

Université Claude Bernard Lyon 1
Pôle Finances, Achats, Pilotage - Direction
des Achats

MARCHÉ PUBLIC
MARCHÉ DE SERVICES

Etude de Toxicologie Réglementaire

**Cahier des clauses techniques particulières
(CCTP)**

Consultation n° 24067F

SOMMAIRE

1. OBJET DE LA PRESTATION.....	3
2. CONTEXTE DES PRESTATIONS.....	4
3. CONDITIONS DE RÉALISATION DES PRESTATIONS	4
4. VÉRIFICATION DES PRESTATIONS	4
5. DÉTAIL DES PRESTATIONS	5

Sélectionner le sommaire, appuyer sur la touche F9 (ou Fn+F9) pour mettre à jour la numérotation des pages.

1. OBJET DE LA PRESTATION

■ Objet de la prestation :

Le contrat porte sur les prestations suivantes : Etude de Toxicologie Réglementaire pré-clinique

Le Réseau Hospitalo-Universitaire (RHU) SyStInn porté par le Pr Dumontet et soutenu par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) a pour objectif d'évaluer le potentiel anticancéreux d'un stimulant du système immunitaire inné en clinique, HEPHA-440. En vue d'obtenir une approbation d'utilisation chez l'humain par les agences réglementaires de santé, il est nécessaire au préalable de tester la toxicité d'HEPHA-440 chez l'animal sur l'ensemble de l'organisme selon les normes en vigueur appelées « Bonnes Pratiques de Laboratoire » (BPL).

■ Lieu d'exécution :

Le lieu d'exécution des prestations est :

CRCL Equipe OncoPharmacologie-
UMR INSERM 1052 -CNRS 5286
Faculté Rockefeller
4ème étage escalier B
8 avenue Rockefeller
69008 Lyon.

■ Intervenants :

Les prestations sont réalisées pour le compte de l'acheteur **Université Claude Bernard Lyon 1**, représenté par Université Claude Bernard Lyon 1.

Adresse et coordonnées :

Bâtiment Julie Victoire Daubié
43 boulevard du 11 novembre 1918
Villeurbanne
69622 Villeurbanne Cedex
Courriel : achats@univ-lyon1.fr

■ Structure et forme du contrat

Les prestations sont décomposées comme suit en **5 tranches**.

La forme retenue pour l'exécution du contrat est **à tranches**.

Consultation

Etude de Toxicologie Réglementaire pré-clinique : Le Réseau Hospitalo-Universitaire (RHU) SyStInn porté par le Pr Dumontet et soutenu par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) a pour objectif d'évaluer le potentiel anticancéreux d'un stimulant du système immunitaire inné en clinique, HEPHA-440. En vue d'obtenir une approbation d'utilisation chez l'humain par les agences réglementaires de santé, il est nécessaire au préalable de tester la toxicité d'HEPHA-440 chez l'animal sur l'ensemble de l'organisme selon les normes en vigueur appelées « Bonnes Pratiques de Laboratoire » (BPL).

Tranche 1 (ferme)

Transfert et validation de la méthode analytique

Tranche 2 (ferme)

Escalade de dose

Tranche 3 (optionnelle)

Développement et validation d'un test de recherche d'anticorps anti-médicament (ADAs)

Tranche 4 (optionnelle)	Etude de toxicologie BPL
Tranche 5 (optionnelle)	Recherche d'ADAs

Définitions :

Tranche : La tranche ferme est exécutée de manière certaine, les tranches optionnelles sont affirmées ou non en cours d'exécution

2. CONTEXTE DES PRESTATIONS

■ Contexte :

Le Réseau Hospitalo-Universitaire (RHU) SyStInn porté par le Pr Dumontet et soutenu par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) a pour objectif d'évaluer le potentiel anticancéreux d'un stimulant du système immunitaire inné en clinique, HEPHA-440. En vue d'obtenir une approbation d'utilisation chez l'humain par les agences réglementaires de santé, il est nécessaire au préalable de tester la toxicité d'HEPHA-440 chez l'animal sur l'ensemble de l'organisme selon les normes en vigueur appelées « Bonnes Pratiques de Laboratoire » (BPL).

■ Données relatives au lieu de réalisation des prestations :

3. CONDITIONS DE RÉALISATION DES PRESTATIONS

■ Normes et réglementation applicables : Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL)

■ Obligations techniques et opérationnelles :

■ Spécifications techniques :

- **Planning de réalisation des prestations** : Afin que le l'acheteur et le candidat s'accordent sur le planning de l'étude, les candidats proposeront en réponse à l'appel d'offre un planning détaillé (date de démarrage possible de l'étude, dates de démarrage de chaque tranche, dates d'administration d'HEPHA-440 aux différents groupes de lapins, durées d'analyse, de rédaction des rapports etc.), incluant les Prestations de Service Eventuelles (PSE).

4. VÉRIFICATION DES PRESTATIONS

- **Réception et contrôle des prestations** : pour chacune des prestations suivantes, un rapport est attendu contenant les résultats bruts et les analyses et conclusions :
 - Transfert et validation de la méthode BPL
 - Escalade de dose
 - Développement et validation d'un test de recherche d'anticorps anti-médicament (ADAs)
 - Etude de toxicologie BPL, incluant la recherche d'ADAs si la tranche 5 est affirmée. Ce rapport devra être dans un format conforme à ce qui est attendu par les autorités de santé dans la demande d'autorisation d'essai clinique.

5. DÉTAIL DES PRESTATIONS

Les flacons d'HEPHA-440 en PBS seront à conserver à 4°C. Ils seront dilués dans une solution de NaCl 0.9% à la concentration appropriée avant administration.

1. Tranche 1 : Transfert et validation des méthodes analytiques

Une méthode préalablement établie pour quantifier HEPHA-440 sera transférée au candidat en charge de l'étude, puis validée selon les standards BPL. Cette méthode bioanalytique doit répondre aux directives ICH-M10, garantissant différents critères comme la sélectivité, l'effet matrice, la précision, la stabilité, etc.

Trois méthodes de quantification sont en cours de développement :

- Pour les dosages en formulation et dans le sang :
 - ELISA spécifique du lipooligosaccharide A (LOS-A) de *Bordetella pertussis*
 - Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-MS/HRMS) du domaine lipidique A. Le lipide A est clivé de la substance active par une hydrolyse acide douce, extrait de la matrice sanguine par extraction liquide/liquide ou par extraction en phase solide, puis analysé par LC-MS/HRMS. La séparation est réalisée en mode phase inversée sur une phase stationnaire C8, l'ionisation est effectuée en mode négatif par ionisation électrospray (ESI-) et l'analyse de masse se fait avec une résolution de $R_s = 70\,000$ pour une détermination précise des masses. Le spectromètre utilisé pour le développement de cette méthode est un spectromètre de masse hybride quadropôle-Orbitrap Q Exactive Plus, couplé à un système HPLC UltiMate 3000.
- Pour les dosages en formulation et dans le sang :
 - Analyse HPLC-CAD d'HEPHA-440

La ou les méthodes les plus sensibles et robustes seront choisies pour être transférées au candidat et utilisées pour doser HEPHA-440 tout au long des études de pharmacocinétique.

Les échantillons de plasma devront être conservés à -20°C avant l'étude analytique.

2. Tranche 2 : Recherche de la dose maximale (DRF – Dose Range Finding)

Paramètres	Spécifications
Objectif	Administration de doses croissantes pour déterminer la dose la plus élevée non sévèrement toxique (HNSTD).
Statut	Non réglementaire.
Animaux	Lapins néo-zélandais de 2 à 4 mois 3 mâles/dose Total : 12 à 23 lapins (dépendamment de la dose maximale)
Groups	<ul style="list-style-type: none">- Un groupe par niveau de dose. Doses croissantes jusqu'à ce que la dose la plus élevée non sévèrement toxique (HNSTD) soit atteinte*. <p>NB : Les groupes traités aux différents niveaux de dose seront démarrés avec un délai d'environ deux semaines entre chaque niveau de dose, c'est-à-dire que le groupe avec la 1^{ère} dose recevra la première administration en semaine 1, le groupe avec le 2^{ème} niveau de dose recevra la première administration en semaine 3, etc.</p> <ul style="list-style-type: none">- Un groupe contrôle (NaCl 0.9%) sera démarré en même temps que le groupe recevant le 1^{er} niveau de dose (avec des prélèvements sanguins suivant le même schéma).- Un groupe avec HEPHA-440 à la HNSTD + anti-inflammatoires** (commencés dès identification de la HNSTD)- Deux animaux pourraient être ajoutés pour confirmer la HNSTD
Posologie	3 perfusions intraveineuses de 30 min à intervalles de 2 semaines
Planning des prises de sang	<ul style="list-style-type: none">- Pour la pharmacocinétique : T_0 $T_{30'}$ T_{1h} T_{2h} T_{4h} T_{6h} T_{12h} T_{24h} pour toutes les administrations + T_{48h} T_{72h} T_{96h} T_{144h} pour les administrations 1 et 2- Pour les paramètres biochimiques : T_0 T_{6h} T_{24h} pour toutes les administrations + T_{48h} pour les administrations 1 et 2- Pour les cytokines : T_0 T_{2h} T_{6h} pour chaque administration

	Total : 2 x 8 + 12 = 28 prises de sang par lapin
Sacrifice	24h après la 3ème (et dernière) perfusion
Paramètres mesurés	Observation des animaux : <ul style="list-style-type: none"> - Signes cliniques de détresse, mortalité, prostration, diarrhée, vomissements + observation du comportement des animaux pour détecter les effets toxiques potentiels sur le système cardiaque, respiratoire ou nerveux – après chaque perfusion et 3 fois par semaine - Mesure du poids et de la consommation de nourriture - 3 fois par semaine - Observation au site d'injection (tolérance locale) - 4h et 24h après chaque perfusion Mesure de température – avant et 1h, 2h, 4h, 8h, 24h après chaque perfusion Pharmacocinétique (PK) : dosage (ELISA or LC-MS/MS) sur échantillons de sang <ul style="list-style-type: none"> - Comme preuve d'exposition pour tous les groupes – avant et à la fin de chaque perfusion (c'est-à-dire T₀ and T_{30'}) - Pour un profil détaillé de PK (<i>voir annexe 1.1</i>) à la HNSTD – avant et 30 min, 1h, 2h, 4h, 6h, 12h, 24h après chaque perfusion + 48h, 72h, 96h, 144h après les perfusions 1 and 2 Analyses de sang : Hématologie, paramètres de coagulation chimie clinique (<i>annexes 1.2 à 1.4</i>) et C-Reactive Protein (CRP) - 6h, 24h après chaque perfusion + 48h après les perfusions 1 and 2 Analyses anatomopathologiques : autopsie macroscopique + collection, pesée et mise en paraffine des organes d'intérêt majeur (foie, reins, cœur, rate, ganglions lymphatiques autour du site d'injection et moelle osseuse) Pharmacodynamique (Prestation Supplémentaire Eventuelle) : quantification des cytokines des voies de signalisation TLR4 (IL-1β et/ou TNFα pour la voie Myd88, CCL5 et/ou CXCL10 pour la voie TRIF) par ELISA ou qPCR - 2h et 6h après chaque perfusion

T₀ correspond au début de la perfusion et T_{30'} à la fin de la perfusion.

* Chaque niveau de dose sera discuté et choisi avec le sponsor.

- Si aucun effet indésirable (AE) à la dose_n : augmentation de 100 %, c'est-à-dire dose_{n+1} = dose_n × 2
- Si AE modéré chez 1/3 des animaux à la dose_n : augmentation de 33%, c'est-à-dire dose_{n+1} = dose_n × 1.33
- Si AE modéré chez 2/3 des animaux à la dose_n : HNSTD identifié ou inclure plus d'animaux (dépendamment de l'AE)
- Si AE modéré chez 3/3 des animaux à la dose_n : HNSTD identifié
- Si AE sévère chez 1/3 des animaux, mais aucun AE chez les autres à la dose_n : inclure plus d'animaux
- Si AE sévère chez ≥1/3 des animaux et AE modéré chez les autres à la dose_n : Dose Toxique Sévère (STD) identifié → diminuer à un niveau de dose entre dose_n et dose_{n-1} pour se rapprocher de la HNSTD.

Le NOAEL sera également déterminé pendant cette escalade de dose, comme la dose la plus élevée sans aucun AE observé.

NB : Une hypothermie transitoire, modérée et gérable ne doit pas être considérée comme un effet indésirable dans ce contexte et sera probablement observée à la dose qui sera définie comme la NOAEL.

** Le médicament anti-inflammatoire peut être un stéroïde ou un anti-inflammatoire non stéroïdien, en fonction de ce qui est généralement utilisé pour soulager l'inflammation/la douleur chez les lapins.

3. Tranche 3 optionnelle : Développement et validation d'un test de recherche d'anticorps anti-médicament (ADAs)

4. Tranche 4 : Étude complète de toxicologie conforme aux Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL)

Paramètres	Spécifications
Objectif	Caractérisation complète de la toxicité et de la toxicocinétique d'HEPHA-440
Statut	Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL)
Animaux	Lapins néo-zélandais de 3.5 mois (âge lors de la 1 ^{ère} administration) 3 mâles+3 femelles pour les groupes « sacrifice terminal » (toutes les doses) 2 mâles+2 femelles pour les groupes « récupération » (control and HNSTD) Total : 6x4 + 4x2 = 32 lapins.
Groupes	<ul style="list-style-type: none"> - Contrôle (Volume de PBS similaire à ce qui est dans le groupe HNSTD dilué dans du NaCl 0.9%) - Dose élevée (HNSTD) - Dose intermédiaire (moyenne géométrique de la HNSTD et NOAEL) - Dose faible (NOAEL)
Posologie	3 perfusions intraveineuses de 30 min à intervalles de 2 semaines
Planning des prises de	- Pour la pharmacocinétique : T ₀ T _{30'} T _{24h} pour toutes les administrations + 3

sang	<p>autres temps basés sur les profils de PK observés pendant la DRF</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pour les paramètres biochimiques : T₀ T_{6h} T_{24h} pour toutes les administrations + T_{48h} pour les administrations 1 et 2 + avant le sacrifice des lapins du groupe « récupération » (J₅₇) - Pour les cytokines : T₀ T_{2h} T_{6h} pour chaque administration - Pour les analyses potentielles de désensibilisation : avant la 1^{ère} administration (T₀), après la 3^{ème} perfusion (J₂₉) et avant de sacrifier les animaux du groupes « récupération » (J₅₇) <p>Total :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pour les animaux des groupes « sacrifice terminal » : 2 x 8 + 4 = 28 prises de sang par lapin - Pour les animaux des groupes « récupération » : 2 x 8 + 4 + 1 = 23 prises de sang par lapin
Sacrifice	<p>24h après la 3^{ème} (et dernière) perfusion pour le groupe « sacrifice terminal »</p> <ul style="list-style-type: none"> - 4 semaines après la 3^{ème} (et dernière) perfusion pour le groupe « récupération », cad à J₅₇
Paramètres mesurés	<p>Observation des animaux :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Signes cliniques de détresse, mortalité, prostration, diarrhée, vomissements – après chaque administration et 3 fois par semaine - Mesure du poids et de la consommation de nourriture - 3 fois par semaine - Observation au site d'injection (tolérance locale) - 4h et 24h après chaque perfusion <p>Pharmacologie de sécurité :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Etude respiratoire : quantification des inspiration/expirations - Etude neurologique : batterie fonctionnelle d'observation (FOB) - Observation attentive du comportement et de la mobilité des animaux pour détecter une toxicité cardiaque éventuelle <p>Mesure de température - avant et 1h, 2h, 4h, 8h, 24h après chaque perfusion</p> <p>Etude ophtalmoscopique - après la 1^{ère} perfusion dans chaque groupe + après les 2^{ème} et 3^{ème} perfusions si un effet est observé après la 1^{ère} perfusion + avant sacrifice pour les lapins du groupe « récupération » (cad J₅₇)</p> <p>Pharmacocinétique (PK) : dosage (ELISA or LC-MS/MS) sur échantillons de sang pour déterminer la PK (voir <i>annexe 1.1</i>) - avant perfusion et après 30 min, 24h + autres temps basés sur les profils de PK observés durant le DRF - pour les groupes « sacrifice terminal » uniquement.</p> <p>Analyses de sang : Hématologie, paramètres de coagulation chimie clinique (<i>annexes 1.2 à 1.4</i>) et C-Reactive Protein (CRP) - 6h, 24h, 48h (quand c'est possible) après chaque perfusion et avant sacrifice pour les lapins du groupe « récupération » (cad J₅₇)</p> <p>Analyses anatomopathologiques : autopsie macroscopique, pesée des organes et histopathologie complète standard (voir liste en <i>annexe 2</i>)</p> <p>Pharmacodynamique (Prestation Supplémentaire Eventuelle) : quantification des cytokines des voies de signalisation TLR4 (IL-1β et/ou TNFα pour la voie Myd88, CCL5 et/ou CXCL10 pour la voie TRIF) par ELISA ou qPCR - 2h et 6h après chaque perfusion</p> <p>Désensibilisation (Tranche 5 optionnelle : à faire uniquement si les paramètres mesurés après chaque administration pendant la DRF suggèrent une désensibilisation) : ELISA sur échantillons sanguins pour détecter la présence d'anticorps anti-médicament (ADAs) - avant traitement, après la 3^{ème} perfusion et avant de sacrifier les lapins du groupe « récupération »</p>

T₀ correspond au début de la perfusion et T_{30'} à la fin de la perfusion.

Si possible, 1 mL de sang supplémentaire sera collecté à T₀, T_{2h}, T_{6h} et T_{24h} pour chaque lapin. Le plasma et les leucocytes seront séparés et collectés, puis envoyés à l'acheteur (UCBL, Lyon). Les organes inclus dans de la paraffine seront également envoyés à l'acheteur.

Annexe 1 : Paramètres de mesure (données à mesurer ou à calculer et à inclure dans le rapport)

1.1. Pharmacocinétique

Concentration théorique au temps 0 (C₀)
Concentration maximale observée (C_{max})
Temps auquel C_{max} a été observée (t_{max})
Dernier point de mesure où la dernière concentration mesurable de HEPHA-440 a été observée (t_{last})
Aire sous la courbe concentration/temps de t₀ à t_{inf} théorique (AUC_{0-inf})
Aire sous la courbe concentration/temps de t₀ à t_{last} (AUC_{tlast})
Demi-vie (t_{1/2})

Clairance totale de l'organisme (Cl)
Volume de distribution (Vd)
Rapport entre AUC_{last} après les administrations 2/3 et AUC_{last} après l'administration 1 (RAUC-inj2/RAUC-inj3)
C₀/Dose
C_{max}/Dose
AUC_{last}/Dose

1.2. Hématologie

Numération des globules rouges
Concentration en hémoglobine
Hématocrite
Volume corpusculaire moyen
Concentration moyenne en hémoglobine corpusculaire
Hémoglobine corpusculaire moyenne
Nombre de réticulocytes
Nombre de plaquettes
Nombre de globules blancs
Nombre de neutrophiles
Nombre de lymphocytes
Nombre de monocytes
Nombre de éosinophiles
Nombre de basophiles
Nombre de grandes cellules non colorées

1.3. Paramètres de coagulation

Temps de thromboplastine partielle activée
Fibrinogène
Temps de prothrombine
Qualité de l'échantillon

1.4. Chimie clinique

Alanine aminotransférase (ALAT)
Aspartate aminotransférase (ASAT)
Phosphatase alcaline (PA)
Gamma-glutamyltransférase (GGT)
Bilirubine totale
Bilirubine non conjuguée
Azote uréique
Créatinine
Calcium
Phosphore
Protéines totales
Albumine
Globuline (calculée)
Ratio albumine/globuline
Glucose
Cholestérol
Triglycérides
Sodium
Potassium
Chlorure
Magnésium
Protéine C réactive (CRP)
Qualité de l'échantillon

Annexe 2 : Organes à collecter (directives EMA sur la toxicité des doses répétées)

Glande surrénale
Aorte
Os
Moelle osseuse#
Cerveau
Cæcum

Côlon
Duodénum
Épididyme
Œsophage
Œil
Vésicule biliaire
Glande de Harder
Cœur#
Iléon
Jéjunum
Rein#
Foie#
Poumon
Ganglion lymphatique(s)
Glande mammaire (femelles)
Ovaire (femelles)
Pancréas
Glande parathyroïde
Nerf périphérique
Hypophyse
Prostate (mâles)
Glande salivaire
Vésicule séminale (mâles)
Muscle squelettique
Peau
Moelle épinière
Rate#
Estomac
Testicule (mâles)
Thymus#
Glande thyroïde
Trachée
Vessie urinaire
Utérus
Vagin (femelles)
Autres organes ou tissus avec des lésions macroscopiques
Masses tissulaires
Oreille
Veine
Ganglions lymphatiques drainants autour du site d'injection#

Organes d'intérêt majeur : à collecter pendant la DRF