics Multicentric study - USA
NCT05008536	2021	I précoce	MM	BCMA		China Xinqiao Hospital of Chongqing
NCT05247957	2021	I	R/R LAM	NKG2D	Cellules NK dérivées de sang de cordon	China Hangzhou Cheetah Cell Therapeutics
NCT05020678	2021	I	Hémopathies à cellules B	CD19	NKX019	Nkarta Multicentric study - USA/ Australia
NCT04887012	2021	I	R/R LHN à cellules B	CD19 haplo		China Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University
NCT04796675	2021	I	LLC, LNH, LAL	CD19	CAR-NK dérivés de sang de cordon Fludarabine + Cyclophosphamide + Anti CD19 CAR NK	China Wuhan Union Hospital
NCT04796688	2021	I	LLC, LNH, LAL	CD19	Fludarabine + Cyclophosphamide + Anti CD19 CAR NK	China Wuhan Union Hospital
NCT05215015	2020	I précoce	LAM	CD33/CLL1		China Wuxi People's Hospital
NCT04614636	2020	I	LAM, MM	CD38	iNK hnCD16 + IL15RF + CD38-KO +/- mAb anti CD38 (daratumumab)	Fate Therapeutics
NCT04623944	2020	I	R/R LAM ou SMD à haut risque	NKG2D	Cellules NK dérivées de sang périphérique CAR-NKG2D-OX40-CD3αζ Entre 1 to 1,5 × 10 ⁸ cellules NK administrées 2 à 3 fois par semaine (2 - 3 × 10 ⁶ /kg si < 50 kg)	Nkarta
NCT04555811	2020	I	Lymphome B diffus ou de haut grade et LLC	CD19	Cellules NK dérivées d'IPSC (hnCD16 Fc Receptor + CAR19 + IL15-RF) FT596 + Rituximab	Fate Therapeutics Masonic Center – Minnesota USA -
NCT04245722	2020	I	Lymphome, LLC	CD19	Cellules NK dérivées d'IPSC hnCD16 Fc Receptor + CAR19 + IL15-RF FT596 en monothérapie et /ou combiné à un anti-CD-20 monoclonal	Fate Therapeutics
NCT04023071	2019	I	LAM + Lymphome B	CD20	Cellules NK dérivées d'IPSC FT596 en monothérapie et /ou combiné à un anti-CD-20 monoclonal	Fate Therapeutics

IDENTIFIANT NCT	DEBUT	PHASE	INDICATION(S)	CIBLE ET SOURCE DE NK	PROTOCOLE	CENTRE PROMOTEUR / SPONSOR
ESSAIS CAR NK STATUT INCONNU n = 9						
NCT04639739	Dec 2020	Early I	NHL	CD19		China
NCT03056339	Jun 2017	I/II	B lymphoid Malignancies	CB derived CARNK ic9/CAR19/IL15	Fludarabine/ Mesna / cyclophosphamide AP1903 - CB derived CARNK ic9/CAR19/IL15	University of Texas – MD Anderson USA
NCT03940833	May 2019	I/II	R/R MM	BCMA CAR-NK derived from NK92 cell lines		Asclepius Technology Company Group (Suzhou) China
NCT02892695	2016	I/II	B lymphoid Malignancies	CD19- PCAR-119		PersonGen BioTherapeutics (Suzhou) China
NCT02944162	2016	I/II	R/R AML	CD33	CAR- pNK Cell Immunotherapy for Relapsed/Refractory CD33+ AML	PersonGen BioTherapeutics (Suzhou) China
NCT02742727	2016	I/II	Leukemia and Lymphoma	CD7	NK cells (NK-92 cell line for clinical use) are engineered to contain anti-CD7 attached to TCRzeta, CD28 and 4-1BB signaling domains.	PersonGen BioTherapeutics (Suzhou) China
NCT03690310	2018	Early I	Refractory B-Cell Lymphoma	CD19	Study of Anti-CD19 CAR NK Cells in Relapsed and Refractory B Cell Lymphoma	Allife Medical Science and Technology Co, China
NCT03824964	2019	Early I	R/R B cell Lymphoma	CD19/CD22	Study of Anti-CD19/CD22 CAR NK Cells in Relapsed and Refractory B Cell Lymphoma	Allife Medical Science and Technology Co China
NCT03692767	2019	Early I	R/R B cell Lymphoma	CD22 NK92 cell line	Study of Anti-CD22 CAR NK Cells in Relapsed and Refractory B Cell Lymphoma	Allife Medical Science and Technology Co China
ESSAIS CAR NK TERMINEES n = 1						
NCT00995137	2009	I	ALL		Genetically Modified Haploidentical Natural Killer Cell Infusions for B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia	St. Jude Children's Research Hospital

Tableau 4 : Essais cliniques classés par statut évaluant les CAR-NK en oncologie

(NB : les études avec un statut suspendu ont été supprimées de cette liste)

R/R (Resistant / Rechute) ; CB (Sang de cordon) ; ALL (Leucémie Aigue Lymphoïde) ; AML (Leucémie Aigue Myéloïde) ; MM (Myélome Multiple) ; LNH (Lymphome Non Hodgkinien) CAR (Chimeric Antigen Receptor)

CAR NK dérivés de sang de cordon



NCT03056339
NCT05092451



NCT03690310
NCT03824964
NCT03692767
NCT03824951

CAR NK dérivés d'IPSCs

NK modifiés obtenus à partir d'IPSCs



NCT04245722 (FT596)
NCT04555811 (FT596)
NCT04023071 (FT516)
NCT04614636 (FT538)
NCT05182073 (FT576)



NCT05336409 (CNTY-101)



CAR NK dérivés de NK92



NCT02892695
NCT02944162
NCT02742727

博生吉
PersonGen



NCT03940833

CAR NK dérivés de sang périphérique



NCT05020678 (NKX019)
NCT04623944 (NKX101)

Autres:

NCT00995137 (PB)

Autres:

NCT05247957 (CB)
NCT04796675 (CB)
NCT04796688 (?)
NCT05215015 (?)
NCT04887012 (PB)
NCT05410041 (?)
NCT05379647 (?)
NCT05472558 (CB)
NCT05563545 (?)



NCT05008575 (?)
NCT05008536 (?)
NCT04639739 (?)

● Essais cliniques ouverts

● Essais cliniques inactifs/statut inconnu

● Essais cliniques à venir

● Essais cliniques clôturés

CAR = Chimeric Antigen Receptor / IPSC = Induced Pluripotent Stem Cells / PB = Peripheral Blood / CB = Cord Blood

Figure 14 : Carte du monde des essais cliniques portant sur les CAR-NK

III. Autres stratégies et perspectives

Comme évoqué dans la partie précédente, de nombreuses études évaluent actuellement différentes stratégies autour du transfert adoptif de cellules NK et des cellules NK génétiquement modifiées. D'autres approches sont actuellement développées en parallèle afin d'engager l'activité des cellules NK in vivo et les rediriger vers les sites tumoraux également appelées NK cell engager (NKCE). Elles agissent soit directement sur les récepteurs activateurs ou inhibiteurs des cellules NK soit indirectement en ciblant les antigènes tumoraux ou autres cellules présentes dans le micro environnement tumoral. [167] Ces approches sont intéressantes car elles sont simples à mettre en œuvre et moins coûteuses à concevoir du fait qu'il n'y a pas besoin de faire appel à des vecteurs viraux pour un transfert génique.[110]

La perte ou la baisse d'expression des antigènes tumoraux ainsi que l'effet immunosuppresseur du microenvironnement tumoral sont fréquemment responsables de l'inefficacité des CAR-T ou CAR-NK. C'est pourquoi plusieurs équipes travaillent à développer la prochaine génération de structures CAR afin de remédier à ces problématiques.

Les technologies engageant les cellules NK (NK cell Engager (NKCE)) :

▪ Anticorps monoclonaux :

Il existe 2 grands types de stratégies engageant les cellules NK :

- Les anticorps dirigés contre des Antigènes tumoraux (TAA) sont des anticorps qui stimulent entre autres la réaction d'ADCC médiée par cellules NK lors de la liaison de la portion Fc de l'anticorps à son récepteur CD16 (FcγRIIIA) présent à la surface des cellules NK. Récemment, de nombreux anticorps ont été autorisés dans les hémopathies malignes en monothérapie ou couplés à d'autres stratégies. Le Rituximab (anticorps chimérique anti-CD20) indiqué dans le LNH a été le premier anticorps autorisé sur le marché en 1997. [168] Aujourd'hui, plus de trente anticorps sont disponibles avec des indications en oncohématologie mais également dans les tumeurs solides. [169]
- Les anticorps dirigés contre des récepteurs activateurs (CD27, CD70 ou encore SLAMF7) ou venant bloquer les récepteurs inhibiteurs (KIR / NKG2A) ou checkpoints (PD-1, TIGIT, LAG3, 4-1BB etc) exprimés par les cellules NK afin de booster leur activité anti-tumorale [167] La figure 15 tirée de la review de Chiossone L et al 2018 [167] illustre très bien ces différentes stratégies.

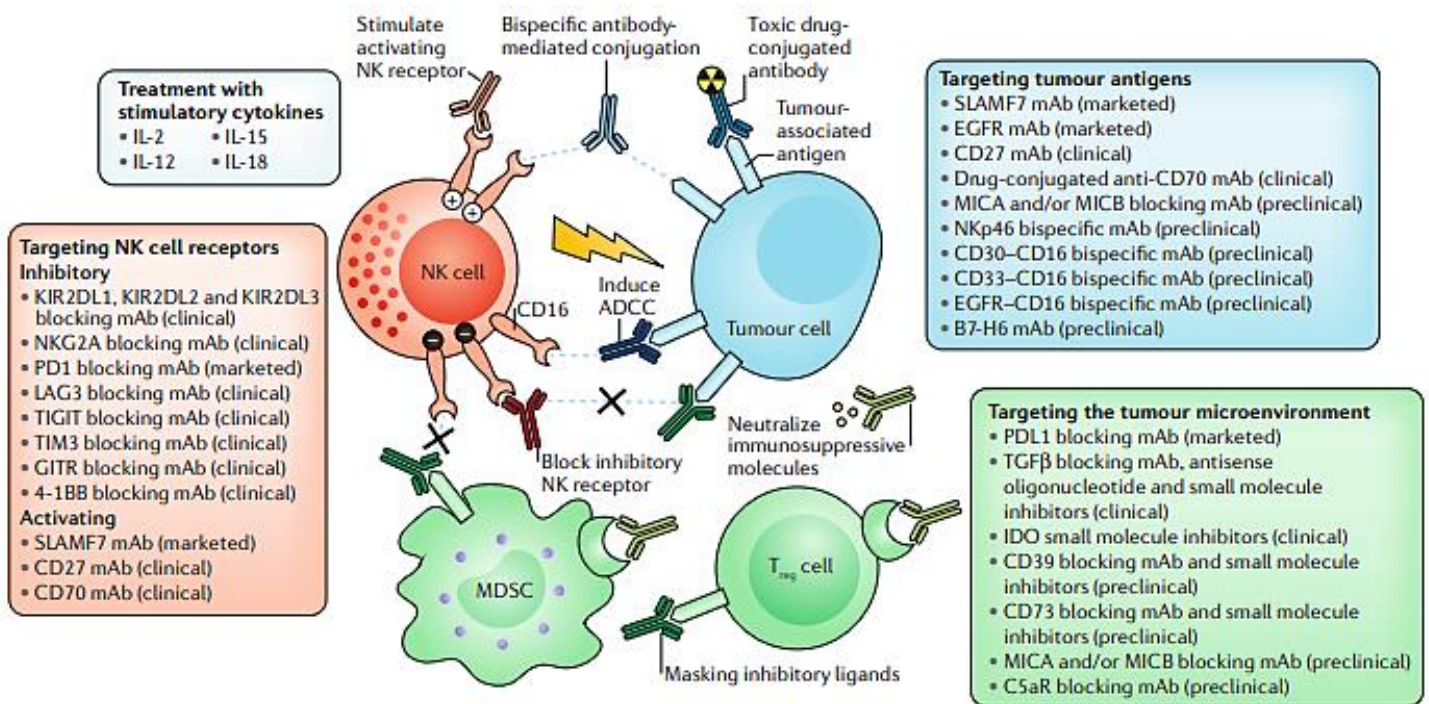


Figure 15 : Approches thérapeutiques utilisées afin de restaurer l'activité lytique des cellules NK envers les cellules cancéreuses – tirée de Chiossone L et al 2018 [167]

■ BiKEs et TriKEs et perspectives

Les BiKEs (bispecific killer cell engager) et TriKEs (trispecific killer engager) sont issus de techniques d'ingénierie innovante et facilitent l'activation des cellules NK à travers le mécanisme d'ADCC. [170] Ce sont des petites constructions moléculaires de faible poids destinées à former une synapse immunologique spécifique entre un récepteur activateur de la cellule NK et un antigène tumoral cible donné.

Un BiKE résulte de la combinaison de deux fragments variables simples (scFv) connectés à l'aide d'un linker : l'un est spécifique des cellules NK le plus souvent Fc CD16 (ou NKG2D ou un NCR) et l'autre cible de façon spécifique un antigène exprimé par les cellules tumorales (CD33, BCMA, CD30, CD19 etc).[171] (cf figure 16)

Un TriKE est construit sur le modèle d'un BiKE auquel on ajoute un troisième fragment variable simple grâce à un linker entre les deux scFv. (cf figure 16)

Les applications sont multiples et particulièrement en oncohématologie (CD33 dans la LAM/ CD19/CD20 dans les LNH / CD30 dans les lymphomes de hodgkin). [172]

AMF13 est un BiKE développé par le laboratoire Affimed destiné à des patients atteints de lymphomes CD30+ en rechute ou réfractaires. Sa sécurité d'emploi et son efficacité sont

évalués au cours d'une étude de phase I/II (NCT04074746) associé à des cellules NK mémoires induites issues de sang de cordon activées et expansées. L'association a été très bien tolérée par l'ensemble des patients inclus dans le protocole. Le taux de réponse globale est de 89.5% avec 10 RC et 7 répondeurs partiels sur les 19 patients évaluables. [173]

Le GTB-3550 (TriKE CD16/IL-15/CD33) développé par GT Biopharma a été évalué lors d'un essai clinique de phase I (NCT03214666) « preuve de concept » qui a débuté en 2017 avec pour indication les tumeurs hématologiques de haut risque exprimant CD33. Le GTB-3650 (TriKE de 2^{ème} génération utilisant la technologie de l'anticorps de camelidae avec un seul domaine et la même construction que le GTB-3550) est actuellement étudié sur des modèles pré-cliniques. Il a montré de nombreux avantages par rapport au GTB-3550 (meilleure avidité/potency) et devrait être bientôt évalué lors d'un prochain essai de phase I. [170]

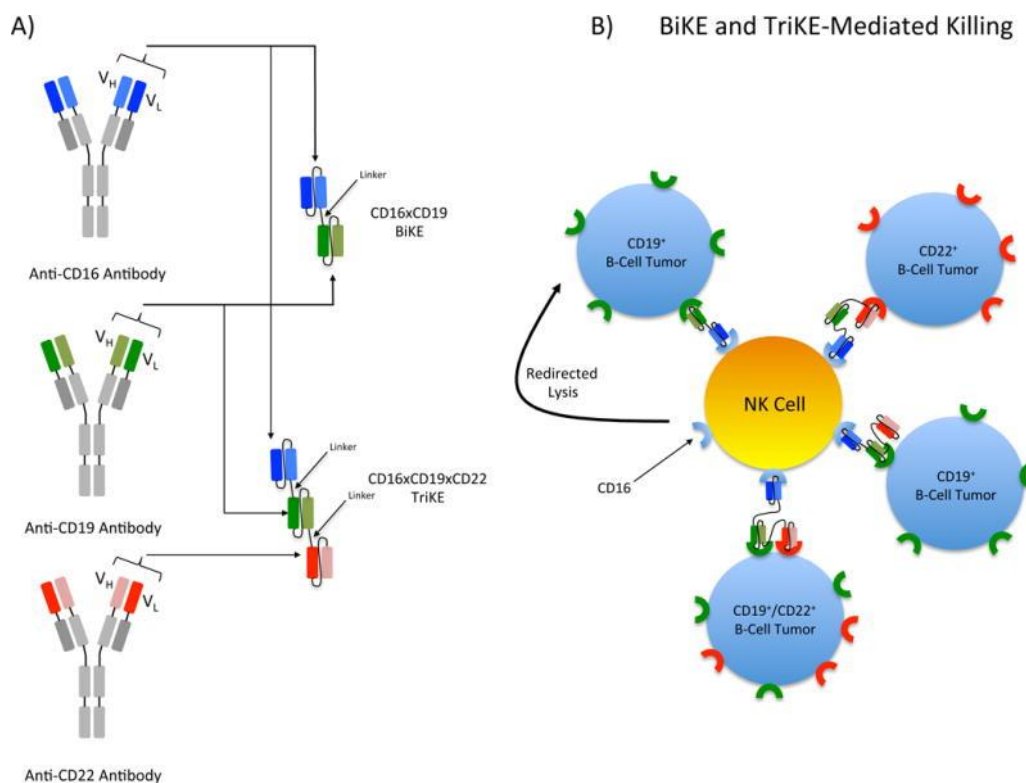


Figure 16 : Construction et mécanisme d'action des BiKEs et des TriKEs (Felices et al 2016) [171]

Des constructions tétra-spécifiques (TetraKEs) ont également vu le jour en préclinique, afin de renforcer l'activité anti tumorale des cellules NK et cibler encore plus d'antigènes simultanément. [174]

PARTIE III :

REGLEMENTATION APPLICABLE, FABRICATION DES CELLULES NK ET PRINCIPAUX ENJEUX

PARTIE III : REGLEMENTATION APPLICABLE, FABRICATION DES CELLULES NK ET PRINCIPAUX ENJEUX

En France avant 2008, les produits cellulaires fabriqués à partir de cellules NK étaient considérés par les textes règlementaires comme des Produits de Thérapie Cellulaire (PTC) et développés dans le cadre de protocoles de recherche clinique.

La fabrication des cellules NK implique des étapes d'activation, de culture et d'expansion qui utilisent des facteurs de croissance, des cytokines et autres composés ou encore des étapes d'ingénierie.

Elles subissent donc des « modifications substantielles » dans la plupart des protocoles de fabrication et ont donc le statut de Médicament de Thérapie Innovante (MTI).

Certains protocoles de recherche qui concernent un petit nombre de patients ou les protocoles de NK autologues par exemple vont être plus adaptés pour un développement de produits avec le statut de Médicament expérimental. A contrario, les MTI fabriqués à partir de cellules NK allogéniques vont plus facilement pouvoir être produits à grande échelle, communément appelés produits « off-the-shelf ».

Les changements majeurs sont d'une part que la fabrication des cellules NK ne suit plus les bonnes pratiques tissus/cellules mais bien les BPF applicables aux médicaments. D'autre part, que de tels produits peuvent obtenir une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) délivrée par l'Agence Européenne du Médicament (EMA) comme un médicament classique.

Cela implique une adaptation des laboratoires et autres structures académiques qui souhaitent produire des produits thérapeutiques répondant à ces critères, au travail dans des conditions similaires aux industries pharmaceutiques (contraintes de locaux, de personnel, habillage, contrôles environnementaux etc).

Malgré l'intérêt grandissant que suscitent les thérapies développées à partir de cellules NK, de nombreux défis restent à relever pour optimiser leur fabrication.

Cette troisième partie développera en détail dans un premier temps le cadre règlementaire applicable aux produits cellulaires en France et en Europe puis la classification des différents types de produits cellulaires. Dans un deuxième temps, seront abordés les différents enjeux inhérents au développement de MTI fabriqués à partir de cellules NK.

I. Définitions, classification des produits cellulaires et réglementation

1) Définitions et classification

Les MTI ou Advanced Therapy Medicinal Product (ATMP) en anglais appartiennent à la catégorie des médicaments biologiques³. Ils sont constitués de tissus/cellules ou gènes.

Un produit cellulaire se voit attribuer le statut de MTI s'il répond à au moins un des deux critères suivants [175] :

- Les cellules/tissus ont subi une ou plusieurs modifications dites « substantielles ⁴ » lors du processus de fabrication modifiant ainsi leurs caractéristiques biologiques ou structurelles

Et/ou

- La fonction essentielle⁵ des cellules/tissus diffère entre le donneur et le receveur.

Il n'existe pas de liste des modifications considérées comme substantielles mais une liste de modifications dites « non substantielles » disponible dans l'annexe I du règlement CE 1394/2007 [176] :

- Découpage, broyage, façonnage, centrifugation
- Trempage dans des solutions antibiotiques ou antimicrobiennes
- Stérilisation, irradiation, séparation, concentration ou purification des cellules
- Filtration, lyophilisation
- Congélation, cryoconservation, vitrification

Ce sont ces critères qui constituent la ligne de démarcation entre MTI et PTC malgré le fait que parfois les propriétés biologiques et cliniques ou l'usage attendu d'un MTI ou d'un PTC sont très proches.

³ Un médicament biologique est un produit dont la substance active est une substance biologique », c'est-à-dire « une substance qui est produite à partir d'une source biologique ou en est extraite et dont la caractérisation et la détermination de la qualité nécessitent une combinaison d'essais physico-chimico-biologiques, ainsi que la connaissance de son procédé de fabrication et de son contrôle ». Au sens de l'annexe 1 Partie I § 3.2.1.1 b de la directive 2001/83/CE du Parlement européen et du Conseil, du 6 novembre 2001, instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain, JO L311 du 28/11/2001, p. 84, sont considérés comme médicaments biologiques : les médicaments immunologiques, les médicaments dérivés du sang et du plasma, les médicaments de thérapie innovante et les médicaments issus des procédés biotechnologiques, que sont la technologie de l'acide désoxyribonucléique recombinant, l'expression contrôlée de gènes codant pour des protéines biologiquement actives dans des procaryotes et des eucaryotes, y compris des cellules transformées de mammifères, et les méthodes à base d'hybridomes et d'anticorps monoclonaux.

⁴ On entend par modification substantielle, une modification visant à « obtenir des caractéristiques biologiques, des fonctions physiologiques ou des propriétés structurelles utiles à la régénération, à la réparation ou au remplacement recherchés » [176]

⁵ On entend par modification de la fonction essentielle, le cas où les cellules sont soustraites à leur environnement initial anatomique et non utilisées pour maintenir leur fonction originelle dans ce même environnement anatomique ou histologique

On peut déduire que la plus part des protocoles utilisés en pratique pour le développement de thérapeutiques fabriquées à partir de cellules NK comprennent des étapes d'activation et/ou modifications génétiques et/ou d'amplification et que par définition ces produits ont le statut de MTI.

Les PTC correspondent à cellules/tissus n'ayant pas subi de modifications substantielles et dont la fonction essentielle est identique chez le donneur et le receveur.

Ce serait le cas de cellules NK sélectionnées mais non activées par exemple, mais dont finalement l'intérêt thérapeutique serait faible étant donné l'absence d'activation et le petit nombre de cellules obtenues.

Il est à noter qu'une succession de modifications, chacune non substantielles peut conduire à un procédé qui modifie les propriétés de cellules/tissus pouvant constituer au final une modification substantielle.

Il existe également des MTI non commerciaux évalués chez l'homme lors d'essais cliniques. Ce sont les MTI expérimentaux.[177]

L'EMA a constitué un « Committee for Advanced Therapies (CAT) » qui est en charge de la classification des MTI et de l'évaluation des dossiers de demande d'AMM des candidats MTI (qualité/sécurité et efficacité) permettant ainsi de définir clairement le cadre légal applicable à ces produits.

Il existe 4 grandes catégories de MTI détaillées plus amplement dans le tableau 5. A noter que certains peuvent avoir le statut d'Organisme Génétiquement Modifié (OGM⁶) impactant ainsi directement les conditions de manipulation et de conservation de ces thérapeutiques. Il existe 4 classes d'OGM (C1 à C4) allant du moins dangereux au plus dangereux. C'est le Haut Conseil des Biotechnologies qui est en charge du classement de ces thérapeutiques et qui donne un avis valable pendant une durée de 5 ans.

La classe de l'OGM détermine dans quelles conditions de confinement ils doivent être manipulés (locaux et chambres notamment).

⁶ Version 3.0 de Janvier 2019 du Guide de la Gestion d'une étude clinique de thérapie : Selon le code de l'environnement (Art. L-531-1) un OGM est « Un organisme dont le matériel génétique a été modifié autrement que par multiplication ou recombinaison naturelle ». La liste des modifications génétiques est détaillée dans l'article D 531-1 du Code de l'environnement.

Le règlement européen CE 1394/2007 prévoit une exception :

- L'« Hospital Exemption » en anglais se traduit en droit français par le statut de « Médicament de Thérapie Innovante Préparé Ponctuellement (MTI-PP) » (loi 2011-302 du Code de Santé Publique (CSP)). [178] Les produits concernés par l'exemption hospitalière sont des MTI fabriqués à une échelle non industrielle « de manière ponctuelle selon des normes de qualité spécifiques, et utilisés au sein d'un même état membre, dans un hôpital, sous la responsabilité professionnelle exclusive d'un médecin, pour exécuter une prescription médicale déterminée pour un produit spécialement conçu à l'intention d'un malade déterminé ». [179,180]

4 catégories de MTI peuvent être distinguées (cf tableau 5): [175,176]

CATEGORIE DE MTI	DEFINITION REGLEMENTAIRE
<p>MEDICAMENTS DE THERAPIE CELLULAIRE SOMATIQUE (sCTMP)</p> <p>Ex : CSM autologues ALOFISEL ©</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Contiennent ou consistent 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 structurales 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; <p style="text-align: center;">ET/OU</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ sont présentés 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.
<p>MEDICAMENTS DE THERAPIE GENIQUE (GTMP)</p> <p>Ex : KYMRIAH© YESCARTA © CAR-T cells autologues dirigés contre le CD19</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Contiennent une substance active qui contient ou est constituée d'un acide nucléique recombinant administré à des personnes en vue de réguler, de réparer, de remplacer, d'ajouter ou de supprimer une séquence génétique <p style="text-align: center;">ET</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Leur effet thérapeutique, prophylactique ou diagnostique dépend directement de la séquence d'acide nucléique recombinant qu'ils contiennent ou au produit de l'expression génétique de cette séquence.
<p>MEDICAMENTS ISSUS DE L'INGENIERIE CELLULAIRE OU TISSULAIRE (TEP)</p> <p>Ex : Holoclar© (Cellules épithéliales cornéennes autologues amplifiées ex-vivo contenant des cellules souches)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Contiennent des cellules ou des tissus issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire ou en sont constitués <p style="text-align: center;">ET</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Possèdent des propriétés leur permettant de régénérer, réparer, ou remplacer un tissu humain ou d'être utilisé ou administré chez l'homme dans cette finalité <p>NB: peuvent contenir des cellules ou tissus d'origine animale ou humaine ou les deux. Les cellules/tissus peuvent être viables ou non. Ils peuvent également contenir des substances supplémentaires (produits cellulaire/biomolécules/biomatériaux, substances chimiques, supports ou encore matrices),</p>
<p>MEDICAMENTS COMBINES DE THERAPIES INNOVANTES (Combined ATMP)</p> <p>Ex : MACI © (Chondrocytes autologues cultivés sur une membrane de collagène porcine)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Doivent incorporer comme partie intégrante un ou plusieurs dispositifs médicaux au sens de l'article 1er, paragraphe 2, point a), de la directive 93/42/CEE, ▪ ou bien un ou plusieurs dispositifs médicaux implantables actifs selon l'article 1er, paragraphe 2, point c, de la directive 90/385/CEE <p style="text-align: center;">ET</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Leur partie cellulaire ou tissulaire doit être constituée de cellules ou de tissus viables <p style="text-align: center;">OU</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Leur partie cellulaire ou tissulaire contenant des cellules ou des tissus non viables doit être susceptible d'avoir sur le corps humain une action qui peut être considérée comme essentielle par rapport à celle des dispositifs précités.

Tableau 5 : les 4 catégories de MTI et définitions– d'après le règlement européen 1394/2007/CE et la directive Européenne 2009/120/CE – Adapté de Boucher et Cras 2018

2) Cadre réglementaire

Des MTI :

Le règlement européen CE 1394/2007 [179] qui régle les MTI est entré en vigueur en novembre 2007. C'est une lex specialis venant modifier à la fois la directive 2001/83/CE relative aux médicaments à usage humain et le règlement n°726/2004 CE. Il a ensuite été traduit dans le droit français par deux décrets : n°2011-302 du 22/03/2011 et n°2012-1236 du 6/11/2012. Il permet de confirmer le statut de médicament des MTI et apporte une meilleure définition des critères que doivent remplir les produits cellulaires afin de se voir attribuer le statut de MTI (détaillé précédemment).

Il permet ainsi entre autre :

- D'harmoniser le cadre réglementaire de cette catégorie de produits à l'échelle européenne et de faciliter l'accès au marché de ces thérapeutiques à travers une procédure d'AMM centralisée.
- D'assurer la qualité et la sécurité de ces produits à chaque étape de leur développement avec les mêmes exigences que celles requises pour les médicaments conventionnels (production dans le respect des BPF et ensuite pour la commercialisation et la surveillance post-AMM).
- De compléter les dispositions mentionnées dans la Directive 2001/83/CE (partie IV de l'annexe I) [175] en confirmant le caractère innovant des médicaments de thérapie cellulaire somatique et des médicaments de thérapie génique en donnant une définition juridique officielle aux médicaments issus de l'ingénierie tissulaire et cellulaire et aux médicaments combinés de thérapie innovante.
- Il entraîne la création d'un comité européen d'expertise dédié pour les MTI le « CAT » en charge de la classification des MTI et de l'évaluation des dossiers de demande d'AMM des candidats MTI

Les MTI commerciaux et expérimentaux ont le statut de médicament au sens de la directive 2001/83 et doivent donc être fabriqués dans le respect des BPF décrites dans le document EudraLex volume 4 [181] conformément à la directive 2003/94/EC dans des établissements autorisés. [182] Leur distribution doit être effectuée sous la responsabilité d'un pharmacien hospitalier responsable. [177]

La régulation des MTI commerciaux se fait au niveau européen pour leur mise sur le marché et l'ensemble des étapes de suivi après obtention de leur AMM tandis que les MTI expérimentaux sont régulés au niveau national.[177]

La loi n° 2016-41 du 26/01/2016 permettra par la suite d'autoriser par dérogation dans le cadre de la recherche, les établissements de santé autorisés par l'Agence Nationale du Médicament et des Produits de Santé (ANSM) à assurer la fabrication, la distribution et l'import/export des MTI. (cf tableau 6)

Des MTI-PP :

Comme mentionné précédemment, les MTI-PP sont régulés au niveau national donc sous la responsabilité de l'ANSM et n'ont pas vocation à être commercialisés dans l'UE ni à obtenir une AMM européenne centralisée comme c'est le cas pour les MTI classiques.

A noter que chaque pays européen a transposé en droit national cette exception de manière différente menant parfois à des différences importantes entre les pays de l'UE. [183]

Les BPF applicables aux MTI-PP sont les mêmes que pour les MTI avec quelques particularités relatives à la terminologie (personne responsable MTI-PP par exemple) et une traçabilité obligatoire couvrant le prélèvement de cellules ou tissus jusqu'à l'administration au patient. En France, ils doivent être fabriqués dans des établissements autorisés par l'ANSM (décret 2012-1236) [184] et leur distribution se fait directement entre le site de production et l'unité de soins par une personne responsable. (cf tableau 6)

Des PTC :

A la différence des MTI, elles n'ont pas le statut de médicament et sont régulées au niveau européen par la directive 2004/23/CE relative aux tissus et aux cellules et en France par les articles L. 1243 du CSP.

Les règles de bonnes pratiques « tissus-cellules » relatives à la préparation, à la conservation, au transport, à la distribution et à la cession des tissus, des cellules et des préparations de thérapie cellulaire ont été définies par la décision du 27 octobre 2010 et celle du 5 mai 2017 et sont mentionnées dans l'article L.1245-6 du CSP.

De plus, les activités de préparation, conservation, distribution, cession, importation ou exportation de tissus, de leurs dérivés, des cellules et des préparations de thérapie cellulaire, issus du corps humain, utilisés à des fins thérapeutiques sont soumises à autorisation préalable de l'ANSM.

A la différence des MTI qui relèvent de la responsabilité d'un pharmacien, les PTC sont sous la responsabilité d'un personnel habilité comme le prévoit l'article R1243-12.

Avant la parution du règlement CE 1394/2007, certains produits cellulaires qui aujourd'hui auraient le statut de MTI-PP étaient produits en petits lots et distribués par des structures spécialisées : « Tissue establishments » dans la terminologie Européenne, banques de cellules et tissus ou unités de thérapie cellulaire en Français, pouvant être localisées soit au sein de sites de l'Etablissement Français du Sang (EFS), soit au sein d'hôpitaux publics ou privés (Centres Hospitalo Universitaires (CHU) /Centres de Lutte Contre le Cancer (CLCC)). [179] (cf tableau 6)

La directive 2004/23/CE [185] couvre à la fois les MTI et les PTC au sujet du don, de l'obtention et du contrôle des cellules ou tissus servant de matériel de départ pour leur production.

A noter que les directives « tissus cellules » (2004/23/CE) et « sang » (2002/98/CE) sont en cours de révision et vont être regroupées en un seul règlement (à l'exception des greffes d'organes) sous l'acronyme SOHO pour « Substances Of Human Origin ». ⁷ Ce nouveau règlement aura pour but entre autres, de favoriser l'harmonisation des pratiques au sein des différents états membres de l'UE et prévenir les pénuries d'approvisionnement.

⁷ https://health.ec.europa.eu/blood-tissues-cells-and-organs/overview/proposal-regulation-substances-human-origin_en

Le tableau 6 résume les principales différences réglementaires existant entre les MTI, MTI-PP et PTC. [175,176]

	MTI	MTI-PP	PTC
DEFINITION	<p>Les cellules/tissus ont subi une ou plusieurs modifications dites « substantielles » lors du processus de fabrication modifiant ainsi leurs caractéristiques biologiques ou structurelles ET/OU La fonction essentielle des cellules/tissus diffère entre le donneur et le receveur</p> <p><u>4 catégories :</u> Médicaments de thérapie cellulaire somatique / Médicaments de thérapie génique / Médicaments issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire / Médicaments combinés de thérapie innovante</p>	<p>Les cellules/tissus ont subi une ou plusieurs modifications dites « substantielles » lors du processus de fabrication modifiant ainsi leurs caractéristiques biologiques ou structurelles ET/OU La fonction essentielle des cellules/tissus diffère entre le donneur et le receveur + MTI-PP utilisés au sein d'un même état membre, dans un hôpital, sous la responsabilité d'un médecin pour une prescription médicale déterminée pour un produit spécialement conçu à l'intention d'un malade</p>	<p>Les cellules/tissus n'ont pas subi de modifications dites « substantielles » lors du processus de fabrication ET La fonction essentielle des cellules/tissus est la même entre le donneur et le receveur</p>
STATUT JURIDIQUE	Médicament		Tissus/ cellules
CADRE REGLEMENTAIRE	Directive 2001/83/CE Règlement 1394/2007/CE	Règlement 1394/2007/CE Loi n°2011-302	Directive 2004/23/CE Art L,1243-1 et suivants du CSP
AUTORISATION	AMM centralisée européenne (Avis CAT + CHMP)	AMM centralisée européenne Depuis le décret 2016-1536 (avant nationale)	Nationale
FABRICATION (textes applicables et structures autorisées)	BPF spécifiques MTI Eudralex volume 4 - Etablissements pharmaceutiques autorisés	BPF spécifiques MTI-PP - Etablissements pharmaceutiques / Etablissements de santé / Organisme public autorisé par l'ANSM	Bonnes pratiques tissus cellules - Unités de thérapie cellulaire (UTC)
DISPENSATION	Par un pharmacien de la PUI	Par le lieu de fabrication sous responsabilité pharmaceutique vers le lieu de soin	Par un personnel responsable de l'UTC
IMPORT / EXPORT	Autorisé	Autorisé (depuis 2016 dans le cadre de la RIPH)	Autorisé
VIGILENCE	Pharmacovigilance (Biovigilance pour le don / matériovigilance pour les DM)		Biovigilance

Tableau 6: Principales différences entre MTI/ MTI-PP et PTC

II. Fabrication des cellules NK et principaux enjeux

1) Principaux paramètres impactant la fabrication des cellules NK

a) Sources de cellules NK

Les cellules NK sont obtenues soit à partir d'un prélèvement primaire qui contient une fraction de cellules NK utilisables (prélèvements de cellules mononuclées de sang périphérique PBMNC ou USP), soit par différenciation maîtrisée in vitro à partir de CSH de sang de cordon, ou de CSE ou d'iPSC. Il existe également une dernière source possible de cellules NK issues de lignées tumorales. Chacune de ces sources de cellules NK présente des avantages et des inconvénients d'un point de vue technique nécessitant des processus d'ingénierie cellulaire afin d'obtenir le produit cellulaire final. (cf tableau 7).

▪ PBMNC

La plupart des protocoles cliniques actuels utilisent des cellules NK autologues ou allogéniques obtenues par aphérèse chez un patient ou un donneur. C'est une procédure plutôt simple à réaliser mais assez invasive et contraignante pour le patient. [186] Le nombre de cellules NK circulantes représente environ 5 à 15% du pool lymphocytaire. Les cellules NK obtenues sont à 90% CD56^{dim}CD16^{high} avec un phénotype mature, un fort potentiel cytotoxique mais une prolifération limitée in vivo.[187]

En autologue et en allogénique, les prélèvements d'aphérèse sont très variables d'un donneur à l'autre et très contaminés en autres populations lymphocytaires. Afin d'éviter les réactions de GVHD causées par les LT alloréactifs, il est conseillé de les éliminer afin d'obtenir une population de cellules NK la plus pure possible. Pour se faire, il est nécessaire de les purifier tout d'abord grâce à une première étape de déplétion immunomagnétique des cellules CD3+ puis une sélection des cellules CD56+. [188] Ceci est généralement réalisé sur des automates à l'aide de billes immunomagnétiques. Les cellules NK obtenues à partir de PBMNC servent aujourd'hui de matière première dans de nombreux protocoles actuellement évalués en clinique.

▪ **USP**

Les cellules NK allogéniques peuvent également être isolées à partir d'USP. [189] La collection d'USP est non invasive pour la mère ou l'enfant. Les cellules NK représentent environ 15-30% du pool de cellules collectées cependant, le volume est souvent assez faible.

Leur phénotype est moins mature avec une cytotoxicité moins prononcée par rapport aux cellules NK issues de PBMNC et notamment un phénomène d'ADCC moindre.[190]

Cela est compensé par un fort potentiel prolifératif permettant la production de grandes quantités de cellules NK de grade clinique. [108]

Par ailleurs, les cellules NK issues d'USP sont plus facilement en mesure de s'expandre et sont plus sensibles à la stimulation via des cytokines diminuant ainsi le besoin d'utiliser des CN pour augmenter le rendement. Certains marqueurs inhibiteurs tels que le NKG2A est plus exprimé tandis que le CD16 ou certains récepteurs KIR sont moins exprimés. [191,192] Un autre point intéressant, est que les USP contiennent naturellement des proportions moindres de LT et LB limitant grandement le risque de GVHD. C'est une source de cellules NK disponible sous forme cryopréservée dans des banques. [193]

De plus, elles peuvent être utilisées pour plusieurs types de stratégies d'immunothérapie car elles peuvent être facilement manipulées génétiquement. Le principal inconvénient repose sur le faible volume des USP qui nécessite d'en pooler plusieurs entraînant ainsi une certaine hétérogénéité entre les lots.

▪ **Cellules Souches (CSE / CSH CD34+/ IPSCs)**

Les cellules NK peuvent également être obtenues in vitro par différenciation de cellules souches. Différentes sources ont été explorées notamment les CSE, les CSH CD34+ et les IPSCs [150–152,194] Elles présentent de nombreuses similitudes avec les cellules NK primitives. Elles expriment CD56, CD16, CD94, NKG2D et les récepteurs NCR et KIR. De plus, elles sont cytotoxiques à l'égard des cellules tumorales à travers les mêmes mécanismes (sécrétion de granules lytiques, de cytokines pro-inflammatoires et contact cellulaire direct). [195]

Les CSH peuvent être obtenues à partir de prélèvements de MO, à partir de PBMC après mobilisation par G-CSF ou G-CSF + Plérixafor ou encore à partir d'USP.

Ces cellules progénitrices sont ensuite mises en culture en présence de facteurs de croissance et de cytokines et se différencient en cellules NK de phénotype mature. Ces cellules peuvent se multiplier de manière illimitée tout en restant non différenciées.[195]

La technique d'IPSC permet d'obtenir un pool très homogène de cellules NK à partir de cellules somatiques reprogrammées.[155,196] Elles ont pour avantage de pouvoir être produites en quantité importante in vitro. [197] Les cellules NK dérivées d'IPSCs ont un fort potentiel cytotoxique et sont facilement manipulables génétiquement. [198]

Cependant, elles expriment souvent faiblement le CD16 endogène limitant le phénomène d'ADCC. Cette problématique peut être solutionnée par des techniques d'ingénierie génétique. [110]

Les cellules NK obtenues à partir de CSH ou IPSC constituent d'excellentes candidates pour une utilisation off-the-shelf grâce notamment à l'amélioration des techniques d'obtention des cellules NK qui sont pleinement fonctionnelles et de grade clinique.[152] Un essai de première administration à l'homme a montré une efficacité clinique et la sécurité d'utilisation de cellules NK dérivées à partir de CSH chez des patients âgés atteints de LAM présentant une maladie résiduelle. [110] Quatre essais cliniques financés par Fate Therapeutics sont actuellement ouverts et évaluent des cellules NK obtenues à partir d'IPSC associées ou non à des anticorps anti-CD20. (cf partie II).

En 2014, la spécialité oNKord® développée par Glycostem indiquée dans LAM (Cellules NK allogéniques différenciées ex-vivo à partir de progéniteurs CD34+ issus d'USP) s'est vu accorder le statut de médicament orphelin par l'EMA. Glycostem s'est associée à Medac GmbH pour la commercialisation de oNord® en Europe et a également conclu un accord de commercialisation avec inno.N pour la Corée du Sud et le Japon. Cette thérapeutique est actuellement évaluée en Europe dans un essai clinique de phase I/II multicentrique dans la LAM et le MM.

▪ Cellules NK de lignée

Comme mentionné précédemment, il existe 7 lignées principales de cellules NK : NK92, NKG, NKL, NK-YS, KHYG-1, SNK-6 et IMC-1. [125]

La lignée NK92 est la plus étudiée et la seule évaluée dans des protocoles cliniques. Elle est sensible à l'IL-2 et prolifère en présence de faibles quantités.

Cette lignée est attractive pour plusieurs raisons :

- Elle est disponible à la demande « off the shelf » diminuant grandement les coûts liés à la logistique (transport/ typage etc).
- Il y a moins de contraintes pour les patients qui n'ont pas à subir d'aphérèses répétées pour parfois ne pas obtenir assez de cellules NK (10% des cellules du pool de lymphocytes circulants)
- Elles sont capables de se multiplier rapidement in vitro de manière exponentielle et illimitée en présence de faibles quantités de cytokines selon des protocoles reproductibles dans le respect des BPF et forment un pool homogène de cellules
- Elles résistent aux cycles de congélation/décongélation.

Cependant, l'inconvénient majeur lié à l'utilisation des cellules NK de lignée est qu'elles doivent être irradiées avant d'être réinjectées afin d'éviter toute possibilité de prolifération clonale in vivo, limitant ainsi leur fonctionnalité.[199] [200] Aussi, les patients peuvent développer des anticorps à l'égard de ces cellules. [201]

Les cellules NK de lignées présentent une expression plus élevée de récepteurs inhibiteurs (KIR) et n'expriment pas ou peu la plupart des récepteurs activateurs (CD16 / NKp44 etc).[202] De plus, du fait de l'absence de CD16, ces cellules ne sont pas en mesure d'éliminer d'autres cellules via le mécanisme d'ADCC. [110]

Toutefois, deux essais cliniques de phase I dans les tumeurs solides ont montré leur sécurité d'utilisation. [201,203]

A noter qu'elles peuvent également servir de matière première pour la production de CAR-NK et peuvent être aisément transfectées grâce à des technologies virales ou non virales pour exprimer divers récepteurs ou ligands. [202]

Le tableau 7, récapitule à partir de quelle matière première peuvent être dérivées les cellules NK avec les principaux avantages et inconvénients et les différentes manipulations nécessaires pour obtenir le produit cellulaire final .[110,146,202]

MATIERE PREMIERE	AVANTAGES	INCONVENIENTS	PROCEDES NECESSAIRES POUR OBTENIR LE PRODUIT CELLULAIRE FINAL
Sang périphérique (PBMC)	<ul style="list-style-type: none"> - Simplicité de la collecte (leucaphérèse avec ou sans mobilisation) - Phénotype mature - cytotoxicité +++ - sécurité d'utilisation 	<ul style="list-style-type: none"> - Faible concentration en cellules NK (5-15% CMN) - sélection immunomagnétique + expansion ex-vivo des cellules (coûteux + chronophage) – variabilité ++ - populations hétérogènes – donneur dépendant - non off-the shelf - difficultés pour modifications génétiques - Faible persistance in-vivo - collecte invasive 	<ul style="list-style-type: none"> → Amplification ↳ Immunosélection
ESC	<ul style="list-style-type: none"> - Production importante possible - population homogène - Standardisation possible (produits off-the shelf) 	<ul style="list-style-type: none"> - ESC difficilement accessibles (difficultés réglementaires) - phénotype immature → - processus long et coûteux 	<ul style="list-style-type: none"> ↳ Différenciation puis amplification
USP	<ul style="list-style-type: none"> - LT immatures et LB en faibles quantité (moins de GVHD) - Proportion de cellules NK plus importante (15-30%) - Standardisation possible avec production importante (expansion ++) - Sensibilité aux cytokines ++ 	<ul style="list-style-type: none"> - Faible volume - Variabilité inter donneur - Phénotype immature – Faible liaison avec les cellules cibles - Cytotoxicité limitée sans utilisation de cytokines - Collecte non invasive 	<ul style="list-style-type: none"> Sur les CSH : Différenciation puis Immunosélection et amplification Sur les cellules NK : Immunosélection et amplification
IPSC	<ul style="list-style-type: none"> - Production importante possible - population homogène et bien caractérisée - Standardisation possible (produits off-the shelf) - cytotoxicité ++ - Stabilité ++ pour des modifications génétiques 	<ul style="list-style-type: none"> - Processus long et coûteux - difficultés réglementaires - phénotype immature → - Requiert des modifications génétiques pour restaurer le CD16 et l'ADCC → 	<ul style="list-style-type: none"> ↳ Amplification ↳ Différenciation puis Immunosélection et amplification de nouveau + Modifications génétiques
NK-92	<ul style="list-style-type: none"> - facile d'accès - Production importante possible – capacités de prolifération illimitées - Pas de risque de GVHD - population homogène et bien caractérisée - Standardisation possible (produits off-the shelf) - bonne résistance aux cycles de congélation/décongélation et modifications génétiques 	<ul style="list-style-type: none"> - Sécurité : nécessité de les irradier ou tri avant réinjection - Absence de récepteurs activateurs (CD16/ NKp44) et inhibiteurs (KIR) transfection CD16 nécessaire pour restaurer l'ADCC → - expansion in vivo limitée après irradiation → - Cellules potentiellement porteuses d'anomalies génétiques 	<ul style="list-style-type: none"> ↳ Modifications génétiques ↳ Amplification

Tableau 7 : Principaux avantages et inconvénients des différentes sources de cellules NK et procédés d'ingénierie cellulaire réalisables

b) Stratégies d'expansion des cellules NK

Afin d'optimiser l'efficacité anti-tumorale des cellules NK, plusieurs paramètres sont à considérer notamment le nombre de cellules NK injectées, leur fonctionnalité mais également leur état d'activation. Pour cela, les cellules doivent passer par des étapes d'activation et d'expansion. Ceci est possible seulement si les conditions favorables sont réunies notamment grâce à des signaux de survie, de prolifération et d'activation dans le milieu de culture.

Il existe un très grand nombre de stratégies utilisées pour cela notamment des composés non cellulaires tels que des cytokines, ou encore des CN primitives ou génétiquement modifiées associées ou non à des cytokines ou autres composés ou encore des techniques alternatives inspirées des CN.

▪ Utilisation de cytokines :

Lorsque les cellules NK sont mises en présence de cytokines, elles sont activées et leur capacité de prolifération est augmentée, de même que leur capacité à sécréter à leur tour des cytokines. [204] Elles expriment également de façon plus importante des marqueurs cellulaires de cytotoxicité et des molécules d'adhésion. [205]

Plusieurs cytokines sont en mesure d'activer et de booster les propriétés anti-tumorales des cellules NK entre autres l'IL-2, IL-12, IL-15, IL-18-IL-21, IL-27, seules ou combinées in-vitro ainsi qu'in vivo. [206,207]

Nous allons parler plus en détails de l'IL-2 et l'IL-15 qui sont les deux cytokines les plus fréquemment utilisées en clinique.

L'IL-2 a été découverte il y a maintenant plus de 30 ans grâce à son rôle de facteur de croissance des LT. Son récepteur se compose de 3 sous-unités IL-2R α (CD25), IL-2R β (CD122) et IL-2R γ (CD132) également connu sous le nom de récepteur commun aux cytokines γ_c chain. [208]

Aujourd'hui, c'est l'IL-2 qui est la plus largement utilisée pour booster l'activité cytotoxique des cellules NK lors des étapes de fabrication seule ou en association avec d'autres cytokines comme l'IL-15, l'IL-18 etc. Son utilisation pour une activation in-vivo des cellules NK doit être bien encadrée car des doses importantes peuvent mener à des effets indésirables graves comme une augmentation de la perméabilité vasculaire, et des dommages organiques liés à l'activation du système contact endovasculaire touchant les tissus exprimant les récepteurs de haute affinité à l'IL-2.(IL-2R $\alpha\beta\gamma$) [209]

Il est à noter que d'autres types cellulaires expriment ces récepteurs notamment les LT et Tregs et se lient à l'IL-2 avec une plus forte affinité. Lorsque cela se produit, la prolifération et l'activation des cellules NK est inhibée. [210]

Pour faire face à ces contraintes, des formes alternatives de l'IL-2 ont été développées. Parmi les nouvelles stratégies, des « superkines » ont été conçues de façon à conférer une affinité plus importante pour la sous-unité IL2-R/IL15R β présente à la surface des cellules NK par rapport à la sous unité IL-2R α . [211] Par exemple, le laboratoire Medicenna a mis au point une IL-2 fusionnée à de l'albumine humaine recombinante lui permettant d'augmenter sa durée d'action et se lie préférentiellement au récepteur bêta des LT et cellules NK. Cette superkine également appelée MDNA11 peut de ce fait activer de façon très spécifique uniquement les cellules immunitaires d'intérêt. Elle est actuellement évaluée chez des patients atteints de tumeurs solides, seule ou en association avec un inhibiteur de checkpoint lors d'une étude de phase I/II qui a débuté en 2021 (NCT05086692). Une autre stratégie consiste en la création d'une protéine de fusion recombinante combinant la protéine NKG2D et une forme mutée de l'IL-2. [212]

L'IL-15 partage plusieurs caractéristiques communes avec l'IL-2 dans sa capacité de liaison aux récepteurs, la signalétique et l'activité biologique. Les récepteurs à l'IL-15 sont composés de 3 sous-unités : IL-15R α (CD125) à haute affinité, l'IL2-R/IL15R β et enfin la sous-unité commune de liaison aux cytokines γ_c chain. [12] L'IL-15 joue un rôle crucial dans le développement, la prolifération et l'activation de cellules NK ainsi que des cellules T CD8 mémoires. Le développement de super agonistes de l'IL-15 a permis de mimer la présentation trans de l'IL-15 aux cellules NK sans impliquer les cellules présentatrices d'antigène (CPA).

ALT-803 est un complexe résultant de la fusion de l'IL-15 et du récepteur IL-15R α . Ce complexe potentialise les fonctions des cellules NK. Il a été évalué lors d'un essai clinique de phase I (NCT01885897) débuté en 2013 dans la prévention de la rechute post greffe en oncohématologie. [213,214]

Les résultats obtenus avec l'utilisation de l'IL-2 seule sont peu concluants c'est pour cela que la plupart des protocoles aujourd'hui utilisent des combinaisons de 2 à 4 cytokines. Les taux d'expansion obtenus sont très hétérogènes mais restent satisfaisants. Ils sont bien moins conséquents que ceux obtenus avec des CN. [215]

▪ **Utilisation de cellules nourricières (CN) et dérivés :**

Il existe plusieurs méthodes d'expansion et d'activation ex-vivo des cellules NK qui utilisent des CN irradiées seules ou associées à des cytokines. Les CN apportent aux cellules NK des signaux supplémentaires pour leur activation ainsi que leur prolifération et permettent ainsi d'obtenir des taux d'expansion nettement supérieurs à ceux obtenus après une stimulation avec des cytokines seules.

Afin d'éviter tout risque de prolifération anarchique ou de contamination, les CN sont préalablement irradiées. Les plus utilisées sont les cellules K562. Ce sont des cellules issues de lignées leucémiques primitives exprimant le ligand 4-1BBL. Elles peuvent être également modifiées génétiquement pour exprimer l'IL-15 ou l'IL-21. [216,217] A leur contact, les cellules NK s'activent selon le mécanisme du missing-self car ces cellules n'expriment pas de molécules de CMH de type 1 à leur surface. Une ou plusieurs cytokines peuvent être ajoutées dans le milieu de culture et permettent de combiner plusieurs signaux d'activation pour les cellules NK et booster leur expansion. Les cellules NK mises en présence des cellules K562 peuvent atteindre des taux d'expansion très importants au-delà de 40 000 après 3 semaines de culture. [114]

D'autres CN peuvent être utilisées dans certains protocoles notamment les cellules de lignées lymphoblastoïdes transformées par le virus Epstein Barr (EBV) (EBV-TM-LCL). Cependant, les cellules K562 montrent des résultats bien supérieurs. [39]

L'utilisation de cellules K562 a permis d'améliorer significativement l'efficacité de l'expansion des cellules NK ainsi que leur pureté lors des validations précliniques. [218] Cependant, la qualification clinique de ces cellules de grade clinique reste un processus difficile en particulier du fait des incertitudes qui pèsent sur leur origine. De plus, leur utilisation soulève de nombreuses questions en matière de sécurité pour les patients quant à la présence de CN résiduelles lors des étapes de développement clinique d'un MTI. [219]

▪ **Alternatives aux CN**

Plusieurs stratégies alternatives plus sécuritaires ont émergé notamment dès 2013, avec l'utilisation de PBMC irradiées autologues utilisées comme CN seules ou combinées à des anticorps anti CD16 qui ont permis d'obtenir des taux d'expansion proches de 5000.[220,221] Il est également possible d'utiliser des dérivés cellulaires de CN (membrane, lysat etc) pour expandre des cellules NK.[222]

C'est le cas de la solution développée par Fortress Biotech (anciennement Coronado). Elle consiste à incuber sur la nuit des cellules NK avec du lysat de cellules de lignée leucémique CTV-1 (CNDO-109). Les cellules NK sont ainsi activées efficacement. Ces résultats ont donné lieu à un essai clinique de phase I (NCT01520558) évaluant les cellules NK issues de donneurs HLA-haploidentiques, incubées dans le lysat CNDO-109 chez des patients atteints de LAM en première RC.

3 des 12 patients inclus ont été en RC de façon durable. Les CNDO-109-NK ont été bien tolérées sans toxicité liée à la dose. [223]

Plusieurs équipes de recherche travaillent sur des techniques hybrides tirées des CN. Les particules PM21 par exemple, sont obtenues à partir des membranes plasmiques des cellules K562-mb21-41BBL. Cette technique a pour avantage d'être simple à mettre en œuvre, et de permettre d'expandre facilement les cellules NK périphériques. Elles ont permis d'obtenir une expansion des cellules NK d'un facteur 10^5 par rapport à la population de départ et ce en environ 28 jours. [222]

Il est possible d'utiliser des anticorps seuls ou combinés à des CN, des cytokines ou d'autres anticorps pour stimuler l'activation et maximiser l'expansion des cellules NK. OKT3 est un anticorps anti-CD3+ qui va cibler les LT et les activer pour qu'ils sécrètent des cytokines favorables à l'expansion et l'activation des cellules NK. [215]

Il est souvent utilisé en combinaison avec des PBMC autologues irradiées permettant d'observer un taux d'expansion de l'ordre de 1000. [215]

c) **Conditions de culture**

La cytotoxicité des cellules NK et le taux d'expansion atteignable sont étroitement liés au milieu de culture +/- suppléments utilisés. [224] Il est à noter que de plus en plus de milieux sont développés sans sérum animal ou humain pour l'expansion des cellules NK de grade clinique. [186] Selon la source des cellules NK, certains milieux sont plus efficaces que d'autres pour favoriser leur expansion.

Pour les cellules NK obtenues à partir de PBMNC les milieux de cultures suivants sont le plus souvent utilisés [114] :

- Rosewell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640)
- NK MACS médium (Miltenyi Biotec)
- Stem Cell Growth Medium (SCGM) de Cell Genix
- AIM-V sans sérum (Gibco/Thermofisher Scientific)
- X-Vivo sans sérum

Une étude récente a montré la supériorité du milieu NK MACS par rapport aux milieux SCGM et RPMI 1640 en matière de pureté cellulaire obtenue et également de contamination en LT du produit final [225]

Pour les cellules NK dérivées à partir d'USP une autre étude a permis de comparer plusieurs milieux de culture : RPMI 1640, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) / Ham's F-12 (Gibco) et le AIM-V sans sérum (Gibco). Le taux d'expansion obtenu pour les cellules NK était supérieur avec le DMEM/ Ham's F-12 et la cytotoxicité meilleure avec le milieu AIM-V. [224]

Les délais de mise en culture pour l'expansion des cellules NK de grade clinique sont très hétérogènes d'un protocole à l'autre. Ceux-ci peuvent aller de quelques jours (3-4 jours) à plus de 28 jours selon les stratégies. [114,226]

Pörter et al a recensé les différentes méthodes de production utilisées pour expandre les cellules NK. [227] Les cellules NK peuvent être produites en quantité importante à la fois dans des systèmes très simples tels que des poches ou des flacons de manière statique (ex:VueLife bag ®). Cependant ces solutions présentent de nombreuses limites. Les bioréacteurs permettent d'atteindre une échelle de production beaucoup plus importante et adaptée à la production de produits off-the shelf. Le G-rex® (Wilson Wolf) a permis de produire plus de 19×10^9 cellules NK dans des conditions BPF après 8-10 jours de culture. [228] Les plateformes automatisées ZRP (Zellwerk), CliniMACS Prodigy® (Miltenyi Biotec) ou encore le bioréacteur WAVE® (GE Xuri™ W25, USA) ont également permis la production de larges quantités de cellules NK de grade clinique. [227,229–231]

Aujourd'hui, il existe une nette tendance à l'utilisation de solutions automatisées permettant de travailler en système clos, pour pallier entre autres aux problématiques de biais inter opérateurs et de réduction des coûts.

d) Ingénierie cellulaire

Comme mentionné dans la partie précédente, il existe 2 types de méthodes pour modifier génétiquement les cellules NK : celles utilisant des vecteurs viraux et celles n'utilisant pas de virus. Les principaux virus utilisables sont les rétrovirus (RV), les lentivirus (LV) et les adéno associés virus (AAV). (cf figure 17) L'efficacité de la transduction est assez faible en général pour les cellules NK. Elle varie entre 30 et 40%. C'est beaucoup moins que ce que l'on peut voir avec les LT pour lesquels l'efficacité avoisine plutôt les 80%. [114] Les LV sont aujourd'hui privilégiés car plus sécuritaires (moins de mutations insertionnelles et faible génotoxicité entre autres) malgré leur potentiel de transduction inférieur aux RV. [130,232]

Les méthodes de transfection non virales sont beaucoup moins coûteuses. Il existe par ailleurs de nombreuses autres méthodes de transfection non virales notamment par électroporation d'ARNm [155,233] via l'utilisation de nanoparticules ou encore par lipofection. [39] (cf figure 17) Parmi elles, l'électroporation d'ARNm est la plus efficace sur les cellules NK et l'efficacité de transfection varie selon l'origine des cellules NK. [234] Cette méthode consiste à perméabiliser la membrane cellulaire par le biais d'impulsions électriques créant ainsi des pores afin de permettre le passage du matériel génétique à transférer.

Les cellules NK primitives peuvent atteindre une efficacité de transfection d'environ 70%, tandis que les cellules NK issues de lignées ou obtenues à partir d'IPSCs peuvent atteindre un taux de transfection supérieur à 80%. [114]

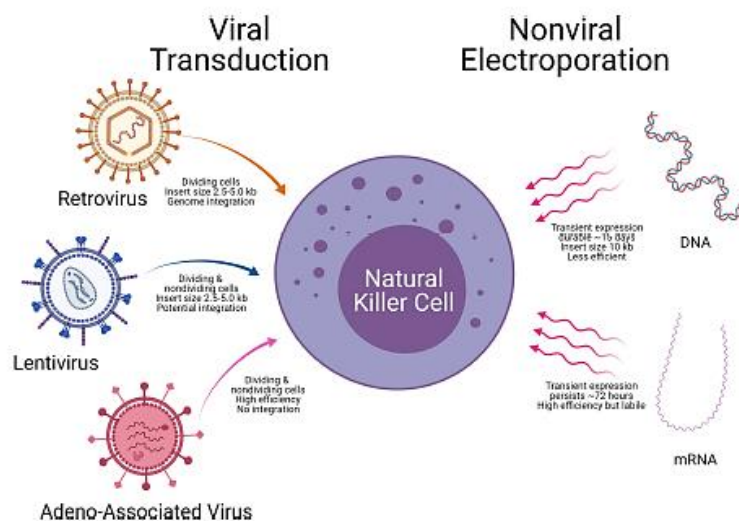


Figure 17 : Méthodes de transduction virales ou non virales des cellules NK – tirée de Heipertz et al 2021 [39]

e) Critères de libération

Afin de garantir la sécurité et l'efficacité des MTI, les nouvelles recommandations (BPF/GMP) demandent à ce que le produit final puisse clairement être caractérisé et que des critères de libération soient définis au préalable.

Dans le cas des thérapeutiques fabriquées à partir de cellules NK, cela se traduit entre autres par : [186,235]

- la quantification des cellules NK (Compte des cellules nucléées totales (CNT) et des cellules CD3-/CD56+) avec un seuil minimum à atteindre selon les doses de cellules NK prévues par le protocole
- détermination de la viabilité cellulaire avec un seuil acceptable souvent fixé à 70%
- détermination de la pureté cellulaire avec la mesure de la contamination en cellules CD3+ (LT/LB et notamment les LT qui peuvent causer une GVHD).
- Fonctionnalité cellulaire (cytotoxicité)
- Stérilité et détection d'endotoxines et de mycoplasmes négatifs
- +/- Analyse phénotypique plus étendue si besoin (expression de certains biomarqueurs d'intérêt etc)
- +/- Absence d'anomalies cytogénétiques induites pendant les étapes de culture
- +/- Pour les protocoles impliquant des CAR-NK : efficacité de la transduction / dosage des CAR-NK / contrôles de stérilité / tests fonctionnels spécifiques

Historiquement, les études menées dans le cadre de la greffe de CSH haploidentique ont permis de déterminer un seuil maximal de LT autour de 10^5 LT/kg. Aujourd'hui, la majorité des protocoles utilisant des cellules NK allogéniques ont fixé le seuil maximal acceptable de contamination en LT à 1% dans le produit final et $< 10^5$ LT/kg injectées au patient. [235] D'autres marqueurs cellulaires peuvent être recherchés afin d'identifier éventuellement des sous catégories de cellules NK (CD16 / NKG2D / NCR etc).

Les tests fonctionnels font également désormais partie intégrante des critères de libération car ils permettent de connaître quelle est la proportion de cellules NK activées disponibles dans le produit cellulaire mais également de détecter un « épuisement » des cellules dans certains cas. Historiquement, le test de cytotoxicité de référence pour les cellules NK est le test de relargage au Chrome. Le chrome (^{51}Cr) radioactif permet de marquer les cellules cibles et de détecter le ^{51}Cr radioactif relargué par ces cellules dans le surnageant. Il est de moins en moins utilisé du fait des contraintes réglementaires en matière de manipulation des composés radioactifs et des

contraintes horaires pour sa réalisation (durée d'environ 4h). D'autres solutions alternatives existent et permettent de mesurer directement l'activité cytotoxique des cellules NK à l'encontre des cellules cibles. La plupart d'entre eux sont basées sur la cytométrie en flux avec une analyse rapide possible par comparaison du nombre absolu de cellules cibles viables avant et après incubation avec les cellules NK. [236] Les critères de libération sont à distinguer des contrôles qualité en cours de production qui sont des contrôles réalisés afin d'adapter la production si besoin de manière à respecter les spécifications.

2) Principaux enjeux

L'utilisation de cellules NK en tant que matière première pour la production de MTI n'est pas si aisée. Malgré les progrès réalisés au fil des années et l'intérêt grandissant de l'industrie pour cette population cellulaire, plusieurs difficultés restent non résolues. La production de quantités importantes de cellules NK fonctionnelles représente toujours une des principales difficultés rencontrée par les équipes travaillant avec cette population de cellules. Comme mentionné précédemment le taux d'expansion des cellules NK varie entre autre en fonction de la source de cellules NK choisie mais également selon le protocole utilisé.

Déterminer une dose optimale ainsi que le ou les temps d'injection de cellules NK pour un protocole donné sont également des points faisant souvent l'objet de débats ; cela dépend de la quantité de cellules NK que la structure peut produire. De plus, les thérapeutiques développées à partir de cellules NK actuellement évaluées en clinique utilisent des protocoles d'injections très variables avec doses de cellules NK très hétérogènes. Plusieurs paramètres doivent être pris en compte notamment l'indication thérapeutique, le conditionnement du patient, la compatibilité HLA ou encore la source des cellules NK. [237]

Afin de rendre possible l'utilisation des cellules NK en tant que produits off-the-shelf, il est nécessaire de réfléchir à leurs modalités de conservation. A ce jour, les protocoles de cryopréservation et de décongélation des produits fabriqués à partir de cellules NK sont très hétérogènes. Après décongélation, la viabilité des cellules NK est diminuée, l'expression des récepteurs membranaires et l'activité des cellules NK moins importantes. [226] Il faut alors anticiper cette perte de fonctionnalité et de quantité de cellules en adaptant le protocole de congélation et congeler plus de cellules. Les protocoles cliniques utilisant des cellules NK fraîches restent cependant les plus répandus. Les cellules NK92 permettent de s'affranchir de cette contrainte car elles résistent très bien aux cycles de congélation décongélation. [200]

PARTIE IV :

TRAVAIL EXPERIMENTAL

INTRODUCTION

Entre 2013 et 2017, un essai clinique de phase I a été mené au sein de l'Institut Paoli Calmettes (NCT01853358) visant à évaluer la sécurité d'utilisation en post-allogreffe de plusieurs injections de cellules NK (Donor Leukocyte Infusions = DLI-NK) dans le but de prévenir ou de traiter les rechutes dans plusieurs pathologies en oncohématologie en substitution aux injections de lymphocytes (DLI) actuellement réalisées en routine.

Cet essai a permis de montrer que l'injection de cellules NK allogéniques en post-allogreffe activées par de l'IL-2 était bien tolérée par les patients d'un point de vue clinique et biologique. Les résultats de cet essai ont été publiés en 2021.[238]

Cependant, plusieurs difficultés techniques ont été rencontrées notamment le faible rendement en cellules NK rendant difficile la production de toutes les doses initialement prévues par le protocole pour 5 patients sur les 16 inclus.

Par ailleurs, la plupart des étapes du processus de production étaient réalisées en manuel et de nombreux aspects de ce protocole ne sont plus conformes aux nouvelles exigences réglementaires.

Comme mentionné précédemment, avec l'entrée en application en 2011 du règlement européen de 2007, les DLI-NK qui avaient auparavant le statut de PTC ont aujourd'hui le statut de MTI et doivent donc être produites dans le respect des BPF. De plus, dans l'ère de l'automatisation des procédés de production, il est également possible de réduire grandement le temps de personnel mobilisé pour de tels protocoles.

Ce travail de thèse visait donc à optimiser et automatiser le processus de sélection, d'activation et d'expansion de cellules NK dans la perspective d'un futur essai clinique de phase I/II en partenariat avec le laboratoire Miltenyi Biotec.

Plusieurs tests de validation ont pu être menés sur le CliniMACS Prodigy® entre 2018 et 2020. 7 tests de validation au total ont été réalisés dont les résultats sont présentés ci-après.

En 2020 avec l'arrivée du COVID-19, les tests ont dû être stoppés pour des raisons de ressources financières insuffisantes et de difficultés dans la coordination des équipes cliniques et de l'équipe du CTC.

I. MATERIELS ET METHODES

1/ Matière première

Les cellules NK étant disponibles en quantité limitée, le CTC a acheté auprès de l'EFS, des culots leuco-plaquettaires frais issus de sang périphérique de donateurs volontaires non mobilisés ayant signé un consentement pour l'utilisation de leur sang pour des besoins liés à la recherche. Un concentré leuco-plaquettaire contient des cellules mononuclées, des plaquettes et les cellules NK représentent 5 à 15% des cellules totales. Ils ont ensuite été poolés afin d'obtenir une quantité suffisante de cellules NK.

2/ Purification et expansion de cellules NK

● CliniMACS Prodigy® :

Le CliniMACS Prodigy® (cf figure 18) est une plateforme automatisée commercialisée par le laboratoire Miltenyi Biotec. Elle permet de produire des produits cellulaires dans un environnement clos et de manière standardisée à partir d'un produit cellulaire de départ jusqu'au produit final. La plateforme propose de multiples fonctions telles que le lavage, la sélection des cellules grâce à une colonne immunomagnétique, la concentration, la collecte et également la mise en culture. Elle permet ainsi d'obtenir des produits conformes aux BPF. [239]

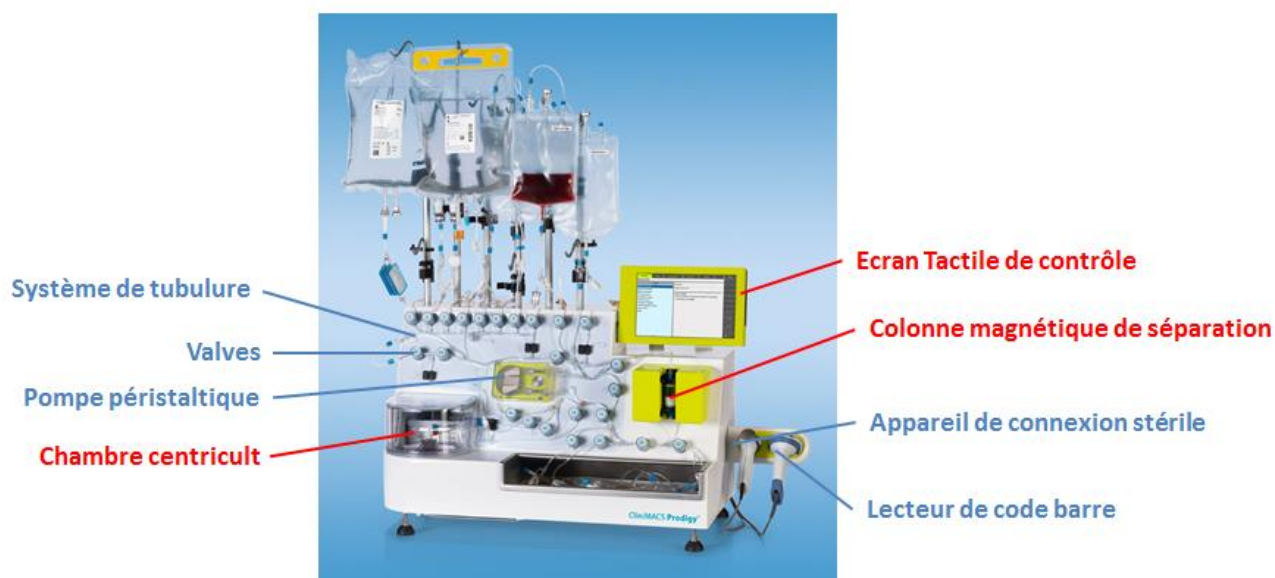


Figure 18: Le CliniMACS Prodigy® – illustration traduite tirée de <https://www.miltenyibiotec.com/FR-en/products/clinimacs-prodigy.html#gref>

■ **Etape 1: Déplétion des cellules CD3+ et sélection CD56+ des cellules NK sur le CliniMACS Prodigy®**

La sélection des cellules NK est réalisée grâce à un processus de séparation cellulaire séquentiel utilisant des billes immunomagnétiques : les cellules CD3+ sont déplétées suivi d'une sélection positive des cellules CD56+. Des billes immunomagnétiques sont ajoutées dans la suspension cellulaire lors de l'étape de déplétion pour une période d'incubation définie.

Par la suite, les cellules en suspension vont passer à travers un champ magnétique et les cellules CD3+ vont être retenues par la colonne magnétique. Les cellules CD56+ sont ensuite marquées et isolées grâce à la même technique mais à l'aide d'une nouvelle colonne adaptée.

Des kits stériles à usage unique sont utilisés pour le CliniMACS Prodigy® à chaque étape. A noter que Miltenyi Biotec a mis à jour le logiciel du CliniMACS Prodigy® après les 3 premiers tests car plusieurs anomalies ont été mises en évidence (variations importantes de pression notamment). Le protocole a ainsi été optimisé et un nouveau kit de tubulures stériles a été utilisé pour les tests de validation suivants. (cf : ci-dessous le tableau 8 des principaux composants)

Matériel de départ pour la déplétion CD3 : 2 culots leucoplaquettaires de donneurs sains poolés pour atteindre le taux minimal requis de globules par le protocole

Matériel de départ pour la sélection CD56 : poche de cellules déplétée en cellules CD3+

■ **Etape 2: Expansion des cellules NK**

Le CliniMACS Prodigy® permet à l'opérateur de programmer à l'avance plusieurs opérations à des temps définis pendant l'étape de culture (Changement de milieu/agitations/ ajout de cytokines etc). (cf photo en annexe 1a) La chambre de culture (= centricult chamber) (cf photo en annexe 2a) est fournie pour chaque kit à usage unique. Elle permet de maintenir les cellules en système clos dans des conditions de culture stables (température / pression CO₂...) similaires aux incubateurs traditionnellement utilisés.

De plus, elle permet également de centrifuger les cellules grâce à un système de tubing permettant d'enlever le surnageant et de collecter les cellules. Ceci est rendu possible grâce à un capteur intégré qui détecte de façon très fine la limite entre le surnageant et le culot cellulaire. Il permet donc de diminuer la variabilité inter-opérateur très marquée lorsque ce process est effectué manuellement. Les cellules NK sont mises en culture pour une période de

14 jours pendant laquelle elles vont entamer une phase d'expansion. Sauf intervention d'un opérateur, 100 x 10⁶ cellules NK sont nécessaires pour démarrer le process.

Elles sont mises en culture dans du NK MACS Medium (Miltenyi biotec) de grade recherche auquel on ajoute du sérum AB humain (Grade GMP), 500 UI/ml rhIL2, 140 UI/ml rhIL15 (Premium Grade) à 37°C et à 5% de CO₂.

Le paramétrage est au départ saisi manuellement sur l'automate ; ensuite des détecteurs permettent de monitorer le maintien de ces conditions pendant toute la durée du process. L'opérateur peut paramétrer des opérations en amont de la mise en culture et même en cours de process (changement de medium /agitations / ajout de cytokines etc) et la chambre de culture est reliée à une poche contenant du milieu et à une poche déchet.

Le suivi de l'expansion cellulaire en cours de process est possible grâce à la présence sur le kit du dispositif d'échantillonnage. Des échantillons de 3mL ont été prélevés à J7, J10 et J14 (cf photo du dispositif en annexe 1b) sur lesquels sont effectués les contrôles qualité (compte cellulaire, cytotoxicité, viabilité, pureté notamment). Le CliniMACS Prodigy® est également doté d'une caméra permettant à l'opérateur de visualiser en temps réel le milieu de culture et de prendre des photos. (cf photo en annexe 2b) Ce dispositif est un outil de permettant une traçabilité améliorée des conditions de culture.

Tableau 8 : Différents composants utilisés lors des deux séries de tests

1 ^{ère} série de tests (1 à 3)	2 ^{ème} série de tests (4 à 7)
<ul style="list-style-type: none"> - 1 kit unique pour la déplétion CD3 et la sélection positive des cellules CD56 - 1 kit pour la culture cellulaire - PBS/EDTA Buffer - Médium NK MACS (Usage pour la recherche)) - Additif NK MACS (Grade GMP) - réactifs CD3/CD56 (Grade GMP) - IL2/IL15 humaines recombinantes (Premium Grade)⁴ - Sérum Humain AB (VWR) (Grade GMP)⁵ - Albumine - IgG (utilisée avant l'ajout des billes) 	<ul style="list-style-type: none"> - 1 kit unique pour la déplétion CD3 - TS 310 - 1 kit unique pour la sélection positive CD56 et la mise en culture - TS 520 - PBS/EDTA Buffer - Médium NK MACS (Usage pour la recherche)⁸ - Additif NK MACS (Grade GMP) - réactifs CD3/CD56 (Grade GMP) - IL2/IL15 humaines recombinantes (Premium Grade)⁹ - Sérum Humain AB (VWR) (Grade GMP)¹⁰ - Sérum Humain AB (Sigma) Test n°5 (Grade GMP)⁵

⁸ Le médium NK MACS est aujourd'hui disponible au grade GMP

⁹ IL-2 and IL-15 humaines recombinantes (Grade GMP): Ces cytokines sont utilisées pour activer les cellules NK et permettre ainsi leur survie et leur prolifération. Elles jouent également un rôle dans les interactions des cellules NK avec les autres effecteurs cellulaires de l'immunité. [205]

¹⁰ Sérum Humain AB (Grade GMP): Le Sérum Humain AB est obtenu à partir de donneurs volontaires sains. Il est ajouté au medium afin d'optimiser la prolifération cellulaire.

3/ Contrôle qualité (CQ)

■ Contrôles quantitatifs

Le CliniMACS Prodigy® permet d'effectuer une séparation séquentielle à l'aide de billes magnétiques. En premier lieu, les cellules CD3+ sont déplétées puis les cellules CD56+ sont sélectionnées.

Entre chaque étape, des CQ in process/intermédiaires sont effectués :

- compte cellulaire (CD45, CD3, CD56, CD16, viabilité et contrôle de la stérilité).
- Mesure de la contamination en LT du produit initial et après le processus de purification afin d'éviter au maximum le risque de GVHD pour les patients.

Cela permet également de déterminer l'efficacité avec laquelle les cellules CD3+ sont déplétées le rendement de la sélection des cellules CD56+ et également de calculer l'index de log T cell déplétion (logarithme décimal du nombre total de cellules CD3+ dans le produit final divisé par le nombre de cellules CD3+ présentes dans le produit de départ).

CQ effectués à J0, J7, J10 et J14 :

- compte des cellules mononuclées total effectué sur le Sysmex XP 300 (automate d'analyse utilisé en immunohématologie)
- Numération des cellules CD3+ et CD56+ grâce à une méthode de numération simple plateforme (lyse no-wash) (Réactifs/ logiciel et cytomètre de flux de la marque Beckman Coulter Immunotech). Des anticorps IO de détection sont mélangés à l'échantillon. Après l'incubation, une solution de lyse est rajoutée afin de lyser les érythrocytes puis sont rajoutées à l'échantillon des fluorosphères Flow count permettant de faire un compte absolu en cellules sur le cytomètre de flux.
- L'acquisition et l'analyse des données sont réalisées sur FC500 (cytomètre de flux utilisant le logiciel clinique CXP). A noter que cette méthode a été validée selon les critères de la norme ISO 15189 et accréditée par le Comité Français d'Accréditation (COFRAC)

A la fin des 14 jours, les cellules NK sont collectées et des CQ sont réalisés sur le produit final. (Comptes cellulaires, viabilité cellulaire, pureté, contamination en cellules CD3+).

■ Contrôles qualitatifs

L'activité cytotoxique des cellules NK est évaluée grâce à un test quantitatif de cytotoxicité également appelé test fonctionnel : Test PanToxilux (OncoImmunitin). Ce test permet de quantifier la capacité des cellules NK à induire l'apoptose de cellules cibles grâce à la cytométrie en flux. Les cellules cibles utilisées sont des cellules de lignée K562 (ATCC® CCL-243™) n'exprimant pas les molécules de CMH de type I.

Méthodologie :

Les cellules cibles sont incubées en présence de réactifs :

- TFL4 (APC λ excitation (ex): 633 nm, λ émission (em): 657 nm – Marqueur de surface protéique intracellulaire)
- NFL1 (FITC λ_{ex} : 488 nm, λ_{em} : 6520 nm – Marqueur de viabilité)

Elles sont ensuite lavées et re-suspendues dans un wash-buffer avant d'être mises en présence de cellules NK fraîches du substrat pour les Granzymes B et la caspase 8.

Afin de mieux évaluer la fonctionnalité des cellules NK, différents ratio de cellules effectrices (NK) / cellules cibles (K562) (Effector to Target ratio E:T) ont été testés:

Ratio 5 :1 (5 cellules NK pour 1 cellule K562) et 1 :1 à J0, J7 , J10 et J14.

Les cellules sont ensuite lavées et re-suspendues avant de lancer l'acquisition sur le cytomètre de flux. Le test permet de détecter la recapture du Granzyme B par les cellules cibles et ainsi l'initiation de la cascade de signalisation apoptotique. Le clivage du substrat par la caspase 8 crée une réaction de fluorescence dans les cellules cibles qui peut être quantifiée par cytométrie en flux et permet de mesurer la cytotoxicité des cellules NK.

II. RESULTATS/ DISCUSSION

1) Optimisations réalisées :

La fabrication de cellules NK dans le but de produire des doses de DLI-NK requiert plusieurs étapes incluant la purification cellulaire, l'activation, la mise en culture et enfin l'expansion. [240]

Rappel du processus utilisé lors de l'étude de phase I et résultats : [238]

Les cellules NK étaient obtenues à partir de CMN périphériques collectées par aphérèse chez des donneurs sains génoïdétiques à l'origine du don de CSH lors des greffes. La sélection immunomagnétique des cellules NK (CD3+ déplétion et CD56+ sélection) se faisait sur le CliniMACS Plus® (Miltenyi Biotech)

Le rendement de cellules NK récupérées était de 59% [min-max : 40-85%] avec une pureté médiane de 95% [min-max : 80-99%]. Elles étaient ensuite activées grâce à de l'IL-2 1000 UI/ml (Proleukin, Chiron, corp.) et mises en culture dans des poches en conditions de culture statiques à 37°C/ 5% CO₂ pendant 7 jours dans du RPMI 1640 et 10% de Sérum de veau fœtal (SVF). Les cellules NK étaient ensuite administrées en frais entre J+60 et J+120 post allogreffe. En cas de non atteinte de la dose attendue de cellules NK, l'intégralité des cellules étaient administrées au patient.

Les critères de libération étaient : Cellules nucléés Totales (CNT) > 70% / test de contamination microbiologique négatif / concentration en cellules CD56+ pour la dose 1 $\geq 1 \times 10^6$ /kg / pour les dose 2 et 3 $\geq 5 \times 10^6$ /kg / contamination en cellules CD3+ < 5×10^4 /kg. (Stratégie d'escalade de dose)

La dose médiane de NK obtenue au final était de 4.8×10^6 / kg [min-max : 1.2-11.3] avec une pureté cellulaire de 95% [75-99%] et une contamination en cellules CD3+ de 0.4×10^4 /kg [0-1.5].

Nouveau processus :

Le CTC a été choisi par Miltenyi Biotec pour être un centre pilote et participer à validation des programmes de sélection et d'expansion des cellules NK sur le CliniMACS Prodigy®. Cet appareil permet de travailler de manière complètement automatisée en système clos. [239] Miltenyi Biotec a ainsi fourni l'ensemble des réactifs et consommables au CTC et en contrepartie des données générées et du gain d'expérience acquise pendant les tests afin d'optimiser le processus.

D'après les recommandations actuelles de l'ANSM, il est demandé qu'un minimum de 3 tests de validation consécutifs dans des conditions identiques soient réalisés pour constituer un dossier de validation de processus. Cependant cela soulève plusieurs difficultés notamment liées au fait qu'il est difficile d'un point de vue éthique d'accéder à la matière première (tissus/cellules) pour des essais de validation. C'est pourquoi, il est attendu que soit prise en compte dans l'examen des demandes, la quantité de cellules/tissus disponible et les équipes doivent tirer parti au maximum des échantillons disponibles.

Comme mentionné dans la partie matériels et méthode, les cellules NK ont été obtenues à partir de concentrés leucoplaquettaires poolés. Cela permet ainsi d'avoir une population de cellules NK plus importante au départ et de se rapprocher au mieux de la concentration en cellules NK d'une leucaphérèse. La stratégie d'expansion utilise l'IL-2 mais cette fois ci combinée à de l'IL-15 sans cellules nourricières permettant ainsi de maximiser l'activation des cellules NK. Le milieu de culture est composé du milieu NK MACS et de sérum AB humain (grade clinique). En effet, l'utilisation du SVF en clinique est de plus en plus controversée et plusieurs alternatives existent aujourd'hui dont le sérum humain. [241] De plus, les résultats obtenus avec le NK MACS montrent que les taux d'expansion des cellules NK obtenus et la pureté cellulaire sont supérieurs à ceux obtenus avec d'autres milieux de culture. [225]

Les conditions de culture ont également été optimisées. Le CliniMACS Prodigy® dispose d'une chambre de culture (centricult chamber) dans lequel les cellules vont rester pendant 14 jours. Il est possible de programmer en amont les temps de changement de milieu de culture et de monitorer en temps réel la température et la pression ainsi que le % de CO₂.

Lors du précédent protocole, il était impossible de procéder à des CQ en cours d'expansion. Grâce aux kits du CliniMACS Prodigy®, le suivi de l'expansion cellulaire peut se faire en cours de protocole grâce à la présence sur le kit de plusieurs dispositifs d'échantillonnages (cf contrôles qualités réalisés et tableau 9)

Les recommandations actuelles préconisent de mettre en place des tests de fonctionnalité afin d'attester que les cellules réinjectées au patient sont bien fonctionnelles. [242]

Le test de référence pour les cellules NK est le test de relargage au Chrome. Cependant il n'est pas possible de réaliser ces tests dans notre laboratoire car nous ne sommes pas équipés ni formés pour la manipulation d'éléments radioactifs. [243]

Nous avons donc utilisé le test Pantoxilux (détaillé dans matériel est méthode) permettant d'évaluer le pourcentage de cellules entrant en apoptose ce qui reflète le potentiel cytotoxique des cellules NK par cytométrie. De plus, le test de relargage nécessite environ 4h de temps de technicien et le test Pantoxilux environ 20min ce qui est également un élément intéressant à prendre en compte.

Par ailleurs, la durée effective de travail sur le CliniMACS Prodigy® au J0 est de 8h comme lors de l'étude de phase I, cependant le temps effectif en présentiel a été largement réduit et n'est plus que de 2h environ (hors incidents pouvant survenir en cours de process – système d'alarme mis en place). (Cf tableau 9)

Il est à noter que le coût de réalisation d'un test de validation (temps de technicien / kit prodigy et réactifs) avoisine les 10 000 €. Le partenariat avec Miltenyi Biotech a permis de financer en grande partie ces tests de validation tout en formant le personnel technique à l'utilisation de cet automate. Le coût des kits et des consommables pour de futurs protocoles et la validation des process est un facteur très limitant pour les structures académiques.

Un nouveau seuil de contamination en cellules CD3+ acceptable ainsi que les doses de cellules NK et le timing des injections restent à établir en concertation avec l'équipe médicale car ils vont dépendre de l'indication et du positionnement choisi pour les cellules NK lors de futurs protocoles.

Le tableau 9 récapitule les différences majeures entre le protocole en semi-automatisé utilisé lors du précédent essai de phase I et le protocole optimisé automatisé mis au point.

	PROTOCOLE ESSAI DE PHASE I	PROTOCOLE OPTIMISÉ
NOMBRE DE TESTS	17 DLI-NK	7 TESTS
PLATEFORME UTILISEE POUR LA PURIFICATION CELLULAIRE	CliniMACS Plus (semi-automatisé)	CliniMACS Prodigy (automatisé)
SOURCE DE CELLULES NK	Leucaphérèse	2 buffy coats poolés (↑ nombre de cellules NK)
TECHNIQUE D'EXPANSION	1000 UI/ml IL-2 (proleukin)	500 UI/ml rhIL2 + 140 UI/ml rhIL15 (Premium Grade)
MEDIUM	RPMI 1640 + 10% SVF	NK MACS (Usage recherche) + Sérum AB humain (Grade GMP)
CONDITIONS DE CULTURE	Statique (poches) 37°C et 5% CO2 7 jours	Chambre centricult du CliniMACS Prodigy (process automatisé avec changement de milieu et pression contrôlée) 37°C et 5% CO2 14 jours
CONTRÔLES QUALITES PENDANT L'EXPANSION	impossible	Comptes cellulaires et tests fonctionnels pour attester du maintien de l'état d'activation et de la cytotoxicité des cellules NK en cours d'expansion
SYSTÈME CLOS	Oui	Oui
CRITERES DE LIBERATION	<ul style="list-style-type: none"> - CNT > 70% - test de contamination microbiologique NÉGATIF - dose 1 $\geq 1 \times 10^6$ CD56+/kg - doses 2 et 3 $\geq 5 \times 10^6$ CD56+/kg - contamination en cellules CD3+ < 5×10^4/kg. 	<ul style="list-style-type: none"> - Fonctionnalité des cellules NK (test Pantoxilux) - CNT > 70% - test de contamination microbiologique NÉGATIF - contamination en cellules CD3+ (nouveau seuil à déterminer) - Doses de cellules NK et timing des injections à déterminer
DUREE DU PROCESS	8h (8h en présentiel)	8h (2h de présentiel)

Tableau 9 : Principales différences entre l'ancien protocole utilisé lors de l'essai de phase I et le nouveau protocole optimisé automatisé.

2) Résultats obtenus pour la déplétion CD3+/ sélection CD56+ et l'expansion des cellules NK

Au total, 7 tests de validation ont été menés entre 2018 et 2020 sur le CliniMACS Prodigy®. (cf tableau 10 ci-dessous)

A noter que les 3 premiers tests ont été réalisés sur une version antérieure de kits et de logiciel du CliniMACS Prodigy®.

NUMERO DE TEST	DATE
Test n°1	23/01/2018
Test n°2	12/02/2018
Test n°3	19/06/2018
Test n°4	12/03/2019
Test n°5	10/05/2019
Test n°6	17/09/2019
Test n°7	30/01/2020

Tableau 10: Tableau des différents tests réalisés

Test n° 1

La concentration en cellules CD45+ viables du concentré leuco-plaquettaire de départ pour le test n°1 était de 4.4×10^6 /ml dont 38.03% de cellules CD3+ et 10.45% de cellules NK (CD3- / CD56+) soit 44×10^6 cellules NK. Le CliniMACs Prodigy® a rencontré un problème de régulation de la pression en CO₂ à l'étape de sélection cellulaire. Après une conservation sur la nuit et une dilution avec 50ml d'hydroxyethylamidon, le compte de cellules NK était de 33×10^6 cellules. La pureté cellulaire était de 69% et le rendement de 58.9%.

L'expansion n'a pas pu être réalisée du fait du nombre insuffisant de cellules NK.

Test n° 2

Du fait du nombre insuffisant de cellules NK pour réaliser l'étape d'expansion (cf test n°1) cette fois ci 2 concentrés leuco-plaquettaires ont été commandés et groupés pour réaliser le test n°2. Le volume total était de 200ml avec une concentration en cellules CD45+ de $21.3 \times 10^6/\text{ml}$ dont 75.3% de cellule CD3+ et 11.1% de cellules NK. Le pool cellulaire total en cellules NK après conservation sur la nuit à 4°C était de 130×10^6 cellules.

Après déplétion des cellules CD3+ et sélection des cellules CD56+, 108×10^6 de cellules NK ont été récupérées. La pureté cellulaire était de 84.5% et le rendement de 71.8%.

Plusieurs anomalies ont eu lieu pendant le process avec des messages d'erreur notamment au sujet de la pression en CO₂. En parallèle de l'expansion sur le CliniMACS Prodigy®, des cellules NK ont été mis en culture dans des plaques 6 puits.

Dans la première plaque, les cellules NK ont été mises en culture dans du NK MACS associé à du sérum AB. Dans une autre plaque, a été utilisé du NK MACS associé à du sérum synthétique (Xerum Free) et enfin pour la troisième plaque, les cellules NK ont été mises en culture dans du RPMI-1640 associé à 10% de SVF et 1000 UI/ml d'IL-2. (cf figures 19a et 19b) Des prélèvements stériles ont été réalisés à J7, J9 et J14 pour effectuer les contrôles qualité ainsi que les tests fonctionnels avec le protocole Pantoxilux (Cf Matériels et Méthodes). 2 ratios cellules effectrices (E) / cellules cibles (target cell = T) ont été testés : 1 pour 1 et 0.5 pour 1 (cf figures 20a et 20b).

Les résultats obtenus sont les suivants :

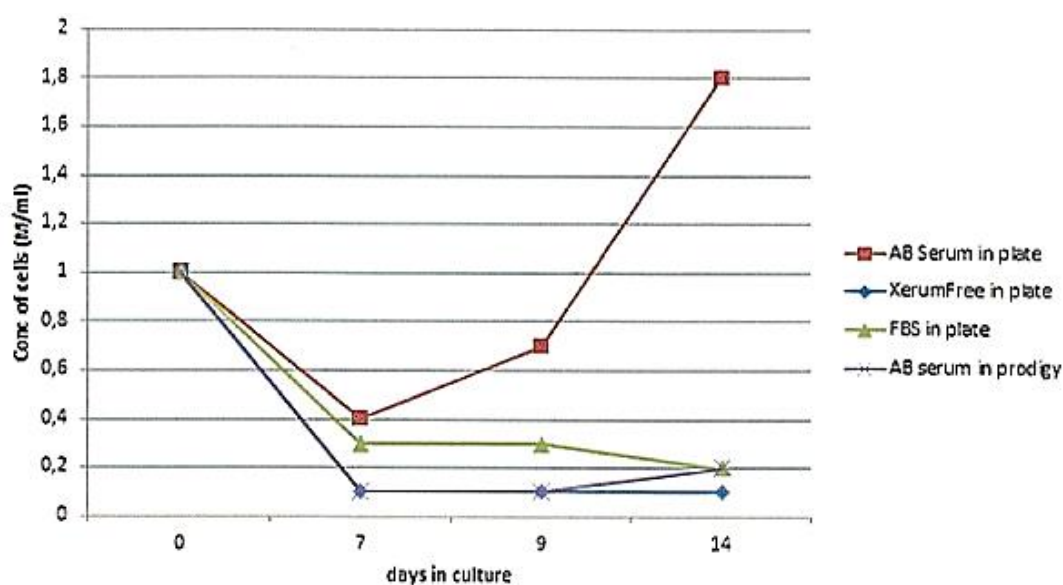


Figure 19a : Concentrations en cellules NK (M/ml) selon le type de sérum utilisé (Test n°2)

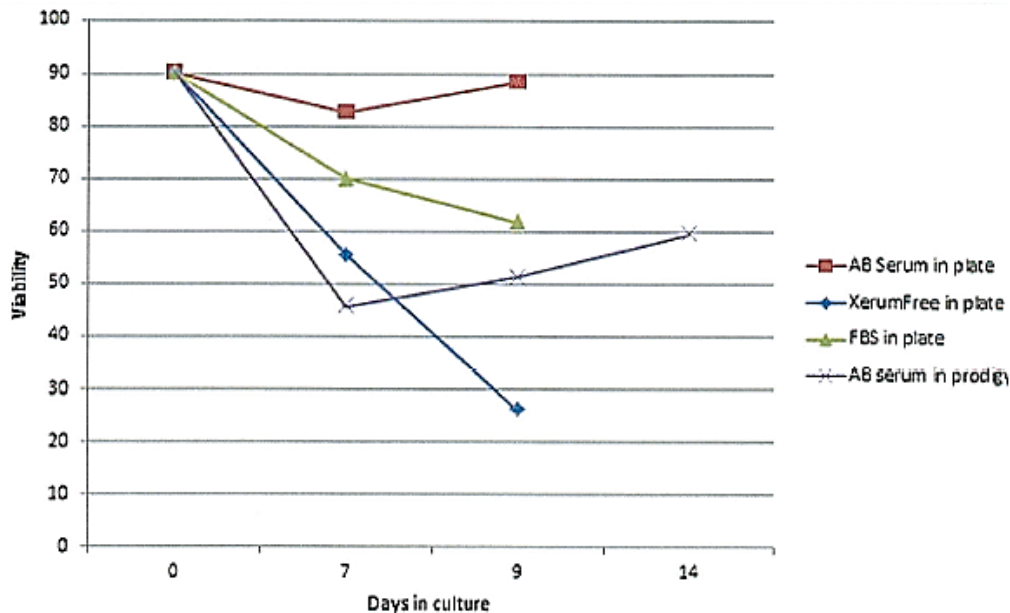


Figure 19b : Viabilité (%) des cellules NK selon le type de sérum utilisé (Test n°2)

Il y a eu un échec d'expansion pour les cellules NK mises en culture dans le CliniMACS Prodigy® en présence de sérum AB. La viabilité des cellules décroît d'ailleurs de manière importante sur les 7 premiers jours de culture puis remonte progressivement à 60% après les 14 jours. Il en est de même pour les cellules NK cultivées en présence de XerumFree et de FBS dans les plaques 6 puits. Les viabilités cellulaires ont également décru de manière importante. Par contre, les cellules NK cultivées en présence de sérum AB sont parvenues à presque doubler après 14 jours de culture et leur viabilité est toujours restée au-dessus des 80% avec une légère décroissance jusqu'à J7 pour atteindre 90% à J9. (cf figures 20a et 20b)

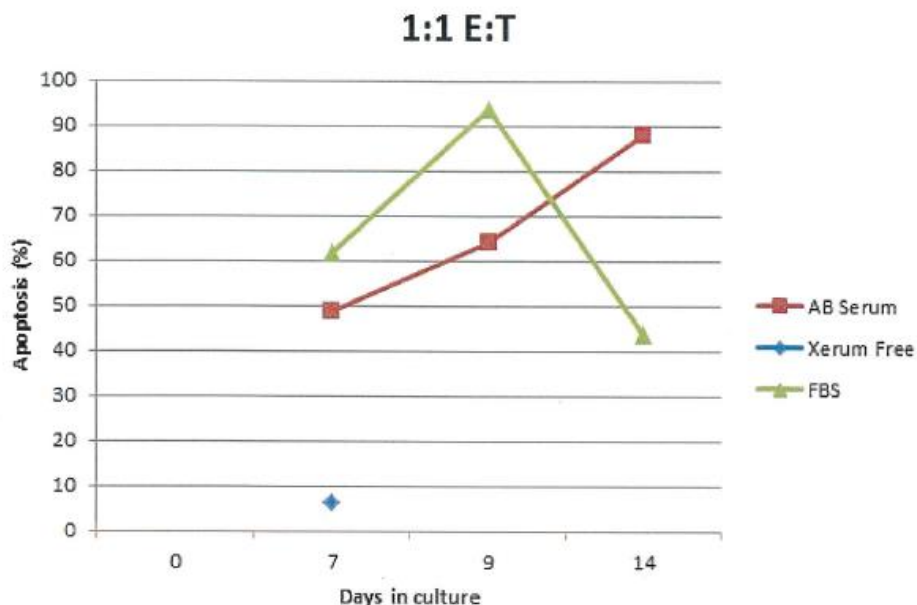


Figure 20a : Pourcentage d'apoptose des cellules cibles selon le type de sérum utilisé (Test n°2) au ratio 1 :1

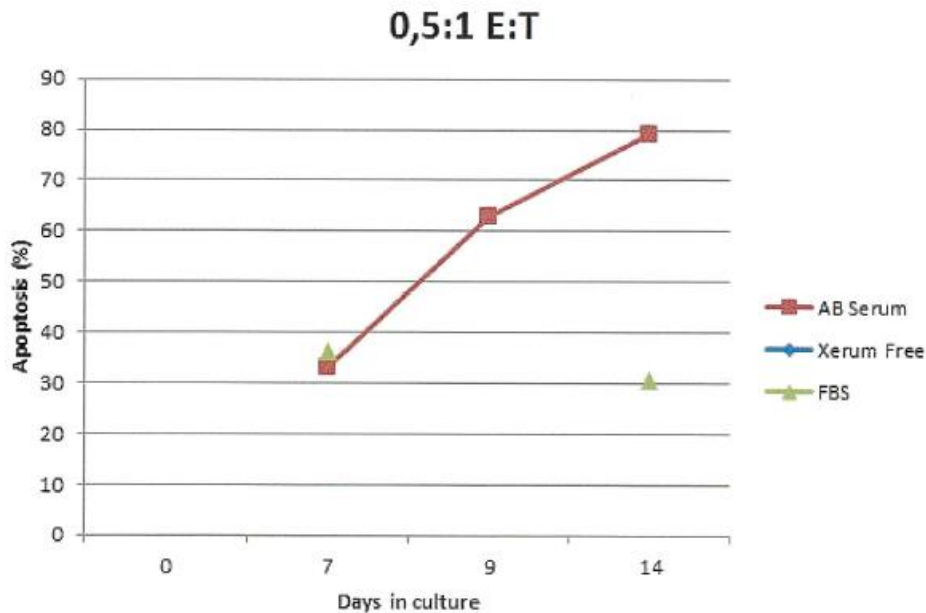


Figure 20b : Pourcentage d'apoptose des cellules cibles selon le type de sérum utilisé (Test n°2) au ratio 0.5 :1

On observe que pour les deux ratios, les cellules NK cultivées en présence de sérum AB gagnent en cytotoxicité pour atteindre un maximum de 90% pour le ratio 1:1 et 80% pour le ratio 0.5:1 après 14 jours de culture. Par ailleurs, les cellules NK cultivées dans du SVF gagnent en cytotoxicité entre J0 et J9 pour le ratio 1:1 puis cette cytotoxicité décroît fortement ensuite. Le ratio 0.5:1 n'est pas concluant avec une stagnation du pourcentage d'apoptose. (cf figures 20a et 20b)

Les quantités de cellules NK cultivées dans du milieu Xerum Free étant trop faibles, les tests fonctionnels n'ont pas pu être réalisés.

Pour conclure, le sérum AB montre clairement sa supériorité sur les autres milieux de culture en matière de taux d'expansion, de viabilité mais également lors du test fonctionnel avec des cellules NK très cytotoxiques.

Test n° 3

La concentration en cellules CD45+ viables présente dans les 2 concentrés leuco-plaquettaires poolés était de $21.3 \times 10^6/\text{ml}$ dont 35.23% de cellule CD3+ et 10.4% de cellules NK. Après déplétion des cellules CD3+ et sélection des cellules CD56+, 234×10^6 de cellules NK ont été récupérées. La pureté cellulaire était de 91% et le rendement de 64.3% (Cf Tableau 11 et figure 21)

Les résultats obtenus sont les suivants :

	J0	J7	J10	J14
Nombre de cellules CD56+ viables ($\times 10^6$)	75	8.3	9	9
% de viabilité	98	80	73	85
% pureté	99.9	99.8	96.3	94.6
contamination CD3 +	0.01%	0.02%	0.37%	0.54%

Tableau 11 : Tableau des résultats bruts obtenus pour le test n°3

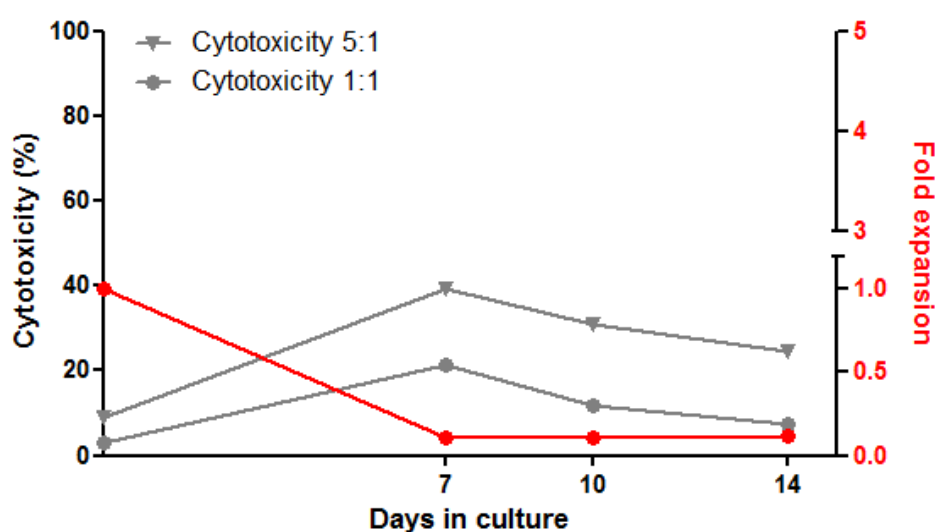


Figure 21 : Cytotoxicité (%) des cellules NK selon le ratio E :T utilisé et Taux d'expansion des cellules NK pour le test n°3

Les cellules NK ne sont pas parvenues à entamer une phase d'expansion pendant la mise en culture. Leur nombre a diminué dès J7 et s'est stabilisé jusqu'à J14.

Les tests fonctionnels ont été réalisés à J7, J10 et J14 avec un ratio (E:T) de 1:1 et 0.5:1. Les deux courbes ont une allure similaire avec une cytotoxicité maximale à J7 et une décroissance progressive jusqu'à J14. (Cf figure 21)

Test n° 4

Lors du test n°4, la concentration en cellules CD45+ viables présente dans les 2 concentrés leuco-plaquettaires groupés était de 3×10^9 dont 38.38% de cellules CD3+ et 15% de cellules NK. Après déplétion des cellules CD3+ et sélection des cellules CD56+, 108×10^6 de cellules NK ont été récupérées avec un log déplétion des LT de -3.1, une pureté de 95.4% et un rendement de 65.45%.

Le taux d'expansion des cellules NK a été de 4 soit une population finale de cellules NK de 422.6×10^6 . A noter qu'à J14, nous avons réalisé un CQ supplémentaire avant filtration et un autre sur le produit final. Avant filtration la population de cellules NK était de 522×10^6 soit une perte cellulaire assez importante. (cf tableau 12)

La viabilité était toujours supérieure à 70% [73-98.2%] pour les quatre temps de prélèvement avec une pureté cellulaire supérieure à 95% [95.4-97.99%]. La contamination en cellules CD3+ n'a jamais dépassé les 0.0036% [0.0001-0.0036%].

Pour le ratio 1 :1 le maximum d'apoptose a été atteint à J10 alors que pour le ratio 5 :1 il a été atteint dès J7 avec un plateau pour les temps J10 et J14. (cf : tableau 12 et la figure 22)

	J0	J7	J10	J14
Nombre de cellules CD56+ viables ($\times 10^6$)	100	71.7	209.8	422.6
Taux d'expansion	1	1.4	2.1	4.226
% de viabilité	98.2	85	73	88
% pureté	95.4	97.29	96.04	97.99
contamination CD3 +	0.0001%	0.0018%	0.0036%	0.0018%

Tableau 12 : Tableau des résultats bruts obtenus pour le test n°4

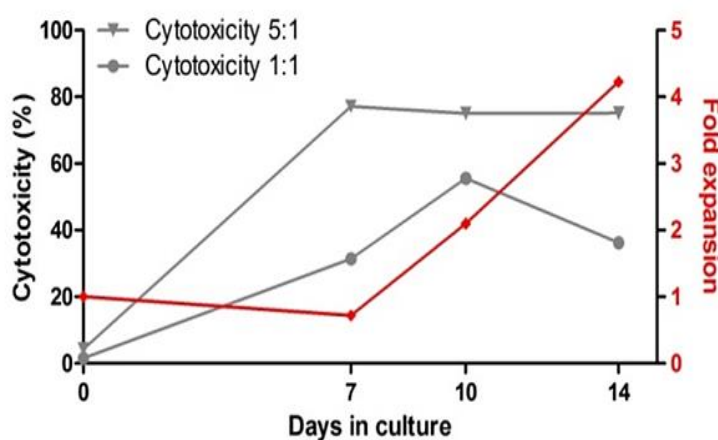


Figure 22 : Cytotoxicité (%) des cellules NK selon le ratio E :T utilisé et Taux d'expansion des cellules NK pour le test n°4

Test n° 5

Lors du test n°5, la concentration en cellules CD45+ viables présente dans les 2 concentrés leuco-plaquettaires groupés était de de 54×10^6 /ml dont 65% de cellules CD3+ (le pourcentage en cellules CD56+ n'a pas été réalisé). Après déplétion des cellules CD3+ et sélection des cellules CD56+, 294.8×10^6 de cellules NK ont été récupérées avec un log déplétion des LT de -7.9. La pureté cellulaire était de 97.28% et le rendement de 51%. 100×10^6 cellules ont été mises en culture et le reste a été congelé. Le sérum AB Sigma utilisé habituellement est arrivé plus tard que prévu et il était impossible de repousser plus longtemps le test pour des raisons logistiques. De ce fait, la mise en culture des cellules a été commencée avec du sérum AB restant de la marque Sigma de J0 à J7 puis de J7 à J14 dans du sérum AB de la marque VWR reçue entre temps en remplacement. A partir de J10, nous avons pu observer une décroissance du nombre de cellules NK. (cf figure 23)

Leur viabilité était toujours supérieure à 70% [72-99%] pour les quatre temps de prélèvement avec une pureté cellulaire supérieure à 95% [97.28-99.99%]. La contamination en cellules CD3+ n'a jamais dépassé les 0.008% [0.0001-0.008%].

Les données de cytotoxicité ont été reportées sur le tableau 13.

Pour le ratio 1:1 le maximum d'apoptose a été atteint à J10 alors que pour le ratio 5:1 il a été atteint dès J7 avec une légère décroissance ensuite.

	D0	D7	D10	D14
Number of viable CD56+ cells ($\times 10^6$)	100	97	108.5	55.8
Fold expansion	1	0.97	1.085	0.558
Viability (%)	99	83	72	88
Purity (%)	97.28	99.4	99.6	99.9
CD3 + contamination	0.0001%	0.0033%	0.0080%	0.0050%

Tableau 13 : Tableau des résultats bruts obtenus pour le test n°5

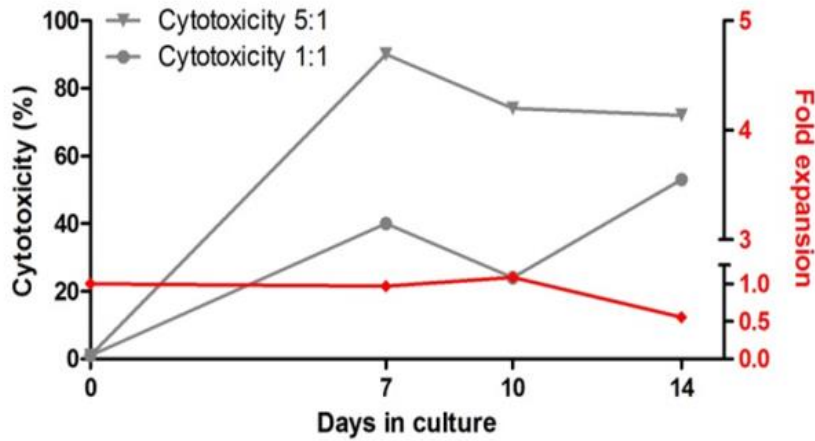


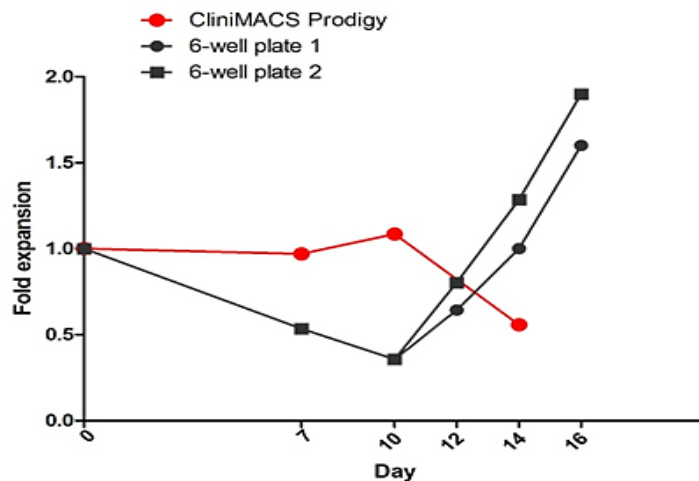
Figure 23 : Cytotoxicité (%) des cellules NK selon le ratio E:T utilisé et taux d'expansion des cellules NK pour le test n°5

Il y a deux hypothèses pouvant expliquer cet échec d'expansion:

- Soit le sérum de substitution de la marque VWR est inefficace pour expandre les cellules NK
- Soit le changement de sérum humain d'un fournisseur à l'autre a eu des conséquences néfastes sur l'expansion des cellules NK.

Nous avons congelé des échantillons à chaque temps par mesure de précaution. Ces échantillons ont été utilisés pour tester nos hypothèses. Pour ce faire, les cellules NK ont été mises en culture dans du sérum VWR dans deux plaques de 6 puits pendant 16 jours.

Comme illustré dans la figure 24, les cellules NK entrent dans une phase de décroissance de J0 à J10 comme déjà observé auparavant et ensuite entrent en phase d'expansion. La deuxième hypothèse est alors retenue.



	Cells	VWR Human Serum	Sigma Human Serum
CliniMACS Prodigy	Fresh	D0-D7	D7-D14
6-well plate 1	Frozen	-	D0-D16
6-well plate 2	Frozen	-	D0-D16

Figure 24 : Taux d'expansion obtenu avec le CliniMACS prodigy® versus les cultures dans des plaques 6 puits pour le test 5

Test n° 6

Lors du test n°6, la concentration en cellules CD45+ viables présente dans les 2 concentrés leuco-plaquettaires groupés était de 38.6×10^6 cellules/ml dont 70% de cellules CD3+ et 18% de cellules CD56+. Après déplétion des cellules CD3+ et sélection des cellules CD56+, 80×10^6 de cellules NK ont été récupérées avec un log déplétion des LT de -7.7, une pureté de 97.34 % et un rendement de 48.4%.

100×10^6 de cellules NK sont nécessaires pour démarrer le processus d'expansion de ce fait il n'a pas pu être réalisé. De plus, une alarme s'est déclenchée suite à un problème de régulation de la pression en CO₂.

Test n°7

Lors du test n°7, la concentration en cellules CD45+ viables présentes dans les 2 concentrés leuco-plaquettaires poolés était de 38.9×10^6 cellules/ml dont 42% de cellules CD3+ et 3.6% de cellules CD56+. La log déplétion des LT était de -6 avec une pureté cellulaire de 98.36 % et un rendement de 65.7%.

Seulement 60×10^6 de cellules NK ont été récupérés après le process de déplétion/sélection. Cependant, nous avons pu démarrer la mise en culture tout de même en forçant le démarrage du process.

Le taux d'expansion des cellules NK a été de 6.5 soit une population finale de cellules NK de 375×10^6 . La viabilité était toujours supérieure à 85% [85-99.5%] pour les quatre temps de prélèvement avec une pureté cellulaire supérieure à 95% [98.36-99.85%]. La contamination en cellules CD3+ n'a jamais dépassé les 0.005% [0.0012-0.005%].(cf tableau 14)

Pour les deux ratios 1:1 on observe une hausse de la cytotoxicité des cellules jusqu'à J7 suivie d'une légère décroissance entre J7 et J10 puis une augmentation jusqu'à J14 au-delà des 60%.(cf figure 25)

	J0	J7	D10	D14
Nombre de cellules CD56+ viables ($\times 10^6$)	60	85	215	375
Taux d'expansion	NA	1.42	3.58	6.47
Viabilité (%)	98.5%	93.7%	85%	99.5%
Pureté (%)	98.36%	99.46%	99.7%	99.85%
Contamination en cellules CD3+	0.005 %	0.002 %	0.0015 %	0.0012 %

Tableau 14 : Tableau des résultats bruts obtenus pour le test n°7

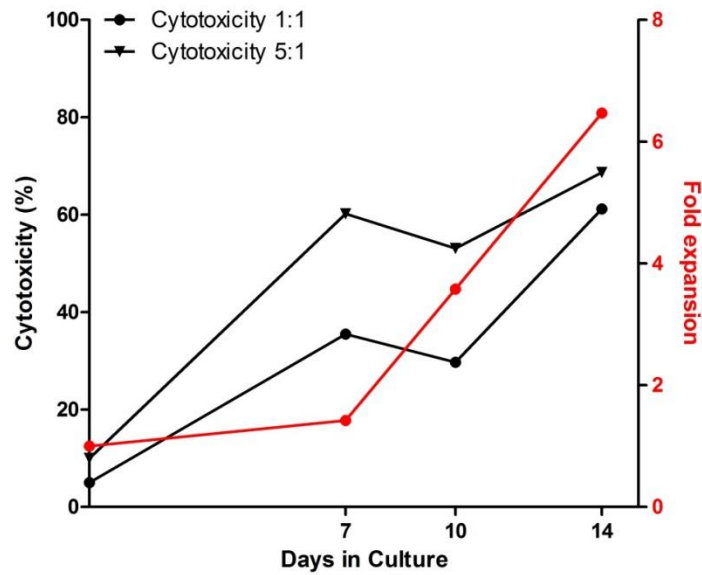
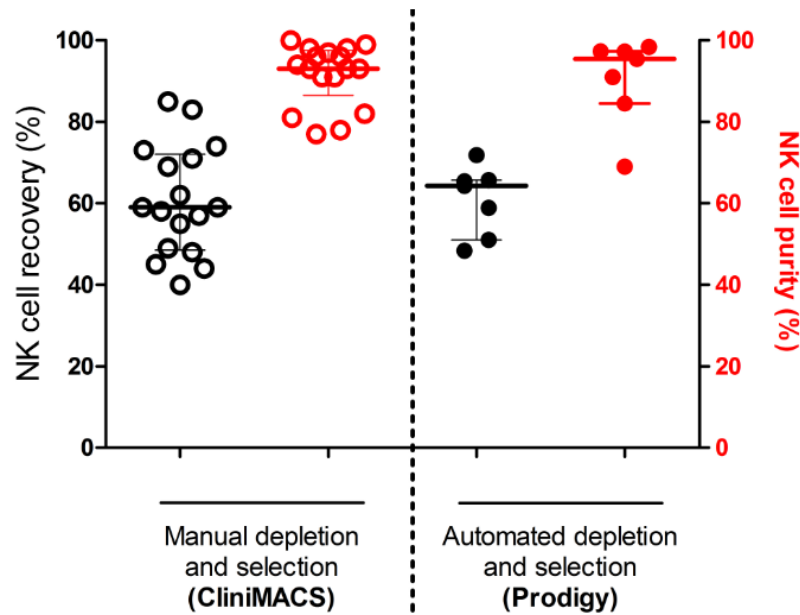


Figure 25 : Cytotoxicité (%) des cellules NK selon le ratio E:T utilisé et taux d'expansion des cellules NK pour le test n°7

La figure 26, regroupe l'ensemble des résultats de rendement et de pureté cellulaire sur les produits cellulaires enrichis en cellules NK en amont de l'étape d'expansion. A droite, les 7 tests de validation versus les résultats obtenus lors du précédent essai clinique à gauche.



Number of runs	17 (DLI-NK) trial	7 (Beta tests)
Starting material	Leukapheresis	Pool of 2 buffy coats

Figure 26 : Comparaison du rendement cellulaire et de la pureté avec la technique manuelle durant l'essai clinique sur le cliniMACS Plus® vs avec la technique automatisée sur le cliniMACS Prodigy®

Lors du précédent essai clinique la pureté médiane obtenue était de 93% [77%-100%] et le rendement médian était de 59% [40% - 85%]. Pour les 7 tests de validation, la pureté cellulaire médiane est de plus de 95.4% [69% - 98.36%] et le rendement médian de 64.3% [48.4% - 71.8%]. La technique automatisée permet donc d'obtenir des résultats plus homogènes et robustes. De plus, le changement de kits et de programme sur le CliniMACS Prodigy® n'a pas eu d'impact sur les résultats.

En résumé, sur l'ensemble des 7 tests, 7 déplétions/sélections et 6 expansions ont pu être réalisées. L'étape de déplétion/sélection des cellules NK a pu être validée car elle a été concluante pour plus de 3 tests. L'expansion a fonctionné seulement pour 2 tests. En ce qui concerne le test n°5, l'expansion a fonctionné sur une plaque 6 puits et non avec le CliniMACS Prodigy® ne permettant donc pas d'atteindre les 3 tests concluants requis. On peut tout de même déjà observer que le maximum est atteint à J14 pour les 3 tests donc il apparaît nécessaire de maintenir une durée de mise en culture de 14 jours pour maximiser le nombre de cellules NK obtenues et ainsi être en mesure de fabriquer potentiellement plusieurs doses en cas de poursuite d'un protocole similaire de DLI-NK. (cf figure 27)

En ce qui concerne le potentiel cytotoxique des cellules NK, on observe que le ratio 5 :1 obtient produit les meilleurs résultats. Dès J7, le pourcentage d'apoptose atteint un maximum avant de décroître ou de former un plateau pour J10 et J14. Cela suggère que les cellules NK commencent à montrer potentiellement des signes d'épuisement. Le ratio 1 :1 est cependant une option intéressante, car elle illustre qu'avec un nombre moins important de cellules NK on obtient tout de même une cytotoxicité satisfaisante dans un rapport de cellule à cellule. Sur l'ensemble des tests, le pourcentage de contamination en LT n'a pas excédé les 0.008%.

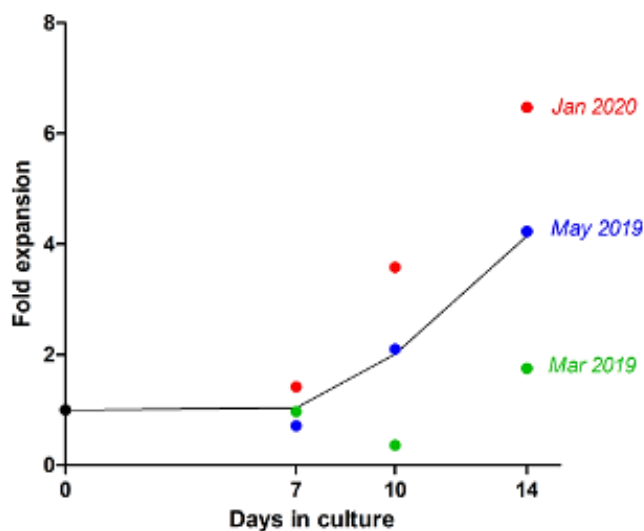


Figure 27 : Taux d'expansion obtenus pour les 3 tests concluants

CONCLUSION

Les résultats préliminaires obtenus lors de ces tests de validation sont encourageants avec une pureté cellulaire et des rendements satisfaisants pour l'étape initiale d'immuno-sélection. La contamination en cellules CD3⁺ est également très faible. Cependant d'autres tests seraient nécessaires pour valider l'étape d'expansion et confirmer les résultats déjà obtenus pour pouvoir passer aux prochaines étapes.

Plusieurs limites sont à soulever notamment le fait que les culots leuco-plaquettaires servant de matière première pour les tests sont prélevés souvent plus de 24h avant d'effectuer la déplétion des LT/sélection des cellules NK. Avec des leucaphérèses prélevées la veille ou le jour même et transportées entre 4 et 8°C, le nombre de cellules NK obtenues lors de la déplétion des LT/sélection des cellules NK serait très probablement plus important permettant ainsi de démarrer l'étape d'expansion. Il reste également à réaliser un test de simulation aseptique en conditions réelles lorsque le protocole sera finalisé. Les incidents répétés de défaut de régulation de la pression en CO₂ dans l'automate soulèvent également la question d'établir une solution alternative acceptable si cela devait se produire en temps réel lors du processus en cours d'essai clinique.

Les paramètres à éventuellement améliorer seraient la cytotoxicité et le taux d'expansion des cellules NK. Pour cela il faudrait modifier la méthode d'expansion à savoir la quantité de cytokines utilisées ou encore l'association de cytokine directement. Les équipes de recherche du Centre de recherche en cancérologie de Marseille (CRCM) travaillent actuellement sur ces différents aspects.

Reste également à définir avec l'équipe de cliniciens les doses de DLI-NK à administrer aux patients ainsi que la fréquence des administrations en tenant compte des résultats préliminaires afin de savoir si l'on sera en mesure d'obtenir suffisamment de cellules NK avec ce protocole ou s'il faudrait procéder à de nouvelles optimisations. La stratégie clinique avec le choix des patients à inclure dans cette éventuelle nouvelle étude reste également à définir. Conserver le positionnement en post-greffe, si oui, après combien de temps en post-greffe commencer les injections. Le typage des récepteurs KIR des donneurs afin d'obtenir un mismatch entre donneur et receveur est également un élément à prendre en compte car cela pourrait impacter positivement l'effet thérapeutique des cellules NK.

CONCLUSION

CONCLUSION GENERALE:

Au cours des trois dernières décennies, le développement des immunothérapies a connu un essor considérable venant enrichir le portefeuille des thérapeutiques disponibles au côté de la chirurgie, des rayonnements ionisants, des chimiothérapies cytotoxiques et des thérapies ciblées. Parmi le panel de cellules aujourd'hui étudiées pour leur potentielle utilisation thérapeutique, les cellules NK font l'objet d'un intérêt croissant en raison de leur cytotoxicité innée à l'encontre des cellules anormales (infectées ou malignes entre autres) mais également de leur rôle clé dans l'immunosurveillance des tumeurs et leur capacité à communiquer avec les cellules de l'immunité adaptative. Les thérapeutiques développées à partir de cellules également sont également évaluées dans des indications hors oncohématologie notamment en infectiologie, dans les tumeurs solides ou encore dans certaines pathologies auto-immunes.

Les immunothérapies développées à partir de cellules NK évaluées jusqu'à présent ont un profil de sécurité favorable avec une réponse clinique des patients encourageante en oncohématologie et notamment dans les LAM. La plupart des études en cours sont des études de phase I voire de phase II et de ce fait il est encore trop tôt pour avoir une vue d'ensemble précise de l'efficacité des cellules NK dans certaines indications. Il sera par la suite nécessaire d'évaluer cette efficacité de manière plus poussée sur des cohortes de patients plus importantes. Les LAM sont des hémopathies rares pour lesquelles plusieurs thérapeutiques sont en cours de développement. Développer un nouveau MTI dans cette indication est cependant risqué pour les industriels notamment dans le contexte de la greffe allogénique responsable de toxicités pouvant potentiellement être imputées au candidat médicament.

La plupart des études menées sur les cellules NK à ce jour utilisent des protocoles très hétérogènes (nature /dosage/ combinaisons de cytokines, milieu de culture, doses de cellules, durée d'incubation, utilisation ou non de CN, conditionnements différents, association avec des anticorps etc) et il est donc difficile d'établir des comparaisons d'une étude à l'autre. Il serait intéressant pour les études futures de faire un travail d'harmonisation des protocoles et de former des équipes pluridisciplinaires avec des connaissances à la fois scientifiques, cliniques et réglementaires pour appréhender ces projets le mieux possible.

Malgré cela, il est tout de même assez évident que les protocoles utilisant des CN cells pour booster l'expansion des cellules NK permettent d'obtenir des quantités de cellules bien supérieures aux autres protocoles. Se pose cependant la question de l'innocuité de ces cellules qui est encore discutée et également les difficultés réglementaires posées par leur utilisation à

mettre en balance avec le bénéfice potentiel ou avéré pour les patients qui bénéficieraient de ces thérapeutiques. Par ailleurs, l'activation non spécifique des cellules NK par le biais de cytokines ne permet pas d'obtenir d'aussi bons résultats que les protocoles utilisant des cellules NK ciblant spécifiquement un antigène donné grâce à l'addition d'une structure CAR ou encore l'utilisation par exemple de « cell engager » (BiKEs/TriKEs).

Futures perspectives

Les approches pré-cliniques actuellement développées semblent tendre vers une combinaison des outils existants afin d'agir sous plusieurs angles et maximiser l'efficacité thérapeutique des cellules NK.

De nombreux défis à la fois scientifiques et stratégiques restent cependant à relever entre autres :

- favoriser la persistance des cellules NK post injection,
- permettre leur migration vers les cellules tumorales notamment dans les tumeurs solides
- mieux comprendre le rôle complexe joué par le micro environnement tumoral (cytokines, facteurs solubles et présence d'autres populations cellulaires etc).

Par ailleurs, les thérapeutiques développées à partir de cellules NK dans des centres académiques à petite échelle pourraient donner lieu à des partenariats industriels permettant une production à plus large échelle.

La tendance actuelle va vers l'automatisation des procédés permettant ainsi de réduire le temps des interventions humaines et favoriser ainsi l'harmonisation des pratiques et la diminution des coûts. De plus, cela permet également de réduire le risque de contaminations dans les laboratoires. Les équipes académiques investissent de plus en plus dans des automates offrant ainsi plus de flexibilité et un bon retour sur investissement car ils peuvent les utiliser pour plusieurs applications (à la fois travail de routine et expérimental). Il semble également que de plus en plus de centres académiques optent pour des partenariats avec les industriels pour leurs projets de recherche afin de diminuer une partie des coûts tout en gagnant en expérience et en compétences techniques.

A voir si avec le temps, la recherche académique parviendra à conserver une activité de production à petite échelle ou si l'industrie pharmaceutique finira par produire l'intégralité des thérapies cellulaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 Rosenau W, Moon HD. Lysis of homologous cells by sensitized lymphocytes in tissue culture. *J Natl Cancer Inst* 1961; **27**: 471-483
- 2 Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer* 1975; **16**: 216-229
- 3 Herberman RB, Nunn ME, Holden HT, *et al.* Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer* 1975; **16**: 230-239
- 4 Kiessling R, Klein E, Wigzell H. „Natural” killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* 1975; **5**: 112-117
- 5 Kiessling R, Klein E, Pross H, *et al.* „Natural” killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* 1975; **5**: 117-121
- 6 Rosenberg EB, McCoy JL, Green SS, *et al.* Destruction of Human Lymphoid Tissue-Culture Cell Lines by Human Peripheral Lymphocytes in 51Cr-Release Cellular Cytotoxicity Assays2. *JNCI J Natl Cancer Inst* 1974; **52**: 345-352
- 7 Trinchieri G. Biology of Natural Killer Cells. In *Advances in Immunology*. Vol 47. Elsevier, 1989; 187-376.
- 8 Björkström NK, Ljunggren H-G, Michaëlsson J. Emerging insights into natural killer cells in human peripheral tissues. *Nat Rev Immunol* 2016; **16**: 310-320
- 9 Vivier E, Tomasello E, Baratin M, *et al.* Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008; **9**: 503-510
- 10 Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood* 2008; **112**: 461-469
- 11 Watzl C. How to Trigger a Killer. In *Advances in Immunology*. Vol 124. Elsevier, 2014; 137-170.
- 12 Myers JA, Miller JS. Exploring the NK cell platform for cancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2021; **18**: 85-100
- 13 Mandal A, Viswanathan C. Natural killer cells: In health and disease. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2015; **8**: 47-55
- 14 Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001; **22**: 633-640

- 15 Belizário JE, Neyra JM, Setúbal Destro Rodrigues MF. When and how NK cell-induced programmed cell death benefits immunological protection against intracellular pathogen infection. *Innate Immun* 2018; **24**: 452-465
- 16 Timonen T, Jr O, Herberman R. Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells. *J Exp Med* 1981; **153**: 569-582
- 17 Vivier E, Artis D, Colonna M, *et al.* Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* 2018; **174**: 1054-1066
- 18 Trabanelli S, Gomez-Cadena A, Salomé B, *et al.* Human innate lymphoid cells (ILCs): Toward a uniform immune-phenotyping: hILC PHENOTYPE. *Cytometry B Clin Cytom* 2018; **94**: 392-399
- 19 Carrega P, Ferlazzo G. Natural killer cell distribution and trafficking in human tissues. *Front Immunol* 2012; **3**
- 20 Crinier A, Narni-Mancinelli E, Ugolini S, *et al.* SnapShot: Natural Killer Cells. *Cell* 2020; **180**: 1280-1280.e1
- 21 Cichocki F, Grzywacz B, Miller JS. Human NK Cell Development: One Road or Many? *Front Immunol* 2019; **10**: 2078
- 22 Abel AM, Yang C, Thakar MS, *et al.* Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol* 2018; **9**: 1869
- 23 Colonna M. Innate Lymphoid Cells: Diversity, Plasticity, and Unique Functions in Immunity. *Immunity* 2018; **48**: 1104-1117
- 24 Yu J, Freud AG, Caligiuri MA. Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol* 2013; **34**: 573-582
- 25 Scoville SD, Freud AG, Caligiuri MA. Modeling Human Natural Killer Cell Development in the Era of Innate Lymphoid Cells. *Front Immunol* 2017; **8**
- 26 Schlums H, Jung M, Han H, *et al.* Adaptive NK cells can persist in patients with GATA2 mutation depleted of stem and progenitor cells. *Blood* 2017; **129**: 1927-1939
- 27 Corat MAF, Schlums H, Wu C, *et al.* Acquired somatic mutations in PNH reveal long-term maintenance of adaptive NK cells independent of HSPCs. *Blood* 2017; **129**: 1940-1946
- 28 Shimasaki N, Jain A, Campana D. NK cells for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov* 2020; **19**: 200-218
- 29 Zhang Y, Wallace DL, de Lara CM, *et al.* In vivo kinetics of human natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection. *Immunology* 2007; **121**: 258-265

- 30 Freud AG, Caligiuri MA. Human natural killer cell development. *Immunol Rev* 2006; **214**: 56-72
- 31 Freud AG, Yokohama A, Becknell B, *et al.* Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J Exp Med* 2006; **203**: 1033-1043
- 32 Cichocki F, Grzywacz B, Miller JS. Human NK Cell Development: One Road or Many? *Front Immunol* 2019; **10**: 2078
- 33 Moretta L, Montaldo E, Vacca P, *et al.* Human Natural Killer Cells: Origin, Receptors, Function, and Clinical Applications. *Int Arch Allergy Immunol* 2014; **164**: 253-264
- 34 Baume DM, Robertson MJ, Levine H, *et al.* Differential responses to interleukin 2 define functionally distinct subsets of human natural killer cells. *Eur J Immunol* 1992; **22**: 1-6
- 35 Farag SS. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 2002; **100**: 1935-1947
- 36 Jacobs R, Hintzen G, Kemper A, *et al.* CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol* 2001; **31**: 3121-3127
- 37 De Maria A, Bozzano F, Cantoni C, *et al.* Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56dimCD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN- on activation. *Proc Natl Acad Sci* 2011; **108**: 728-732
- 38 Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, *et al.* Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset. *Blood* 2001; **97**: 3146-3151
- 39 Heipertz EL, Zynda ER, Stav-Noraas TE, *et al.* Current Perspectives on “Off-The-Shelf” Allogeneic NK and CAR-NK Cell Therapies. *Front Immunol* 2021; **12**: 732135
- 40 Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, *et al.* Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 1989; **143**: 3183-3191
- 41 Lanier LL, Le AM, Civin CI, *et al.* The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol Baltim Md 1950* 1986; **136**: 4480-4486
- 42 Fauriat C, Long EO, Ljunggren H-G, *et al.* Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 2010; **115**: 2167-2176
- 43 Chan A, Hong D-L, Atzberger A, *et al.* CD56^{bright} Human NK Cells Differentiate into CD56^{dim} Cells: Role of Contact with Peripheral Fibroblasts. *J Immunol* 2007; **179**: 89-94
- 44 Grzywacz B, Kataria N, Kataria N, *et al.* Natural killer-cell differentiation by myeloid progenitors. *Blood* 2011; **117**: 3548-3558

- 45 Chan CJ, Smyth MJ, Martinet L. Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress. *Cell Death Differ* 2014; **21**: 5-14
- 46 Vivier E, Nunès JA, Vély F. Natural killer cell signaling pathways. *Science* 2004; **306**: 1517-1519
- 47 Long EO, Sik Kim H, Liu D, *et al.* Controlling Natural Killer Cell Responses: Integration of Signals for Activation and Inhibition. *Annu Rev Immunol* 2013; **31**: 227-258
- 48 Chester C, Fritsch K, Kohrt HE. Natural Killer Cell Immunomodulation: Targeting Activating, Inhibitory, and Co-stimulatory Receptor Signaling for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 2015; **6**
- 49 Di Vito C, Mikulak J, Zaghi E, *et al.* NK cells to cure cancer. *Semin Immunol* 2019; **41**: 101272
- 50 Bryceson YT, March ME, Ljunggren H-G, *et al.* Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev* 2006; **214**: 73-91
- 51 Kruse PH, Matta J, Ugolini S, *et al.* Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunol Cell Biol* 2014; **92**: 221-229
- 52 Baychelier F, Sennepin A, Ermonval M, *et al.* Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *Blood* 2013; **122**: 2935-2942
- 53 Lugli E, Marcenaro E, Mavilio D. NK Cell Subset Redistribution during the Course of Viral Infections. *Front Immunol* 2014; **5**: 390
- 54 Trabanelli S, Chevalier MF, Martinez-Usatorre A, *et al.* Tumour-derived PGD2 and NKp30-B7H6 engagement drives an immunosuppressive ILC2-MDSC axis. *Nat Commun* 2017; **8**
- 55 Moretta A, Bottino C, Vitale M, *et al.* ACTIVATING RECEPTORS AND CORECEPTORS INVOLVED IN HUMAN NATURAL KILLER CELL-MEDIATED CYTOLYSIS. *Annu Rev Immunol* 2001; **19**: 197-223
- 56 Brandt CS, Baratin M, Yi EC, *et al.* The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med* 2009; **206**: 1495-1503
- 57 Barrow AD, Martin CJ, Colonna M. The Natural Cytotoxicity Receptors in Health and Disease. *Front Immunol* 2019; **10**: 909
- 58 Houchins JP, Yabe T, McSherry C, *et al.* DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med* 1991; **173**: 1017-1020
- 59 Wu J. An Activating Immunoreceptor Complex Formed by NKG2D and DAP10. *Science* 1999; **285**: 730-732

- 60 Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, *et al.* Regulation of Ligands for the NKG2D Activating Receptor. *Annu Rev Immunol* 2013; **31**: 413-441
- 61 Lanier LL. NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunol Res* 2015; **3**: 575-582
- 62 Burgess SJ, Maasho K, Masilamani M, *et al.* The NKG2D receptor: immunobiology and clinical implications. *Immunol Res* 2008; **40**: 18-34
- 63 Ogasawara K, Lanier LL. NKG2D in NK and T Cell-Mediated Immunity. *J Clin Immunol* 2005; **25**: 534-540
- 64 Groh V, Wu J, Yee C, *et al.* Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002; **419**: 734-738
- 65 Kaiser BK, Yim D, Chow I-T, *et al.* Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. *Nature* 2007; **447**: 482-486
- 66 Lazetic S, Chang C, Houchins JP, *et al.* Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol Baltim Md 1950* 1996; **157**: 4741-4745
- 67 Schlums H, Cichocki F, Tesi B, *et al.* Cytomegalovirus infection drives adaptive epigenetic diversification of NK cells with altered signaling and effector function. *Immunity* 2015; **42**: 443-456
- 68 Vilches C, Parham P. K IR : Diverse, Rapidly Evolving Receptors of Innate and Adaptive Immunity. *Annu Rev Immunol* 2002; **20**: 217-251
- 69 Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, *et al.* Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 1997; **7**: 739-751
- 70 Chan H-W, Kurago ZB, Stewart CA, *et al.* DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells. *J Exp Med* 2003; **197**: 245-255
- 71 Pende D, Falco M, Vitale M, *et al.* Killer Ig-Like Receptors (KIRs): Their Role in NK Cell Modulation and Developments Leading to Their Clinical Exploitation. *Front Immunol* 2019; **10**
- 72 Geller MA, Miller JS. Use of allogeneic NK cells for cancer immunotherapy. *Immunotherapy* 2011; **3**: 1445-1459
- 73 Chan H-W, Miller JS, Moore MB, *et al.* Epigenetic control of highly homologous killer Ig-like receptor gene alleles. *J Immunol Baltim Md 1950* 2005; **175**: 5966-5974
- 74 Lewis Marffy AL, McCarthy AJ. Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptors (LILRs) on Human Neutrophils: Modulators of Infection and Immunity. *Front Immunol* 2020; **11**: 857

- 75 Fanger NA, Cosman D, Peterson L, *et al.* The MHC class I binding proteins LIR-1 and LIR-2 inhibit Fc receptor-mediated signaling in monocytes. *Eur J Immunol* 1998; **28**: 3423-3434
- 76 Catros V, Dessarthe B, Thedrez A, *et al.* Les récepteurs de nectines/nectines- like DNAM-1 et CRTAM: Immuno-surveillance ou échappement tumoral ? *médecine/sciences* 2014; **30**: 537-543
- 77 Mathew PA, Garni-Wagner BA, Land K, *et al.* Cloning and characterization of the 2B4 gene encoding a molecule associated with non-MHC-restricted killing mediated by activated natural killer cells and T cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 1993; **151**: 5328-5337
- 78 Ljunggren H-G, Kärre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990; **11**: 237-244
- 79 Karlhofer FM, Ribaldo RK, Yokoyama WM. MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells. *Nature* 1992; **358**: 66-70
- 80 Borrego F. The First Molecular Basis of the "Missing Self" Hypothesis. *J Immunol* 2006; **177**: 5759-5760
- 81 Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**: 361-370
- 82 Thiery J, Keefe D, Boulant S, *et al.* Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nat Immunol* 2011; **12**: 770-777
- 83 Afonina IS, Cullen SP, Martin SJ. Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B: Granzyme B in apoptosis and inflammation. *Immunol Rev* 2010; **235**: 105-116
- 84 Lo Nigro C, Macagno M, Sangiolo D, *et al.* NK-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in solid tumors: biological evidence and clinical perspectives. *Ann Transl Med* 2019; **7**: 105-105
- 85 Chávez-Galán L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, *et al.* Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* 2009; **6**: 15-25
- 86 Mouliau N, Berrih-Aknin S. Fas/APO-1/CD95 in health and autoimmune disease: thymic and peripheral aspects. *Semin Immunol* 1998; **10**: 449-456
- 87 Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, *et al.* The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 1997; **276**: 111-113
- 88 Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, *et al.* Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 2005; **42**: 501-510
- 89 Screpanti V, Wallin RPA, Ljunggren H-G, *et al.* A Central Role for Death Receptor-Mediated Apoptosis in the Rejection of Tumors by NK Cells. *J Immunol* 2001; **167**: 2068-2073

- 90 Guillerey C, Huntington ND, Smyth MJ. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nat Immunol* 2016; **17**: 1025-1036
- 91 Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer* 2016; **16**: 7-19
- 92 Lorenzo-Herrero S, López-Soto A, Sordo-Bahamonde C, *et al.* NK Cell-Based Immunotherapy in Cancer Metastasis. *Cancers* 2018; **11**: 29
- 93 López-Soto A, Gonzalez S, Smyth MJ, *et al.* Control of Metastasis by NK Cells. *Cancer Cell* 2017; **32**: 135-154
- 94 Gonzalez-Rodriguez, Villa-Álvarez, Sordo-Bahamonde, *et al.* NK Cells in the Treatment of Hematological Malignancies. *J Clin Med* 2019; **8**: 1557
- 95 Veluchamy JP, Lopez-Lastra S, Spanholtz J, *et al.* In Vivo Efficacy of Umbilical Cord Blood Stem Cell-Derived NK Cells in the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Front Immunol* 2017; **8**: 87
- 96 Ramos-Mejia V, Arellano-Galindo J, Mejía-Arangure JM, *et al.* A NK Cell Odyssey: From Bench to Therapeutics Against Hematological Malignancies. *Front Immunol* 2022; **13**: 803995
- 97 Chabannon C, Kuball J, Bondanza A, *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation in its 60s: A platform for cellular therapies. *Sci Transl Med* 2018; **10**: eaap9630
- 98 Handgretinger R, Lang P, André MC. Exploitation of natural killer cells for the treatment of acute leukemia. *Blood* 2016; **127**: 3341-3349
- 99 Wu CJ, Ritz J. Induction of Tumor Immunity Following Allogeneic Stem Cell Transplantation. In *Advances in Immunology*. Vol 90. Elsevier, 2006; 133-173.
- 100 Curti A, Ruggeri L, D'Addio A, *et al.* Successful transfer of alloreactive haploidentical KIR ligand-mismatched natural killer cells after infusion in elderly high risk acute myeloid leukemia patients. *Blood* 2011; **118**: 3273-3279
- 101 Ruggeri L. Effectiveness of Donor Natural Killer Cell Alloreactivity in Mismatched Hematopoietic Transplants. *Science* 2002; **295**: 2097-2100
- 102 Locatelli F, Pende D, Mingari MC, *et al.* Cellular and molecular basis of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in the successful treatment of high-risk leukemias: role of alloreactive NK cells. *Front Immunol* 2013; **4**
- 103 Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, *et al.* Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 1999; **94**: 333-339
- 104 Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A, *et al.* Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 2005; **105**: 3051-3057

- 105 Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, *et al.* Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 1982; **155**: 1823-1841
- 106 Rosenberg SA. Immunotherapy of patients with advanced cancer using interleukin-2 alone or in combination with lymphokine activated killer cells. *Important Adv Oncol* 1988: 217-257
- 107 Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, *et al.* Observations on the Systemic Administration of Autologous Lymphokine-Activated Killer Cells and Recombinant Interleukin-2 to Patients with Metastatic Cancer. *N Engl J Med* 1985; **313**: 1485-1492
- 108 Reina-Ortiz C, Constantinides M, Fayd-Herbe-de-Maudave A, *et al.* Expanded NK cells from umbilical cord blood and adult peripheral blood combined with daratumumab are effective against tumor cells from multiple myeloma patients. *OncoImmunology* 2021; **10**: 1853314
- 109 Parkhurst MR, Riley JP, Dudley ME, *et al.* Adoptive Transfer of Autologous Natural Killer Cells Leads to High Levels of Circulating Natural Killer Cells but Does Not Mediate Tumor Regression. *Clin Cancer Res* 2011; **17**: 6287-6297
- 110 Laskowski TJ, Biederstädt A, Rezvani K. Natural killer cells in antitumour adoptive cell immunotherapy. *Nat Rev Cancer* July 2022
- 111 Shin MH, Kim J, Lim SA, *et al.* NK Cell-Based Immunotherapies in Cancer. *Immune Netw* 2020; **20**: e14
- 112 Antin JH. T-cell depletion in GVHD: less is more? *Blood* 2011; **117**: 6061-6062
- 113 Dolstra H, Roeven MWH, Spanholtz J, *et al.* Successful Transfer of Umbilical Cord Blood CD34+ Hematopoietic Stem and Progenitor-derived NK Cells in Older Acute Myeloid Leukemia Patients. *Clin Cancer Res* 2017; **23**: 4107-4118
- 114 Fang F, Xie S, Chen M, *et al.* Advances in NK cell production. *Cell Mol Immunol* 2022; **19**: 460-481
- 115 Romee R, Leong JW, Fehniger TA. Utilizing Cytokines to Function-Enable Human NK Cells for the Immunotherapy of Cancer. *Scientifica* 2014; **2014**: 1-18
- 116 Holstein SA, Cooley S, Hari P, *et al.* Results of a Phase I Study of Pnk-007, Allogeneic, Off the Shelf NK Cell, Post Autologous Transplant in Multiple Myeloma (NCT02955550). *Blood* 2019; **134**: 4451-4451
- 117 Cooley S, He F, Bachanova V, *et al.* First-in-human trial of rhIL-15 and haploidentical natural killer cell therapy for advanced acute myeloid leukemia. *Blood Adv* 2019; **3**: 1970-1980
- 118 Choi I, Yoon SR, Park S-Y, *et al.* Donor-Derived Natural Killer Cells Infused after Human Leukocyte Antigen–Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation: A Dose-Escalation Study. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014; **20**: 696-704

- 119 Frei GM, Persi N, Lador C, *et al.* Nicotinamide, a Form of Vitamin B3, Promotes Expansion of Natural Killer Cells That Display Increased In Vivo Survival and Cytotoxic Activity,. *Blood* 2011; **118**: 4035-4035
- 120 Bachanova V, Maakaron JE, Cichocki F, *et al.* Gda-201, a Novel Metabolically Enhanced Allogeneic Natural Killer (NK) Cell Product Yields High Remission Rates in Patients with Relapsed/Refractory Non-Hodgkin Lymphoma (NHL): 2-Year Survival and Correlation with Cytokine IL7. *Blood* 2021; **138**: 3854-3854
- 121 Vela M, Corral D, Carrasco P, *et al.* Haploidentical IL-15/41BBL activated and expanded natural killer cell infusion therapy after salvage chemotherapy in children with relapsed and refractory leukemia. *Cancer Lett* 2018; **422**: 107-117
- 122 Gómez García LM, Escudero A, Mestre C, *et al.* Phase 2 Clinical Trial of Infusing Haploidentical K562-mb15-41BBL–Activated and Expanded Natural Killer Cells as Consolidation Therapy for Pediatric Acute Myeloblastic Leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2021; **21**: 328-337.e1
- 123 Ciurea SO, Bassett R, Soebbing D, *et al.* Improved Outcomes for Patients Receiving High-Doses of IL-21 Ex Vivo Expanded NK Cells after Haploidentical Transplantation (haploSCT): Long-Term Follow-up of a Phase 1/2 Clinical Trial with Comparison to CIBMTR Controls. *Blood* 2019; **134**: 700-700
- 124 Ciurea SO, Schafer JR, Bassett R, *et al.* Phase 1 clinical trial using mbIL21 ex vivo–expanded donor-derived NK cells after haploidentical transplantation. *Blood* 2017; **130**: 1857-1868
- 125 Klingemann H, Boissel L, Toneguzzo F. Natural Killer Cells for Immunotherapy – Advantages of the NK-92 Cell Line over Blood NK Cells. *Front Immunol* 2016; **7**
- 126 Gong JH, Maki G, Klingemann HG. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* 1994; **8**: 652-658
- 127 Tarn YK, Martinson JA, Doligosa K, *et al.* Ex vivo expansion of the highly cytotoxic human natural killer cell line NK-92 under current good manufacturing practice conditions for clinical adoptive cellular immunotherapy. *Cytotherapy* 2003; **5**: 259-272
- 128 Boyiadzis M, Agha M, Redner RL, *et al.* Phase 1 clinical trial of adoptive immunotherapy using “off-the-shelf” activated natural killer cells in patients with refractory and relapsed acute myeloid leukemia. *Cytotherapy* 2017; **19**: 1225-1232
- 129 Williams BA, Law AD, Routy B, *et al.* A phase I trial of NK-92 cells for refractory hematological malignancies relapsing after autologous hematopoietic cell transplantation shows safety and evidence of efficacy. *Oncotarget* 2017; **8**: 89256-89268

- 130 Carlsten M, Childs RW. Genetic Manipulation of NK Cells for Cancer Immunotherapy: Techniques and Clinical Implications. *Front Immunol* 2015; **6**
- 131 Miller JS, Tessmer-Tuck J, Blake N, *et al.* Endogenous IL-2 production by natural killer cells maintains cytotoxic and proliferative capacity following retroviral-mediated gene transfer. *Exp Hematol* 1997; **25**: 1140-1148
- 132 Liu E, Tong Y, Dotti G, *et al.* Cord blood NK cells engineered to express IL-15 and a CD19-targeted CAR show long-term persistence and potent antitumor activity. *Leukemia* 2018; **32**: 520-531
- 133 Kerjean Elodie. L'immunothérapie : cellules T à récepteurs antigéniques chimériques, inhibiteurs de check-points et anticorps bispécifique. 2020; **26**: 82-89
- 134 Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. The Basic Principles of Chimeric Antigen Receptor Design. *Cancer Discov* 2013; **3**: 388-398
- 135 Sadelain M. Chimeric antigen receptors: driving immunology towards synthetic biology. *Curr Opin Immunol* 2016; **41**: 68-76
- 136 Chmielewski M, Abken H. TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert Opin Biol Ther* 2015; **15**: 1145-1154
- 137 Wang M, Munoz J, Goy A, *et al.* KTE-X19 CAR T-Cell Therapy in Relapsed or Refractory Mantle-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 2020; **382**: 1331-1342
- 138 Munshi NC, Anderson LD, Shah N, *et al.* Idecabtagene Vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 2021; **384**: 705-716
- 139 Neelapu SS. Managing the toxicities of CAR T-cell therapy. *Hematol Oncol* 2019; **37**: 48-52
- 140 Yang Y, Jacoby E, Fry TJ. Challenges and opportunities of allogeneic donor-derived CAR T cells. *Curr Opin Hematol* 2015; **22**: 509-515
- 141 Passweg JR, Tichelli A, Meyer-Monard S, *et al.* Purified donor NK-lymphocyte infusion to consolidate engraftment after haploidentical stem cell transplantation. *Leukemia* 2004; **18**: 1835-1838
- 142 Olson JA, Leveson-Gower DB, Gill S, *et al.* NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. *Blood* 2010; **115**: 4293-4301
- 143 Jaiswal SR, Zaman S, Nedunchezian M, *et al.* CD56-enriched donor cell infusion after post-transplantation cyclophosphamide for haploidentical transplantation of advanced myeloid malignancies is associated with prompt reconstitution of mature natural killer cells and regulatory T cells with reduced incidence of acute graft versus host disease: A pilot study. *Cytotherapy* 2017; **19**: 531-542
- 144 Liu E, Marin D, Banerjee P, *et al.* Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *N Engl J Med* 2020; **382**: 545-553

- 145 Xie G, Dong H, Liang Y, *et al.* CAR-NK cells: A promising cellular immunotherapy for cancer. *EBioMedicine* 2020; **59**: 102975
- 146 Ebrahimiyan H, Tamimi A, Shokoohian B, *et al.* Novel insights in CAR-NK cells beyond CAR-T cell technology; promising advantages. *Int Immunopharmacol* 2022; **106**: 108587
- 147 Verneris MR, Miller JS. The phenotypic and functional characteristics of umbilical cord blood and peripheral blood natural killer cells. *Br J Haematol* 2009; **147**: 185-191
- 148 Mehta RS, Shpall EJ, Rezvani K. Cord Blood as a Source of Natural Killer Cells. *Front Med* 2016; **2**
- 149 Sarvaria A, Jawdat D, Madrigal JA, *et al.* Umbilical Cord Blood Natural Killer Cells, Their Characteristics, and Potential Clinical Applications. *Front Immunol* 2017; **8**
- 150 Woll PS, Grzywacz B, Tian X, *et al.* Human embryonic stem cells differentiate into a homogeneous population of natural killer cells with potent in vivo antitumor activity. *Blood* 2009; **113**: 6094-6101
- 151 Luevano M, Madrigal A, Saudemont A. Generation of natural killer cells from hematopoietic stem cells in vitro for immunotherapy. *Cell Mol Immunol* 2012; **9**: 310-320
- 152 Knorr DA, Ni Z, Hermanson D, *et al.* Clinical-Scale Derivation of Natural Killer Cells From Human Pluripotent Stem Cells for Cancer Therapy. *Stem Cells Transl Med* 2013; **2**: 274-283
- 153 Boissel L, Betancur M, Lu W, *et al.* Retargeting NK-92 cells by means of CD19- and CD20-specific chimeric antigen receptors compares favorably with antibody-dependent cellular cytotoxicity. *OncoImmunology* 2013; **2**: e26527
- 154 Lang S, Vujanovic NL, Wollenberg B, *et al.* Absence of B7.1-CD28/CTLA-4-mediated co-stimulation in human NK cells. *Eur J Immunol* 1998; **28**: 780-786
- 155 Li Y, Hermanson DL, Moriarity BS, *et al.* Human iPSC-Derived Natural Killer Cells Engineered with Chimeric Antigen Receptors Enhance Anti-tumor Activity. *Cell Stem Cell* 2018; **23**: 181-192.e5
- 156 Xu Y, Liu Q, Zhong M, *et al.* 2B4 costimulatory domain enhancing cytotoxic ability of anti-CD5 chimeric antigen receptor engineered natural killer cells against T cell malignancies. *J Hematol Oncol* 2019; **12**: 49
- 157 Billadeau DD, Upshaw JL, Schoon RA, *et al.* NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway. *Nat Immunol* 2003; **4**: 557-564
- 158 Lanier LL, Corliss B, Wu J, *et al.* Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity* 1998; **8**: 693-701

- 159 Daher M, Rezvani K. Outlook for New CAR-Based Therapies with a Focus on CAR NK Cells: What Lies Beyond CAR-Engineered T Cells in the Race against Cancer. *Cancer Discov* 2021; **11**: 45-58
- 160 Parihar R, Rivas C, Huynh M, *et al.* NK Cells Expressing a Chimeric Activating Receptor Eliminate MDSCs and Rescue Impaired CAR-T Cell Activity against Solid Tumors. *Cancer Immunol Res* 2019; **7**: 363-375
- 161 Matosevic S. Viral and Nonviral Engineering of Natural Killer Cells as Emerging Adoptive Cancer Immunotherapies. *J Immunol Res* 2018; **2018**: 1-20
- 162 Lu H, Zhao X, Li Z, *et al.* From CAR-T Cells to CAR-NK Cells: A Developing Immunotherapy Method for Hematological Malignancies. *Front Oncol* 2021; **11**: 720501
- 163 Themeli M, Kloss CC, Ciriello G, *et al.* Generation of tumor-targeted human T lymphocytes from induced pluripotent stem cells for cancer therapy. *Nat Biotechnol* 2013; **31**: 928-933
- 164 Themeli M, Rivière I, Sadelain M. New Cell Sources for T Cell Engineering and Adoptive Immunotherapy. *Cell Stem Cell* 2015; **16**: 357-366
- 165 Tang X, Yang L, Li Z, *et al.* First-in-man clinical trial of CAR NK-92 cells: safety test of CD33-CAR NK-92 cells in patients with relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Am J Cancer Res* 2018; **8**: 1083-1089
- 166 Goodridge JP, Mahmood S, Zhu H, *et al.* FT596: Translation of First-of-Kind Multi-Antigen Targeted Off-the-Shelf CAR-NK Cell with Engineered Persistence for the Treatment of B Cell Malignancies. *Blood* 2019; **134**: 301-301
- 167 Chiossone L, Dumas P-Y, Vienne M, *et al.* Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nat Rev Immunol* 2018; **18**: 671-688
- 168 Molina A. A Decade of Rituximab: Improving Survival Outcomes in Non-Hodgkin's Lymphoma. *Annu Rev Med* 2008; **59**: 237-250
- 169 Kaplon H, Muralidharan M, Schneider Z, *et al.* Antibodies to watch in 2020. *mAbs* 2020; **12**: 1703531
- 170 Felices M, Lenvik TR, Kodala B, *et al.* Potent Cytolytic Activity and Specific IL15 Delivery in a 2nd Generation Trispecific Killer Engager. *Cancer Immunol Res* July 2020: canimm.0837.2019
- 171 Felices M, Lenvik TR, Davis ZB, *et al.* Generation of BiKEs and TriKEs to Improve NK Cell-Mediated Targeting of Tumor Cells. In Somanchi SS, ed. *Natural Killer Cells*. Vol 1441. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, 2016; 333-346.
- 172 Davis ZB, Vallera DA, Miller JS, *et al.* Natural killer cells unleashed: Checkpoint receptor blockade and BiKE/TriKE utilization in NK-mediated anti-tumor immunotherapy. *Semin Immunol* 2017; **31**: 64-75

- 173 Kerbauy LN, Marin ND, Kaplan M, *et al.* Combining AFM13, a Bispecific CD30/CD16 Antibody, with Cytokine-Activated Blood and Cord Blood-Derived NK Cells Facilitates CAR-like Responses Against CD30+ Malignancies. *Clin Cancer Res* 2021; **27**: 3744-3756
- 174 Schmohl JU, Felices M, Todhunter D, *et al.* Tetraspecific scFv construct provides NK cell mediated ADCC and self-sustaining stimuli via insertion of IL-15 as a cross-linker. *Oncotarget* 2016; **7**: 73830-73844
- 175 Directive 2001/83/CE Du Parlement Européen et Du Conseil Du 6 Novembre 2001 Instituant Un Code Communautaire Relatif Aux Médicaments à Usage Humain.; 2001.
- 176 Règlement (CE) N 1394/2007 Du Parlement Européen et Du Conseil Du 13 Novembre 2007 Concernant Les Médicaments de Thérapie Innovante et Modifiant La Directive 2001/83/CE Ainsi Que Le Règlement (CE) No 726/2004.; 2007.
- 177 Mahalatchimy A, De Grove-Valdeyron N. Chapitre 2. Les essais cliniques de médicaments de thérapie innovante : quel avenir pour la réglementation européenne ? *J Int Bioéthique Déthique Sci* 2018; **29**: 35
- 178 Loi N° 2011-302 Du 22 Mars 2011 Du Code de Santé Publique. Vol 2011-302.; 2011.
- 179 Chabannon C, Sabatier F, Rial-Sebbag E, *et al.* Les unités de thérapie cellulaire à l'épreuve de la réglementation sur les médicaments de thérapie innovante. *médecine/sciences* 2014; **30**: 576-583
- 180 Bonnaud-Vrignaud.F, Benjelloun Zahar.M, Dréno.B. Les médicaments de thérapie innovante préparés ponctuellement (The French Hospital exemption regarding ATMP). 2015; **29**
- 181 Guidelines Published in Volume 4 of EudraLex (https://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4_en); 2017.
- 182 Directive 2003/94/CE de La Commission Du 8 Octobre 2003 Établissant Les Principes et Lignes Directrices de Bonnes Pratiques de Fabrication Concernant Les Médicaments à Usage Humain et Les Médicaments Expérimentaux à Usage Humain. Vol 2003/94/CE.; 2003.
- 183 Cuende N, Ciccocioppo R, Forte M, *et al.* Patient access to and ethical considerations of the application of the European Union hospital exemption rule for advanced therapy medicinal products. *Cytotherapy* 2022; **24**: 686-690
- 184 Décret N° 2012-1236 Du 6 Novembre 2012 Relatif Aux Médicaments de Thérapie Innovante. Vol 2012-1236.; 2012.
- 185 Règlement (CE) No 726/2004 Du Parlement Européen et Du Conseil Du 31 Mars 2004 Établissant Des Procédures Communautaires Pour l'autorisation et La Surveillance En Ce Qui Concerne Les Médicaments à Usage Humain et à Usage Vétérinaire, et Instituant Une Agence Européenne Des Médicaments. Vol 726/2004.; 2004.

- 186 Chabannon C, Mfarrej B, Guia S, *et al.* Manufacturing Natural Killer Cells as Medicinal Products. *Front Immunol* 2016; **7**
- 187 Pomeroy EJ, Hunzeker JT, Kluesner MG, *et al.* A Genetically Engineered Primary Human Natural Killer Cell Platform for Cancer Immunotherapy. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 2020; **28**: 52-63
- 188 Koehl U, Brehm C, Huenecke S, *et al.* Clinical grade purification and expansion of NK cell products for an optimized manufacturing protocol. *Front Oncol* 2013; **3**: 118
- 189 Kao I-T, Yao C-L, Kong Z-L, *et al.* Generation of Natural Killer Cells from Serum-Free, Expanded Human Umbilical Cord Blood CD34⁺ Cells. *Stem Cells Dev* 2007; **16**: 1043-1052
- 190 Herrera L, Santos S, Vesga MA, *et al.* Adult peripheral blood and umbilical cord blood NK cells are good sources for effective CAR therapy against CD19 positive leukemic cells. *Sci Rep* 2019; **9**: 18729
- 191 Tanaka H, Kai S, Yamaguchi M, *et al.* Analysis of natural killer (NK) cell activity and adhesion molecules on NK cells from umbilical cord blood: **NK cell activity in cord blood**. *Eur J Haematol* 2003; **71**: 29-38
- 192 Dalle J-H, Menezes J, Wagner É, *et al.* Characterization of Cord Blood Natural Killer Cells: Implications for Transplantation and Neonatal Infections. *Pediatr Res* 2005; **57**: 649-655
- 193 Lin S-J, Kuo M-L. Cytotoxic Function of Umbilical Cord Blood Natural Killer Cells: Relevance to Adoptive Immunotherapy. *Pediatr Hematol Oncol* 2011; **28**: 640-646
- 194 Bock AM, Knorr D, Kaufman DS. Development, Expansion, and In vivo Monitoring of Human NK Cells from Human Embryonic Stem Cells (hESCs) and Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs). *J Vis Exp* 2013
- 195 Goldenson BH, Hor P, Kaufman DS. iPSC-Derived Natural Killer Cell Therapies - Expansion and Targeting. *Front Immunol* 2022; **13**: 841107
- 196 Zeng J, Tang SY, Toh LL, *et al.* Generation of “Off-the-Shelf” Natural Killer Cells from Peripheral Blood Cell-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rep* 2017; **9**: 1796-1812
- 197 Zhu H, Kaufman DS. An Improved Method to Produce Clinical-Scale Natural Killer Cells from Human Pluripotent Stem Cells. In Kaneko S, ed. *In Vitro Differentiation of T-Cells*. Vol 2048. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York, 2019; 107-119.
- 198 Maali A, Atashi A, Ghaffari S, *et al.* A Review on Leukemia and iPSC Technology: Application in Novel Treatment and Future. *Curr Stem Cell Res Ther* 2018; **13**: 665-675
- 199 Klingemann HG, Wong E, Maki G. A cytotoxic NK-cell line (NK-92) for ex vivo purging of leukemia from blood. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 1996; **2**: 68-75

- 200 Karvouni M, Vidal-Manrique M, Lundqvist A, *et al.* Engineered NK Cells Against Cancer and Their Potential Applications Beyond. *Front Immunol* 2022; **13**: 825979
- 201 Tonn T, Schwabe D, Klingemann HG, *et al.* Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92. *Cytotherapy* 2013; **15**: 1563-1570
- 202 Elahi R, Heidary AH, Hadiloo K, *et al.* Chimeric Antigen Receptor-Engineered Natural Killer (CAR NK) Cells in Cancer Treatment; Recent Advances and Future Prospects. *Stem Cell Rev Rep* 2021; **17**: 2081-2106
- 203 Arai S, Meagher R, Swearingen M, *et al.* Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial. *Cytotherapy* 2008; **10**: 625-632
- 204 Bryceson YT, March ME, Ljunggren H-G, *et al.* Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 2006; **107**: 159-166
- 205 Becknell B, Caligiuri MA. Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. *Adv Immunol* 2005; **86**: 209-239
- 206 Choi YH, Lim EJ, Kim SW, *et al.* IL-27 enhances IL-15/IL-18-mediated activation of human natural killer cells. *J Immunother Cancer* 2019; **7**: 168
- 207 Zwirner NW, Domaica CI. Cytokine regulation of natural killer cell effector functions. *BioFactors* 2010; **36**: 274-288
- 208 Floros T, Tarhini AA. Anticancer Cytokines: Biology and Clinical Effects of Interferon- α 2, Interleukin (IL)-2, IL-15, IL-21, and IL-12. *Semin Oncol* 2015; **42**: 539-548
- 209 Lotze MT, Matory YL, Ettinghausen SE, *et al.* In vivo administration of purified human interleukin 2. II. Half life, immunologic effects, and expansion of peripheral lymphoid cells in vivo with recombinant IL 2. *J Immunol Baltim Md 1950* 1985; **135**: 2865-2875
- 210 Ahmadzadeh M, Rosenberg SA. IL-2 administration increases CD4⁺ CD25(hi) Foxp3⁺ regulatory T cells in cancer patients. *Blood* 2006; **107**: 2409-2414
- 211 Levin AM, Bates DL, Ring AM, *et al.* Exploiting a natural conformational switch to engineer an interleukin-2 'superkine'. *Nature* 2012; **484**: 529-533
- 212 Ghasemi R, Lazear E, Wang X, *et al.* Selective targeting of IL-2 to NKG2D bearing cells for improved immunotherapy. *Nat Commun* 2016; **7**
- 213 Romee R, Cooley S, Berrien-Elliott MM, *et al.* First-in-human phase 1 clinical study of the IL-15 superagonist complex ALT-803 to treat relapse after transplantation. *Blood* 2018; **131**: 2515-2527

- 214 Rosario M, Liu B, Kong L, *et al.* The IL-15-Based ALT-803 Complex Enhances FcγRIIIa-Triggered NK Cell Responses and *In Vivo* Clearance of B Cell Lymphomas. *Clin Cancer Res* 2016; **22**: 596-608
- 215 Liu S, Galat V, Galat4 Y, *et al.* NK cell-based cancer immunotherapy: from basic biology to clinical development. *J Hematol Oncol/J Hematol Oncol* 2021; **14**: 7
- 216 Fujisaki H, Kakuda H, Shimasaki N, *et al.* Expansion of Highly Cytotoxic Human Natural Killer Cells for Cancer Cell Therapy. *Cancer Res* 2009; **69**: 4010-4017
- 217 Somanchi SS, Lee DA. Ex Vivo Expansion of Human NK Cells Using K562 Engineered to Express Membrane Bound IL21. In Somanchi SS, ed. Natural Killer Cells. Vol 1441. New York, NY: Springer New York, 2016; 175-193.
- 218 Denman CJ, Senyukov VV, Somanchi SS, *et al.* Membrane-Bound IL-21 Promotes Sustained Ex Vivo Proliferation of Human Natural Killer Cells. Dieli F, ed. *PLoS ONE* 2012; **7**: e30264
- 219 Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, *et al.* Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br J Cancer* 2014; **111**: 1021-1046
- 220 Lee H-R, Son C-H, Koh E-K, *et al.* Expansion of cytotoxic natural killer cells using irradiated autologous peripheral blood mononuclear cells and anti-CD16 antibody. *Sci Rep* 2017; **7**
- 221 Ahn Y-O, Kim S, Kim TM, *et al.* Irradiated and Activated Autologous PBMCs Induce Expansion of Highly Cytotoxic Human NK Cells In Vitro. *J Immunother* 2013; **36**: 373-381
- 222 Oyer JL, Pandey V, Igarashi RY, *et al.* Natural killer cells stimulated with PM21 particles expand and biodistribute in vivo: Clinical implications for cancer treatment. *Cytotherapy* 2016; **18**: 653-663
- 223 Fehniger TA, Miller JS, Stuart RK, *et al.* A Phase 1 Trial of CNDO-109-Activated Natural Killer Cells in Patients with High-Risk Acute Myeloid Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant* 2018; **24**: 1581-1589
- 224 Koh SK, Park J, Kim S-E, *et al.* Natural Killer Cell Expansion and Cytotoxicity Differ Depending on the Culture Medium Used. *Ann Lab Med* 2022; **42**: 638-649
- 225 Fernandez A *et al.* Optimizing the Procedure to Manufacture Clinical-Grade NK Cells for Adoptive Immunotherapy.
- 226 Suck G, Oei VYS, Linn YC, *et al.* Interleukin-15 supports generation of highly potent clinical-grade natural killer cells in long-term cultures for targeting hematological malignancies. *Exp Hematol* 2011; **39**: 904-914
- 227 Pörtner R, Parida SK, Schaffer C, *et al.* Landscape of Manufacturing Process of ATMP Cell Therapy Products for Unmet Clinical Needs. In Sharma R, ed. Stem Cells in Clinical Practice and Tissue Engineering. InTech, 2018.

- 228 Lapteva N, Durett AG, Sun J, *et al.* Large-scale ex vivo expansion and characterization of natural killer cells for clinical applications. *Cytotherapy* 2012; **14**: 1131-1143
- 229 Garcia-Aponte OF, Herwig C, Kozma B. Lymphocyte expansion in bioreactors: upgrading adoptive cell therapy. *J Biol Eng* 2021; **15**: 13
- 230 Meng Y, Sun J, Hu T, *et al.* Rapid expansion in the WAVE bioreactor of clinical scale cells for tumor immunotherapy. *Hum Vaccines Immunother* 2018; **14**: 2516-2526
- 231 Pörtner R, Sebald C, Parida SK, *et al.* Single-Use Bioreactors for Manufacturing of Immune Cell Therapeutics. In Eibl R, Eibl D, eds. *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*. 1st ed. Wiley, 2019; 327-334.
- 232 Bari R, Granzin M, Tsang KS, *et al.* A Distinct Subset of Highly Proliferative and Lentiviral Vector (LV)-Transducible NK Cells Define a Readily Engineered Subset for Adoptive Cellular Therapy. *Front Immunol* 2019; **10**: 2001
- 233 Wang J, Lupo KB, Chambers AM, *et al.* Purinergic targeting enhances immunotherapy of CD73+ solid tumors with piggyBac-engineered chimeric antigen receptor natural killer cells. *J Immunother Cancer* 2018; **6**: 136
- 234 Schmidt P, Raftery MJ, Pecher G. Engineering NK Cells for CAR Therapy—Recent Advances in Gene Transfer Methodology. *Front Immunol* 2021; **11**: 611163
- 235 Lee DA. Cellular therapy: Adoptive immunotherapy with expanded natural killer cells. *Immunol Rev* 2019; **290**: 85-99
- 236 Wagner JA, Rosario M, Romee R, *et al.* CD56bright NK cells exhibit potent antitumor responses following IL-15 priming. *J Clin Invest* 2017; **127**: 4042-4058
- 237 Kundu S, Gurney M, O'Dwyer M. Generating natural killer cells for adoptive transfer: expanding horizons. *Cytotherapy* 2021; **23**: 559-566
- 238 Devillier R, Calmels B, Guia S, *et al.* Phase I Trial of Prophylactic Donor-Derived IL-2-Activated NK Cell Infusion after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation from a Matched Sibling Donor. *Cancers* 2021; **13**: 2673
- 239 Granzin M, Soltenborn S, Müller S, *et al.* Fully automated expansion and activation of clinical-grade natural killer cells for adoptive immunotherapy. *Cytotherapy* 2015; **17**: 621-632
- 240 Childs RW, Berg M. Bringing natural killer cells to the clinic: ex vivo manipulation. *Hematology* 2013; **2013**: 234-246
- 241 Subbiahanadar Chelladurai K, Selvan Christyraj JD, Rajagopalan K, *et al.* Alternative to FBS in animal cell culture - An overview and future perspective. *Heliyon* 2021; **7**: e07686

242 Guideline on Potency Testing of Cell Based Immunotherapy Medicinal Products for the Treatment of Cancer (EMA/CHMP/BWP/271475/06).; 2016.

243 Motzer SA, Tsuji J, Hertig V, *et al.* Natural Killer Cell Cytotoxicity: A Methods Analysis of Versus Flow Cytometry Chromium Release. *Biol Res Nurs* 2003; **5**: 142-152

ANNEXES

TABLE DES ANNEXES

Annexe 1 : CliniMACS Prodigy et dispositif d'échantillonnage

Annexe 2 : Chambre centricult et photo prise avec la chambre centricult

ANNEXE I

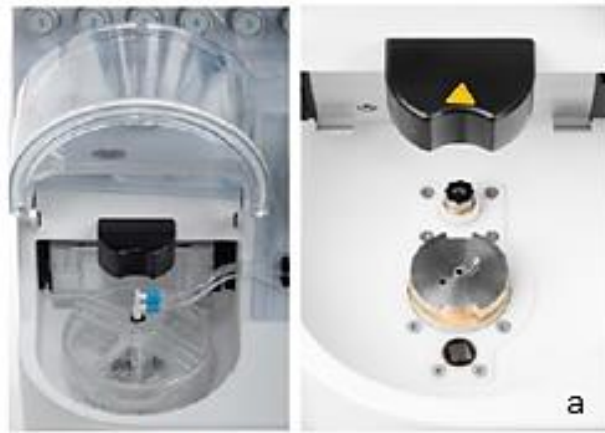


1a) Le ClinMACS Prodigy en cours de purification



1b) Dispositif d'échantillonnage stérile sur le kit du ClinMACS Prodigy

ANNEXE II



2a) Chambre centrifug



2b) Photo des cellules NK en cours d'expansion prise par le CliniMACS Prodigy

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

✂ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

✂ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

✂ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

✂ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.