

Etude de la stabilité du milieu de culture et des couches nourricières utilisés pour la production de MÉDICAMENTS DE THÉRAPIE INNOVANTES-PRÉPARÉS PONCTUELLEMENT (FEUILLETS ÉPIDERMIQUES AUTOLOGUES)

N. Abbassi ; A. Desanlis ; S. Carlier ; P. Pascal ; A. Thépot C. Auxenfans
 BANQUE DE TISSUS ET CELLULES, Groupement Hospitalier Edouard Herriot, Lyon, France.
 Email: abbassi.nacira@gmail.com



INTRODUCTION ET OBJECTIFS

Le règlement européen n 1394/2007 publié en 2007 et son adaptation française de 2011 ont introduit une nouvelle classe de médicaments, les **Médicaments de Thérapie Innovante (MTI)**. Les MTI-Préparés Ponctuellement (MTI-PP) en sont « l'exemption hospitalière ». Notre établissement, autorisé MTI-PP, prépare des feuillets épidermiques (FE), tapis cohésif de kératinocytes humains cultivés indiqués pour le recouvrement des grands brûlés. Nous avons étudié la stabilité du milieu de culture pour kératinocytes (MCK) et des couches nourricières de fibroblastes irradiés (CNI) (péremption à 1 mois), indispensable à la culture des kératinocytes, conformément aux exigences des bonnes pratiques de fabrication.

MATERIELS ET METHODES

Procédé

Etude de stabilité

Condition A
 MCK à 1 mois (5 C 3 C)
 CNI à 10 jours (37 C + 5% de CO₂)

Condition B
 MCK à 1 mois (5 C 3 C)
 CNI à 1 mois (37 C + 5% de CO₂)

Condition C
 MCK à 3 jours (5 C 3 C)
 CNI à 10 jours (37 C + 5% de CO₂)

Impact des conditions de conservation sur les contrôles qualité libérateurs des produits intermédiaires (kératinocytes amplifiés) et du produit fini (FE):

- Stérilité
- Viabilité cellulaire
- Pureté cellulaire (recherche de fibroblastes et de mélanocytes contaminants)
- Intégrité du FE à 24h

Impact des conditions de conservation sur les contrôles qualité informatifs:

- Potentiel prolifératif (méthode CFE)
- Numération des kératinocytes après amplification

(A) Brûlure au second degré

(B) Pose de FE

(C) 16 jours après

 * Indication: Recouvrement des grands brûlés

RESULTATS

Numération et viabilité des kératinocytes après amplification

- Viabilité cellulaire **supérieure à 90%** pour les 3 conditions
- Numération cellulaire **50% supérieure en condition C** par rapport à la condition B (condition A non testée)

Stérilité et Apyrogénicité

- Absence de croissance bactérienne dans tous les milieux utilisés (Bact'Alert®)



- Recherche d'endotoxines réalisée sur 3 lots de MCK => Résultats conformes aux spécifications (5 UI/mL)

Potentiel prolifératif

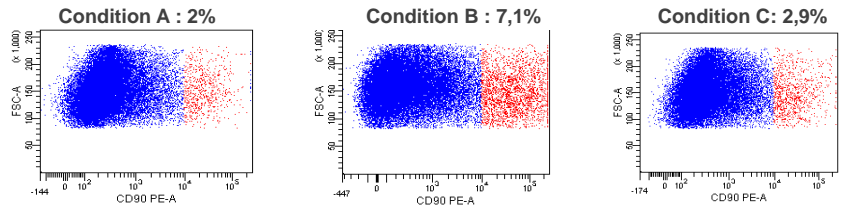
Condition A équivalente à Condition B



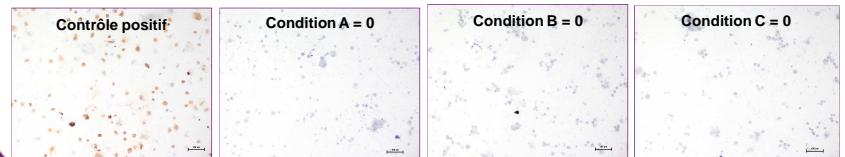
Condition C non testée

Pureté cellulaire => Conforme

Recherche de Fibroblastes contaminants (CD90 < 10%) par Cytométrie en flux



Recherche de Mélanocytes contaminants par Immunocytochimie (cellules HMB45 ≤ 5 / spot)



Intégrité des FE après 24h à T Ambiante

Intégrité des FE des 3 conditions à H0 et H12
 À H24 : 1FE/3 de la condition A était **non conforme** (1 trou)
 Conformité des FE des conditions B et C à H24



DISCUSSION - CONCLUSION

Dans les 3 conditions testées, tous les contrôles libérateurs des kératinocytes amplifiés et des FE sont conformes. Cependant nous avons observé un retard de croissance des kératinocytes dans la condition B par rapport à la condition C, ceci peut s'expliquer par une baisse de sécrétion de facteurs de croissance par les CNI. Ce retard peut être comblé en prolongeant la culture de 12H. La stabilité des FE est de 24H dans les conditions B et C et de 12H dans la condition A. Nous maintenons la péremption du MCK et des CNI à 1 mois en ramenant la péremption des FE à 12H. Ces résultats doivent être confirmés sur deux autres souches de kératinocytes. Ces validations permettent de vérifier les stabilités des FE pour une utilisation optimale et sécurisée chez les grands brûlés.