

Programme des produits
thérapeutiques
Holland Cross, tour "B"
6ième étage, 1600, rue Scott
Localisateur d'adresse # 3106B
Ottawa (Ontario)
K1A 1B6

Le 5 janvier 2001

00-022600

Aux Associations :

J'ai le plaisir de vous informer de la publication de la ligne directrice de l' *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)*/Programme des produits thérapeutiques, intitulée, **Préparation et caractérisation des substrats cellulaires utilisés pour la production de produits biologiques ou issus de la biotechnologie**, ICH thème Q5D.

Cette ligne directrice a été élaborée par un groupe d'experts de l'ICH et a fait l'objet de consultations, menées par les organismes de réglementation, conformément au processus de l'ICH. Le Comité directeur de l'ICH en a approuvé la version finale et en a recommandé l'adoption par les organismes de réglementation de l'Union européenne, du Japon et des États-Unis.

En adoptant cette ligne directrice de l'ICH, le Programme des produits thérapeutiques (PPT) fait siens les principes et les pratiques qui y sont énoncés. Ce document doit être lu en parallèle avec cette lettre d'accompagnement et les sections pertinentes des autres lignes directrices applicables du Programme.

Le Programme est conscient que la portée et l'objet de ses lignes directrices actuelles peuvent ne pas toujours correspondre en totalité à ceux des lignes directrices de l'ICH qui sont introduites dans le cadre de l'engagement du PPT envers l'harmonisation à l'échelle internationale et le Processus de l'ICH. Dans de tels cas, les lignes directrices de l'ICH adoptées par le PPT auront préséance.

.../2

Le PPT a pris l'engagement d'éliminer ces incohérences par la mise en oeuvre d'un plan de travail graduel qui examinera l'impact lié à l'adoption des lignes directrices de l'ICH. Ce processus aboutira à la modification ou, si les révisions à apporter sont trop nombreuses, au retrait de certaines lignes directrices du PPT.

Plusieurs lignes directrices, incluant celle-ci, sont disponibles sur le site Internet du Programme des produits thérapeutiques (PPT) (<http://www.hc-sc.gc.ca/hpb-dgps/therapeut>). Pour accéder à la liste des "copies papier" des lignes directrices du Programme des produits thérapeutiques disponibles, veuillez consulter la liste qui apparaît sur les bons de commande des publications et des directives (publiés sur le site Internet du PPT), ou veuillez communiquer avec le coordonnateur / coordonnatrice des publications¹.

Si vous avez des questions concernant cette ligne directrice, veuillez communiquer avec:

Directeur
Bureau des produits biologiques et
radiopharmaceutiques
Programme des produits thérapeutiques
Santé Canada
L.A. 0603D
Immeuble LCDC, Pré Tunney
OTTAWA, Ontario K1A 1B9
Téléphone : (613) 957-8064
Télécopieur : (613) 957-6302

Sincèrement vôtre,

Original signé par :

Robert G. Peterson, MD, PhD, MPH
Directeur général

Pièce jointe

¹

Tel: (613) 954-6466; courrier électronique:
publications_coordinator@hc-sc.gc.ca



LIGNE DIRECTRICE À L'INTENTION DE L'INDUSTRIE

Préparation et caractérisation des substrats cellulaires
utilisés pour la production de produits biologiques ou issus
de la biotechnologie
ICH thème Q5D

Publication autorisée par le
ministre de la Santé

Date d'approbation par le PPT	1999/12/16
Date mis en vigueur par PPT	2001/01/05

Programme des produits thérapeutiques



Notre Mission est d'aider les Canadiens et les Canadiennes à maintenir et à améliorer leur état de santé.

Santé Canada

Notre Mission: Faire en sorte que les médicaments, les instruments médicaux et les autres produits thérapeutiques disponibles au Canada soient sûrs, efficaces et de grande qualité et que les stupéfiants et drogues d'usage restreint ne fassent l'objet d'aucun abus et ne soient pas détournés de leurs usages légitimes.

Programme des produits thérapeutiques

**LE SITE WEB DU PROGRAMME DES PRODUITS THÉRAPEUTIQUES
(Web-PT)**

LAISSEZ VOTRE ORDINATEUR FAIRE LES RECHERCHES!

...Vous voulez savoir comment commercialiser un nouveau médicament?

...Vous souhaitez obtenir des renseignements au sujet du processus de réglementation des médicaments?

...Vous voulez connaître quels sont les médicaments les plus récemment autorisés au Canada?

...Vous souhaitez avoir un accès direct à nos formulaires et à nos politiques?

...Vous voulez connaître sont les contraintes en matière d' étiquetage des médicaments?

Vous pouvez obtenir ces renseignements et plusieurs autres en consultant

le site web du programme des produits thérapeutiques

à

www.hc-sc.gc.ca/hpb-dgps/therapeut

© Ministre, Travaux publics et services gouvernementaux Canada 2000

Disponible au Canada par l'entremise de
Santé Canada - Publications
Edifice Brooke Claxton, L. A. #0913A
Pré Tunney
OTTAWA (Ontario)
K1A 0K9

téléphone : (613) 954-5995

télécopieur : (613) 941-5366

also available in English under the following Title: Derivation and characterisation of Cell Substrates used for Production of Biotechnological / Biological Products

N° de catalogue H42-2/67-21-2000F

ISBN 0-662-84886-1

AVANT-PROPOS

La présente ligne directrice a été élaborée par un groupe d'experts de l'ICH et a fait l'objet de consultations, menées par les organismes de réglementation, conformément au processus de l'ICH. Le Comité directeur de l'ICH en a approuvé la version finale et en a recommandé l'adoption par les organismes de réglementation de l'Union européenne, du Japon et des États-Unis.

En adoptant cette ligne directrice de l'ICH, le Programme des produits thérapeutiques (PPT) fait siens les principes et les pratiques qui y sont énoncés. Ce document doit être lu en parallèle avec la lettre d'accompagnement et les sections pertinentes des autres lignes directrices applicables du Programme.

Les lignes directrices sont des documents destinés à guider l'industrie et les professionnels de la santé sur la **façon** de se conformer aux politiques du PPT et aux lois et règlements qui régissent leurs activités. Elles servent également de guide au personnel du PPT lors de l'évaluation et de la vérification de la conformité et permettent ainsi d'appliquer le mandat du Programme d'une façon équitable, uniforme et efficace.

Les lignes directrices sont des outils administratifs n'ayant pas de force de loi, ce qui permet une certaine souplesse d'approche. Les principes et les pratiques énoncés dans le présent document **pourraient être** remplacés par d'autres approches, à condition que celles-ci s'appuient sur une justification scientifique adéquate. Ces autres approches devraient être examinées préalablement en consultation avec le Programme pour s'assurer qu'elles respectent les exigences des lois et des règlements applicables.

Corollairement à ce qui précède, il importe également de mentionner que le Programme se réserve le droit de demander des renseignements ou du matériel supplémentaire, ou de définir des conditions dont il n'est pas explicitement question dans la ligne directrice, et ce, afin d'être en mesure d'évaluer adéquatement l'innocuité, l'efficacité ou la qualité d'un produit thérapeutique donné. Le PPT s'engage à justifier de telles demandes et à documenter clairement ses décisions.

TABLE DES MATIÈRES

1.	PRÉAMBULE	<u>1</u>
1.1	Objectif	<u>1</u>
1.2	Justification	<u>1</u>
1.3	Portée	<u>1</u>
2.	LES LIGNES DIRECTRICES	<u>2</u>
2.1	Origine, histoire et préparation du substrat cellulaire	<u>2</u>
	2.1.1 Introduction	<u>2</u>
	2.1.2 Origine, source et histoire des cellules	<u>3</u>
	2.1.3 Préparation du substrat cellulaire	<u>4</u>
2.2.	Banques de cellules	<u>5</u>
	2.2.1 Structure des banques	<u>5</u>
	2.2.2 Préparation et entreposage des banques	<u>6</u>
2.3.	Principes généraux concernant la caractérisation et la vérification des banques de cellules	<u>8</u>
	2.3.1. Épreuves d'identité	<u>9</u>
	2.3.1.1 Cellules de métazoaires	<u>9</u>
	2.3.1.2 Cellules microbiennes	<u>10</u>
	2.3.2 Épreuves de pureté	<u>10</u>
	2.3.2.1 Cellules de métazoaires	<u>10</u>
	2.3.2.2 Cellules microbiennes	<u>12</u>
	2.3.3 Stabilité du substrat cellulaire	<u>12</u>
	2.3.4 Épreuves de caryotype et de tumorigénicité	<u>14</u>
3.0.	GLOSSAIRE	<u>15</u>
	ANNEXE 1 : SUBSTRATS DE CELLULES PRIMAIRES	<u>17</u>

1. PRÉAMBULE

1.1 Objectif

Dans cette ligne directrice, sont décrites les normes générales qu'il convient d'appliquer à la préparation de lignées cellulaires humaines, animales et microbiennes devant servir à la préparation de produits biologiques ou issus de la biotechnologie, définis sous la rubrique 1.3 (*Portée*), ainsi qu'à la constitution et à la caractérisation de banques de cellules utilisées à des fins de production. Par conséquent, diverses recommandations sont énoncées concernant l'information à fournir sur ces aspects dans les demandes de mise en marché de ces types de produits.

1.2 Justification

Historiquement la qualité des produits biologiques d'origine cellulaire a suscité des inquiétudes de par la présence d'agents fortuits contaminants ou à cause des propriétés inhérentes des cellules utilisées pour la fabrication de ces produits. Par ailleurs, la qualité des produits obtenus au moyen d'ADN recombinant (ADNr) suscite également certaines incertitudes à cause de l'introduction de vecteurs d'expression dans le substrat cellulaire utilisé pour leur fabrication. Ainsi il est bien connu que les propriétés et les événements liés au substrat cellulaire peuvent influencer sur la qualité du produit qu'ils servent à fabriquer et que le contrôle de la qualité du produit doit englober toutes les étapes du procédé de fabrication reliées à la manipulation du substrat cellulaire.

Ce document complète d'autres lignes directrices afin de permettre une approche globale en ce qui a trait à la qualité de la composante biologique intrinsèque à la fabrication de produits à partir de cultures de cellules de métazoaires ou de cellules microbiennes.

1.3 Portée

Cette ligne directrice concerne les substrats cellulaires préparés à partir de banques de cellules. L'expression « substrat cellulaire » désigne ici des cellules microbiennes ou des lignées de cellules d'origine humaine ou animale possédant toutes les propriétés nécessaires pour générer des produits biologiques ou issus de la biotechnologie, pour usage humain *in vivo* ou *ex vivo*. Les réactifs de diagnostic *in vitro* sont exclus du portée de la présente ligne directrice. Tous les organismes animaux métazoaires peuvent être la source de lignées cellulaires. La présente ligne directrice s'applique tant aux lignées continues, à durée de vie illimitée *in vitro*, qu'aux cellules diploïdes à durée de vie limitée *in vitro*. Les cellules microbiennes désignent les bactéries, les champignons microscopiques, les levures et autres organismes unicellulaires.

L'expression « produits biologiques ou issus de la biotechnologie » désigne les produits élaborés à partir de cellules issues de banques de cellules, à l'exception des métabolites microbiens comme, par exemple, les antibiotiques, les acides aminés, les glucides et autres substances à faible poids moléculaire. Les recommandations formulées dans la présente ligne directrice s'appliquent aussi aux banques de cellules qui servent à préparer des produits de thérapie génique ou des vaccins. Certains produits biologiques tels que des vaccins antiviraux sont obtenus au moyen de cultures de cellules primaires préparées directement à partir de tissus ou d'organes d'origine animale. Comme on ne constitue pas de banques avec les cellules primaires, celles-ci ne sont pas incluses dans le présent document. Toutefois, certaines considérations qui peuvent s'appliquer aux cultures de cellules primaires sont présentées dans l'Annexe 1.

2. LES LIGNES DIRECTRICES

2.1 Origine, histoire et préparation du substrat cellulaire

2.1.1 Introduction

Il est important que le fabricant joigne à sa demande la documentation spécifique concernant l'histoire du substrat cellulaire utilisé pour la fabrication du produit biologique ou issu de la biotechnologie, ainsi qu'une description des lignées de cellules parentales dont sont issues, partiellement ou entièrement, les cellules composant le substrat cellulaire. Les phénomènes observés durant les phases de recherche et de développement du substrat cellulaire peuvent contribuer de façon significative à l'évaluation des risques associés à son utilisation pour des fins de production. L'information fournie à cet égard pourra faciliter l'évaluation globale, permettant d'assurer la qualité et l'innocuité du produit.

Il convient de noter soigneusement toute manipulation du substrat cellulaire durant la phase de développement. La description de l'historique des cellules n'est qu'un des nombreux outils utilisés pour caractériser un substrat cellulaire. Généralement, une description incomplète de l'historique des cellules ne constitue pas comme tel un obstacle à l'approbation du produit, mais des lacunes importantes vont résulter en une dépendance accrue aux autres méthodes utilisées pour caractériser le substrat cellulaire.

2.1.2 Origine, source et histoire des cellules

Il faut indiquer la provenance des cellules (laboratoire ou collection de cultures) dont est issu le substrat cellulaire, et donner les références des publications scientifiques pertinentes. L'information obtenue directement du laboratoire d'origine est préférable. À défaut de tels renseignements, on peut référer à la littérature.

Dans le cas des lignées de cellules humaines, il est utile de décrire certaines caractéristiques: tissu ou organe d'origine, origine ethnique et géographique, âge, sexe et état physiologique général. Si l'état de santé ou les antécédents médicaux sont connus, il faut en faire état et fournir les résultats de toutes les épreuves de dépistage d'agents pathogènes qu'a subies le donneur. Dans le cas particulier des fibroblastes diploïdes d'origine humaine, il faut indiquer si possible l'âge du donneur, car ce facteur peut influencer sur la durée de vie de la lignée *in vitro*. Pour les lignées de cellules animales, une description adéquate de la source doit comprendre les renseignements suivants : espèce, souche, généalogie, tissu ou organe d'origine, origine géographique, âge, sexe et état physiologique général de l'animal donneur et les résultats des épreuves de dépistage d'agents pathogènes qu'il a subi.

Pour les cellules microbiennes, le fabricant doit indiquer l'espèce, la souche et les caractères génotypiques et phénotypiques de l'organisme dont est issu le substrat cellulaire. Il doit aussi décrire la pathogénicité, la production de toxines et, s'il y a lieu, les autres risques biologiques qui y sont associés.

Il convient aussi de faire l'historique de la culture des cellules. Le fabricant doit décrire la technique d'isolement des cellules, de même que les méthodes de culture *in vitro* et toutes les opérations effectuées pour l'établissement des lignées cellulaires (par exemple, si l'on a utilisé des procédés physiques, chimiques ou biologiques ou introduit des séquences nucléotidiques). Il convient également de décrire toutes les manipulations génétiques ou sélections effectuées. Enfin, il faut fournir toute l'information disponible sur l'identité, les caractéristiques des cellules ainsi que les résultats des épreuves effectuées pour la détection des agents endogènes ou fortuits.

Pour les lignées continues de cellules de métazoaires, il est généralement indiqué de quantifier la durée de la culture en estimant soit le nombre de doublements de la population cellulaire ou le nombre de repiquages en précisant la dilution utilisée, ou encore le nombre de jours écoulés. Pour les lignées de cellules diploïdes à durée de vie limitée *in vitro*, il est important de donner une estimation exacte du nombre de

doubléments de la population cellulaire durant toutes les phases de recherche, de développement et de production. Pour les cellules microbiennes, la documentation sur la fréquence des repiquages à compter de la mise en culture du substrat cellulaire est adéquate.

En ce qui touche la préparation des substrats cellulaires, les fabricants doivent discuter en profondeur les opérations durant lesquelles les cellules peuvent être exposées à des agents infectieux. Il faut décrire les composantes du milieu de culture et, en particulier, fournir des renseignements sur l'exposition des cellules à du matériel d'origine humaine ou animale tel que du sérum, des enzymes, des hydrolysats ou d'autres cellules vivantes. La description doit comporter des renseignements sur l'origine du matériel biologique, les méthodes de préparation et de contrôle, les résultats des analyses et le programme d'assurance de la qualité. Si elles sont disponibles, des publications pertinentes sur ces aspects peuvent être jointes. Ces renseignements permettront d'étudier en détail les voies d'entrée potentielles des agents fortuits pouvant être introduits à partir de ces sources, et fera partie de l'analyse des risques et des avantages que présente le produit.

2.1.3 Préparation du substrat cellulaire

Le choix de la lignée cellulaire parentale est déterminant. Pour les produits recombinants, la lignée cellulaire parentale est typiquement la lignée cellulaire receveuse non transfectée. Il est conseillé d'utiliser une banque de cellules parentales caractérisée, mais cette condition n'est pas essentielle. L'utilisation d'une banque de cellules parentales caractérisée peut présenter certains avantages, surtout lorsque différents substrats cellulaires sont obtenus à partir du même type de cellule parentale, en utilisant les renseignements concernant la banque de cellules parentales pour l'évaluation de la qualité de la banque de cellules primaires (BCP). Par exemple, la lignée myélomateuse peut être utilisée pour constituer une banque de cellules parentales qui servira à produire des hybridomes.

Durant la préparation du substrat cellulaire, une ou plusieurs procédures spécifiques pourront être effectuées pour lui conférer des caractéristiques souhaitées. Celles-ci peuvent inclure la fusion cellulaire, la transfection, la sélection, l'isolement de colonies, le clonage, l'amplification de gènes et l'adaptation à des conditions ou à un milieu de culture particulier. L'information fournie sur les méthodes utilisées pour la préparation du substrat cellulaire peut aider à mieux comprendre l'histoire de ce dernier. Signalons toutefois que certains substrats cellulaires, comme, par exemple, les fibroblastes diploïdes humains, ne nécessitent pas de manipulation complexe, ni de clonage avant la constitution de banques de cellules.

Dans le cas des produits recombinants, le substrat cellulaire correspond à la cellule transfectée qui possède les séquences génétiques voulues laquelle a été clonée à partir d'une seule cellule génitrice. Pour en savoir davantage sur la préparation des substrats cellulaires obtenus par la technologie d'ADN-r, on se reportera aux autres lignes directrices pertinentes (régionales ou internationales). Dans le cas des produits ou des vaccins non recombinants, le substrat cellulaire correspond à la cellule de la lignée parentale choisie pour la constitution de la BCP sans modification ultérieure. Dans le cas des produits dérivés des hybridomes, le substrat cellulaire correspond à l'hybridome lui-même obtenu par la fusion de cellules myéломateuses parentales avec d'autres cellules parentales comme par exemple, des cellules spléniques immunes.

2.2. Banques de cellules

L'un des principaux avantages que présente l'utilisation de cellules obtenues par repiquages successifs pour la fabrication de produits biologique ou issus de la biotechnologie vient de ce que tous les lots de production sont issus d'une seule et même source caractérisée, soit la banque de cellules. Le fabricant peut constituer sa propre banque ou s'en procurer une chez un fournisseur. Quoiqu'il en soit, il lui incombe d'assurer la qualité de chaque banque de même que des analyses effectuées sur chacune d'elles.

2.2.1 Structure des banques

Le concept de la banque de cellules à deux niveaux par lequel la BCP est utilisée pour générer les banques de cellules de travail (BCT), est généralement reconnu comme la structure la plus pratique pour disposer d'un approvisionnement du substrat cellulaire permettant de fabriquer le produit sans interruption. Le fabricant doit expliquer comment il procédera pour assurer un approvisionnement continu en cellules à partir de ses banques, en indiquant notamment à quel rythme il pense utiliser ces dernières pour fins de production, quelle est la durée de l'intervalle prévu jusqu'à la préparation de nouvelles banques de remplacement de même que les critères pour la qualification des banques.

En général, on constitue d'abord la BCP, habituellement directement à partir d'un clone initial ou d'une banque préliminaire de cellules constituée à partir d'un clone initial. Il n'est pas jugé nécessaire de préparer une banque de cellules pour certains types de cellules (p. ex. les cellules diploïdes qui à cause de leur durée de vie limitée *in vitro* ou d'autres facteurs techniques rendent le clonage cellulaire difficile à effectuer), ou lorsque la population de cellules non clonées est déjà suffisamment homogène pour l'usage qu'on veut en faire.

La BCT est produite à partir d'un ou plusieurs des contenants constituant la BCP. Habituellement, les cellules de la BCT sont utilisées telles quelles pour la fabrication du produit. Suivant les besoins, on prépare d'autres BCT à partir de la BCP. Une BCT fraîchement préparée doit être adéquatement qualifiée en terme de caractérisation et de contrôles effectués.

Signalons que la BCP et la BCT peuvent différer l'une de l'autre à certains égards, notamment en ce qui touche les composantes du milieu de culture et les conditions de culture. En outre, les conditions de culture employées pour la préparation de ces banques peuvent être différentes de celles qu'on utilise pour le procédé de production. Si le changement de la méthode de culture n'a aucune influence sur la qualité du produit, il n'est pas nécessaire de recloner les cellules ou de reconstituer de nouvelles banques BCP et BCT. Il est important qu'une banque caractérisée donne un produit de qualité constante.

En principe, la banque à structure simple composée uniquement d'une BCP et ne comportant pas de BCT pourrait être utile, par exemple, lorsque la fabrication du produit ne nécessite qu'un nombre restreint de contenants à chaque année.

Pour certains systèmes d'expression microbiens, une nouvelle transformation est effectuée pour chaque nouveau lot de substrat cellulaire compte tenu que l'on utilise pour chaque transformation des aliquots de cellules hôtes et de plasmides provenant de banques rigoureusement contrôlées et que chaque banque de substrat cellulaire est soumise à des épreuves de contrôle. La banque de substrat cellulaire transformé ainsi obtenue est la BCP laquelle fournit le substrat cellulaire utilisé pour fins de production. Les banques de cellules hôtes, les banques de plasmides et les BCP sont préservées par les méthodes de conservation appropriées. Ce type de structure est considéré adéquat parce que la transformation des bactéries et des levures est généralement une opération facile et très reproductible, ce qui n'est pas le cas avec la transfection des cellules de métazoaires. Les fabricants doivent fournir de l'information sur les cellules hôtes et sur les molécules d'ADN-r (telles que les plasmides), sur la méthode de transformation et sur les banques de cellules qu'ils utilisent, ainsi que les résultats des études de caractérisation.

2.2.2 Préparation et entreposage des banques

Il importe que les substrats cellulaires contaminés (ou banques) ne soient pas utilisés pour la production afin d'éviter une perte de disponibilité du produit ou un retard dans le développement dû à la nécessité de recréer une banque de cellules devenue inutilisable par suite de contamination. Aucun programme de contrôle ne permet de détecter tous les agents susceptibles de contaminer les banques de cellules; il est par conséquent

indispensable d'observer des mesures de prévention durant les diverses opérations de la création d'une banque afin d'avoir une garantie raisonnable que la banque ne sera pas contaminée et assurer ainsi une source fiable de substrat cellulaire.

Le fabricant doit décrire la structure de ses banques, leur taille, le type de contenants (flacons, ampoules ou autres contenants appropriés) et le dispositif de fermeture utilisé, ainsi que les méthodes de préparation incluant les indications sur les agents cryoprotecteurs et les milieux utilisés, et les conditions de cryopréservation et d'entreposage. Le fabricant doit décrire les systèmes mis en place pour éviter la contamination microbienne et la contamination croisée par les autres lignées cellulaires présentes dans le laboratoire ainsi que les procédures permettant la localisation des contenants de la banque cellulaire. Ces renseignements doivent comprendre une description du système de documentation ainsi que du système d'étiquetage lequel doit résister aux méthodes de préservation, d'entreposage et de récupération employées sans perdre l'information apposée sur le contenant.

Le fabricant doit décrire les méthodes utilisées dans la préparation des banques de cellules. En général, les cellules sont préparées en augmentant progressivement le nombre ou la capacité des vaisseaux de culture jusqu'à ce que le pool de cellules obtenu soit suffisant pour générer le nombre de contenants nécessaire pour la banque. Pour assurer la composition uniforme du contenu de chaque contenant, il faut préparer un pool unique de cellules, en combinant les cellules de tous les vaisseaux de culture si plus d'un vaisseau est utilisé.

La suspension de cellules dans le milieu de conservation provenant d'un seul pool est répartie en fractions aliquotes dans des contenants stérilisés et fermés hermétiquement, qui sont alors conservés dans les conditions appropriées. Par exemple, les cellules d'origine animale, en suspension dans un milieu renfermant un cryoprotecteur, sont réparties dans des contenants scellés, congelées dans des conditions définies et contrôlées, puis entreposées dans la phase liquide ou gazeuse d'un dispositif refroidi à l'azote liquide ou à une température équivalente. Des méthodes différentes de préservation et d'entreposage peuvent être adéquates selon l'organisme visé, mais elles doivent permettre la conservation des cellules de telle façon que leur viabilité lors de la décongélation soit à la fois constante et suffisante pour les fins de production.

Pour assurer une production constante et ininterrompue, les fabricants doivent accorder toute l'attention nécessaire aux mesures qu'ils peuvent mettre en oeuvre pour se prémunir contre les catastrophes risquant de rendre leurs banques de cellules inutilisables, comme, par exemple, un incendie, une panne d'électricité ou une erreur humaine. Les fabricants doivent décrire les dispositions qui sont prises contre de telles éventualités; par exemple, conserver les contenants d'une même banque dans des congélateurs différents, prévoir une source d'électricité d'urgence, utiliser des systèmes automatiques d'approvisionnement d'azote liquide pour les unités d'entreposage, conserver une partie des BCP et des BCT dans un lieu éloigné des installations, ou régénérer la BCP.

Le point de départ pour l'évaluation de l'âge cellulaire *in vitro* pendant la production, doit être la décongélation d'un ou de plusieurs contenants de la BCP. Dans le cas des lignées de cellules diploïdes, la durée de vie *in vitro* est évaluée en termes de doublements de population. Le niveau de doublement de la population où se manifeste la sénescence doit être déterminé pour les lignées de cellules diploïdes.

2.3. Principes généraux concernant la caractérisation et la vérification des banques de cellules

La caractérisation et la vérification des banques de substrats cellulaires est un élément essentiel du contrôle des produits biologiques ou issus de la biotechnologie. Les renseignements qu'apporte la caractérisation de la BCP permettent de vérifier si elle est exempte de d'autres lignées cellulaires, d'agents fortuits, d'agents endogènes et de contaminants moléculaires (p. ex. des toxines ou des antibiotiques générés par l'organisme hôte). L'objectif est de vérifier l'identité et la pureté du substrat cellulaire et de déterminer s'il convient à des fins de production. Dans certains cas des épreuves additionnelles peuvent s'avérer utiles, telles l'évaluation du pouvoir tumorigène ou un profil caryologique. Le choix du programme de vérification varie selon les propriétés biologiques des cellules (par exemple, les exigences de croissance), les antécédents de culture du substrat cellulaire (notamment l'utilisation de réactifs biologiques d'origine humaine ou animale) et les méthodes d'analyses disponibles. Par ailleurs, l'étendue de la caractérisation du substrat cellulaire peut influencer sur le type ou le niveau d'épreuves à faire aux étapes plus avancées de la production. Des épreuves d'identité et de pureté doivent être effectuées une fois pour chaque BCP de même qu'une évaluation de la stabilité des cellules durant l'étape de la culture cellulaire et ce pour chaque produit faisant l'objet d'une demande d'homologation. En outre, chaque BCT doit être soumise une fois à des épreuves de confirmation partielle d'identité et à des contrôles de pureté. De plus, le fabricant doit prendre connaissance de la ligne directrice ICH portant sur la sécurité virologique. Les épreuves pertinentes parmi celles décrites ci-après doivent être effectuées et décrites dans la demande de mise en marché en indiquant les résultats obtenus.

Dans le cas des lignées cellulaires recombinantes, on se reportera à la ligne directrice de l'ICH concernant les vecteurs d'expression d'ADN-r pour la caractérisation adéquate des séquences de nucléotides et d'acides aminés. Il peut aussi être utile d'évaluer, par des méthodes analogues, les séquences codantes de certaines lignées cellulaires non recombinantes dont les séquences de gènes ont été caractérisées et sont bien connues. Néanmoins, il n'est pas nécessaire d'étudier les séquences codant pour les produits naturels complexes comme, par exemple, les familles apparentées de produits de gènes, les antigènes de vaccins antimicrobiens ou les anticorps monoclonaux produits par des hybridomes.

Le fabricant est encouragé à utiliser les techniques de pointe disponibles et des techniques améliorées, lorsque disponibles, pour la caractérisation et la vérification des substrats cellulaires à la condition que la spécificité, la sensibilité et la précision des nouvelles méthodes soient au moins équivalentes à celles des méthodes en usage.

Le fabricant peut choisir de caractériser la BCT au lieu de la BCP, si un tel choix est justifié.

2.3.1. Épreuves d'identité

Les analyses appropriées doivent être effectuées pour déterminer si les cellules de la banque sont ce qu'elles sont censées être. Les épreuves d'identité peuvent porter sur les caractères phénotypiques ou génotypiques et il n'est pas nécessaire de faire toutes les épreuves possibles. Les épreuves d'identité sont généralement effectuées sur la BCP. En plus, des épreuves limitées d'identité sont effectuées sur chaque BCT.

2.3.1.1 Cellules de métazoaires

Dans le cas des cellules adhérentes d'origine humaine ou animale une analyse morphologique pourrait être utile lorsque combinée à d'autres épreuves. Dans la plupart des cas une analyse d'isoenzymes suffit pour confirmer l'identité des lignées cellulaires d'origine humaine ou animale; d'autres épreuves peuvent être indiquées, dépendant de l'histoire de la lignée cellulaire. On peut employer des techniques différentes pour confirmer l'espèce d'origine, notamment l'analyse cytogénétique de bandes chromosomiques ou le sérotypage au moyen d'antisérums spécifiques d'espèces. On pourrait aussi démontrer la présence de marqueurs spécifiques, par exemple en utilisant l'analyse cytogénétique de bandes chromosomiques pour mettre en évidence un chromosome marqueur unique, ou l'analyse de l'ADN pour mettre en évidence un polymorphisme génomique

(p. ex.: un polymorphisme de longueur des fragments de restriction «FRLP», un nombre variable de séquences répétées en tandem «VNTR» ou de dinucléotides génomiques répétés). Quel que soit le facteur confirmé (identité de l'espèce d'origine ou la présence de marqueurs spécifiques à la lignée cellulaire), il est considéré suffisant aux fins de vérification de l'identité. L'expression du produit recherché pourra constituer une approche complémentaire pour la confirmation de l'identité.

2.3.1.2 Cellules microbiennes

Pour la plupart des cellules microbiennes, l'évaluation de la croissance sur des milieux sélectifs suffit à confirmer l'espèce à laquelle appartient la cellule hôte et la banque de cellules transformées. Dans le cas de *E. coli*, où une variété de souches peuvent être employées, les méthodes de caractérisation biologique comme la lysotypie sont à envisager comme épreuve additionnelle d'identité. Pour ce qui est des banques de plasmides on peut en confirmer l'identité suivant les indications données à ce sujet dans le document de l'ICH concernant l'analyse des vecteurs d'expression. L'expression du produit recherché représente également un moyen adéquat de confirmer l'identité d'un vecteur d'expression microbien.

2.3.2 Épreuves de pureté

L'évaluation de la pureté des banques, tant de la BCP que de la BCT représente une étape majeure dans le développement d'une lignée cellulaire et la préparation des banques. Il s'agit de vérifier si les banques sont biologiquement pures, c'est-à-dire si elles sont exemptes d'agents microbiens et de contaminants cellulaires fortuits. Lors de la planification et l'exécution des épreuves de pureté, il faut tenir compte des effets potentiels des marqueurs de sélection et des antibiotiques sur la détection des contaminants microbiens fortuits.

2.3.2.1 Cellules de métazoaires

Des contenants de la BCP et des BCT (1 % du nombre total de contenants mais pas moins de deux) doivent être soumis à des épreuves de charge biologique ("Bioburden") permettant d'identifier la présence de bactéries et de champignons microscopiques. Pour tous les autres paramètres, les méthodes décrites dans les plus récentes pharmacopées européenne, japonaise ou américaine pour l'évaluation du nombre limite de microorganismes ou de la stérilité peuvent être considérées adéquates.

La BCP et les BCT doivent subir des épreuves de détection de mycoplasmes. Les techniques courantes de la gélose et du bouillon de culture ainsi que celle de la culture indicatrice sont considérées adéquates. Des méthodes courantes de détection des mycoplasmes sont décrites dans les pharmacopées européenne et japonaise ainsi que dans un document produit par le FDA sur la caractérisation des lignées cellulaires utilisées pour la fabrication de produits biologiques (« Points to Consider in the Characterisation of Cell Lines Used to Produce Biologicals ») (FDA, CBER, 1993). L'évaluation des cellules provenant d'un seul contenant est généralement considérée adéquate. Pour les lignées cellulaires d'origine animale autres que mammifères, d'autres types de vérifications et/ou de conditions d'épreuves peuvent convenir; le fabricant s'adressera aux autorités de réglementation nationale ou régionale, selon le cas, pour connaître les méthodes appropriées.

Si les tentatives futures d'harmonisation des épreuves de la charge biologique ("bioburden") et de mycoplasmes sont couronnées de succès, l'épreuve harmonisée scientifiquement appropriée devra être utilisée.

L'évaluation virale du substrat cellulaire doit être planifiée de façon à détecter un large spectre de virus en utilisant des épreuves de criblage et autres épreuves spécifiques appropriées axées sur les antécédents de culture de la lignée cellulaire pour la mise en évidence de virus contaminants potentiels. Le répondant se reportera à la ligne directrice de l'ICH sur la sécurité virologique. Pour les classes de produits qui ne sont pas traitées dans cette ligne directrice, le fabricant peut consulter les dernières publications de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) sur l'utilisation des cellules d'origine animale.

La contamination des substrats cellulaires par des lignées cellulaires de la même espèce ou d'une espèce différente peut compromettre la pureté de ces derniers. Le choix des épreuves à réaliser dans ce cas est effectué en fonction du fait qu'il y a ou non des risques de contamination croisée par d'autres lignées cellulaires. Il est parfois nécessaire de garder différentes lignées cellulaires dans un même laboratoire. Certaines des opérations liées à la préparation d'une banque de cellules s'exécutent sans confinement, et il faut donc éviter de traiter plusieurs lignées cellulaires simultanément. Si, durant les opérations sans confinement de la préparation d'une banque de cellules (telles que la multiplication, la constitution du pool cellulaire et la répartition dans les contenants de culture), une autre lignée cellulaire que celle devant constituer la banque est manipulée, celle-ci doit être soumise à des épreuves permettant de mettre en évidence les cellules

(ou les produits cellulaires) de la deuxième lignée. En général, les méthodes d'identification décrites à la rubrique 2.3.1 conviennent aussi pour la détection de la contamination croisée. Le fait que le substrat cellulaire fabrique le produit recherché pourra être considéré comme une preuve additionnelle de l'absence de contamination croisée.

2.3.2.2 Cellules microbiennes

Dans la conception et l'exécution des épreuves spécifiques destinées à mettre en évidence les agents microbiens fortuits ou les contaminants cellulaires fortuits présents dans les banques de cellules microbiennes, divers facteurs doivent être pris en compte incluant les propriétés de la banque de cellules, la présence de contaminants probables d'après les publications scientifiques, l'origine, les méthodes et les ingrédients utilisés pour la culture de même que la présence d'autres organismes dans le laboratoire de préparation de la banque. Par exemple on peut évaluer visuellement les caractéristiques de colonies bien isolées obtenues au moyen de divers milieux microbiologiques dont certains supportent et d'autres ne supportent pas la croissance du substrat cellulaire. Cependant l'intention n'est pas de suggérer que le fabricant doive nécessairement caractériser les mutants résistants du substrat cellulaire résultant de telles études, ou d'autres artéfacts résultant de tels essais. Plutôt, le but de ces épreuves est de détecter des agents contaminants existants.

2.3.3 Stabilité du substrat cellulaire

La caractérisation des cellules doit aussi permettre de déterminer si le substrat cellulaire convient pour l'usage auquel il est destiné. Il existe deux sources d'incertitude au sujet de la stabilité du substrat cellulaire: assurer l'uniformité de production du produit souhaité et la rétention de la capacité de production pendant l'entreposage dans les conditions spécifiées.

La stabilité des cellules mises en culture pour la production doit être vérifiée au moins à deux moments de la période de culture, le premier en utilisant des cellules qui ont fait l'objet d'un nombre minimum de repiquages et en second lieu lorsqu'elles ont atteint ou dépassé l'âge limite de production *in vitro* indiqué dans la demande de mise en marché. L'âge cellulaire *in vitro* doit avoir été établi d'après les données recueillies sur des cellules multipliées pour une production à l'échelle pilote ou à l'échelle commerciale

jusqu'à ce qu'elles aient atteint ou dépassé l'âge limite de production *in vitro*. En général, on obtient les cellules de production en multipliant des cellules de la BCT; on peut utiliser des cellules de la BCP, si ce choix est adéquatement justifié. La stabilité du substrat cellulaire est habituellement démontrée une fois pour chaque produit faisant l'objet d'une demande de mise en marché.

L'évaluation du substrat cellulaire a pour but avant tout d'assurer l'uniformité du procédé de fabrication du produit souhaité. La nature des épreuves utilisées et des paramètres évalués dépend du type de substrat cellulaire, des méthodes de culture employées et du produit recherché. Dans le cas des lignées cellulaires transfectées avec des vecteurs d'expression d'ADN recombinant, l'uniformité de la séquence codante du vecteur d'expression doit être évaluée dans des cultures de cellules ayant atteint ou dépassé l'âge cellulaire limite de production *in vitro*, soit par une analyse de l'acide nucléique ou l'analyse du produit, suivant les indications fournies dans la ligne directrice de l'ICH applicable. Dans le cas d'une lignée cellulaire non recombinante pour laquelle la séquence codante du produit recherché a été analysée lors de la caractérisation de la BCP ou des BCT, il faudra vérifier la stabilité de la séquence codante de la protéine durant la production. Cette vérification est effectuée dans des cellules de production ayant atteint ou dépassé l'âge limite de production *in vitro*, soit par l'analyse de l'acide nucléique ou l'analyse de la protéine purifiée.

Lorsque le produit ne peut être analysé suivant les indications données ci-dessus, d'autres paramètres spécifiques peuvent être utiles pour évaluer la stabilité du substrat cellulaire : il peut s'agir, par exemple, de caractéristiques morphologiques, de caractéristiques de croissance, de marqueurs biochimiques et immunologiques, du rendement en produit recherché ou d'autres marqueurs génotypiques ou phénotypiques appropriés. Dans certains cas, lorsqu'il peut être difficile ou impossible de faire une comparaison directe entre les cellules de la BCP et des cellules de production ayant atteint ou dépassé l'âge limite *in vitro*, on peut alors comparer les caractéristiques de ces dernières à celles des cellules obtenues aux premiers stades de culture ou de production. Pour cette évaluation, des paramètres tels que la consommation d'oxygène ou de glucose, ou la production d'ammoniac ou de lactate peuvent être utiles. L'âge limite de production *in vitro* pourra être augmenté à la condition que les données fournies résultent de l'observation de cellules cultivées jusqu'à la nouvelle limite proposée. Dans le cas des lignées de cellules diploïdes les données présentées doivent permettre d'établir la durée de vie *in vitro* des cellules de la BCT dans des conditions représentatives des conditions de production.

La stabilité des banques de cellules conservées dans des conditions d'entreposage définies est généralement démontrée lors de la préparation du matériel d'essai clinique à partir des banques de cellules. Lorsqu'on réactive des cellules pour produire du matériel d'essai clinique, on évalue leur viabilité; les résultats de cette évaluation indiquent si les cellules survivent au procédé de conservation. Par ailleurs, les données recueillies durant la préparation du matériel d'essai clinique indiquent si les cellules réactivées pourront être utilisées pour fabriquer le produit recherché. Le fabricant doit présenter ces données, avec une documentation claire, dans les dossiers de la demande et soumettre un projet de programme de surveillance de la stabilité des banques de cellules. Selon ce qui convient le mieux, cette surveillance peut être exercée lorsque des contenants cryopréservés sont décongelés à des fins de production, lorsque le produit ou l'uniformité de la production est évalué de façon appropriée ou lorsque un ou plusieurs contenants de la BCP sont utilisés pour la préparation d'une nouvelle BCT (et que la nouvelle BCT est adéquatement qualifiée). Si la mise en production ne commence qu'après un long délai, l'évaluation de la viabilité des cellules de la banque utilisée comme source de substrat de production devrait être effectuée à un intervalle de temps spécifié dans la demande de mise en marché. Si la viabilité du substrat cellulaire n'a pas diminué de façon significative, il n'est généralement pas nécessaire de procéder à des évaluations additionnelles de la BCP ou des BCT.

2.3.4 Épreuves de caryotype et de tumorigénicité

Dans l'évaluation de l'innocuité d'une lignée de cellules diploïdes ou lors de la caractérisation d'une nouvelle lignée cellulaire, il peut être utile de déterminer le caryotype et le pouvoir tumorigène, tout dépendant de la nature des cellules, du produit fabriqué et du procédé de fabrication. Une analyse exhaustive pour identifier la quantité relative de cellules aneuploïdes ne s'est pas révélée utile. Il n'est pas utile non plus de déterminer le caryotype des lignées de cellules de rongeurs et des nouvelles lignées de cellules non diploïde. L'analyse cytogénétique peut toutefois être indiquée pour déterminer l'identité d'un substrat cellulaire ou évaluer sa pureté, comme indiqué aux rubriques 2.3.1 et 2.3.2. Par ailleurs, il n'est pas nécessaire de répéter les épreuves de tumorigénicité pour des cellules dont l'action tumorigène est déjà documentée.

Dans le cas des produits purifiés ne contenant aucune cellule, l'évaluation du caryotype et des propriétés tumorigènes n'est généralement pas nécessaire, à la condition que la concentration de l'ADN résiduel des cellules hôtes soient dans les limites appropriées et ce, de façon consistante, tel que démontré lors des études de validation du procédé de fabrication ou par les épreuves de libération des lots.

En général, lorsqu'il est impossible d'exclure tout à fait la présence de cellules vivantes dans un produit ou lorsque le produit ne subit pas une purification très poussée (comme c'est le cas, par exemple, de certains vaccins atténués classiques), l'évaluation du caryotype et des propriétés tumorigènes du substrat cellulaire s'impose. En ce qui a trait aux nouveaux substrats cellulaires servant à produire des produits non purifiés, l'utilité de cette évaluation est à déterminer dans chaque cas. Lorsqu'un produit contient des cellules ou qu'il n'est pas très purifié, on décide s'il est justifié d'utiliser l'utilisation des lignées cellulaires ayant des propriétés tumorigènes ou dont le profil caryologique est anormal doit être évalué à la lumière des risques et des avantages que présente chacune des applications du produit en question.

Il n'est pas nécessaire d'évaluer le caryotype et les propriétés tumorigènes des substrats cellulaires préparés à partir de cellules MRC-5 ou WI-38 non génétiquement modifiées, car de nombreuses études de caractérisation ont été publiées sur ces lignées. Toutefois, pour chaque BCT préparée à partir de cellules MRC-5 ou de cellules WI-38, le fabricant doit confirmer une fois seulement, que les cellules, lorsqu'elles sont cultivées par la méthode devant être utilisée pour la production sont bel et bien diploïdes et ont la durée de vie prévue.

Il convient de confirmer la diploïdie des nouveaux substrats de cellules diploïdes ou des substrats de cellules diploïdes encore jamais caractérisés, et de déterminer leur pouvoir tumorigène, en utilisant à cette fin les cellules de la BCP. Des méthodes d'évaluation du caryotype et des propriétés tumorigènes sont décrites dans les exigences techniques de l'OMS concernant l'utilisation de cellules d'origine animale comme substrat *in vitro* pour la production de produits biologiques (« WHO Requirements for Use of Animal Cells as *in vitro* Substrate for the Production of Biologicals ») énoncées par le *Comité d'experts de l'OMS sur la normalisation biologique* (47^e rapport, Genève) de l'*Organisation mondiale de la Santé* (OMS, Série de Rapports techniques, sous presse).

3.0. GLOSSAIRE

Âge cellulaire *in vitro*: Mesure du temps écoulé entre la décongélation de flacon(s) de la banque de cellules primaire et la récolte du bioréacteur de production. Cette période est mesurée en temps réel et est exprimée en fonction du nombre de doublements des cellules ou par le nombre de repiquages, lorsque la sous-culture est faite selon une méthode spécifique pour la dilution de la culture.

Banque de cellules: Ensemble de contenants appropriés dont le contenu a une composition uniforme et qui sont conservés dans des conditions définies. Chaque contenant représente une fraction aliquote d'un seul type de cellules.

BCP (Banque de cellules primaires): Fraction aliquote d'un seul type de cellules qui a généralement été préparée à partir du clone cellulaire choisi, dans des conditions déterminées, répartie dans plusieurs contenants et conservée dans des conditions déterminées. Toutes les banques de cellules de travail sont obtenues à partir de la banque de cellules primaire. Les analyses pratiquées sur une nouvelle banque de cellules primaire (dérivée d'un clone initial antérieur, d'une banque de cellules primaire ou d'une banque de cellules de travail) devraient être les mêmes que celles effectuées sur la banque de cellules primaire.

BCT (Banque de cellules de travail): Banque de cellules préparée à partir de fractions aliquotes d'une suspension homogène de cellules obtenues par la culture de la banque de cellules primaire dans des conditions de cultures définies.

Cellule-hôte: Voir cellule parentale.

Cellule parentale: Cellule dont dérive, par suite d'une manipulation, un substrat cellulaire ou une lignée cellulaire intermédiaire. Dans le cas de systèmes d'expression microbiens, on parle plutôt de cellule-hôte. Pour les hybridomes, il est typique de décrire les cellules parentales comme les cellules à être fusionnées.

Lignée cellulaire: Population de cellules obtenue par repiquage en série d'une population cellulaire initiale et pouvant servir à constituer une banque de cellules.

Lignée cellulaire continue: Lignée de cellules capables de se multiplier indéfiniment, aussi appelée lignée « immortelle » et précédemment désignée comme lignée « établie ».

Lignée cellulaire diploïde: Lignée de cellules à durée de vie limitée *in vitro* dont les chromosomes, en doubles exemplaires (euploïdes), sont identiques par leur structure aux chromosomes de l'espèce dont les cellules sont issues.

Métazoaire: Animal pluricellulaire.

ANNEXE 1 : SUBSTRATS DE CELLULES PRIMAIRES

I. Introduction

Les principes énoncés dans le présent document s'appliquent en général aux produits biologiques ou issus de la biotechnologie préparés à partir de banques de cellules caractérisées. Toutefois, un certain nombre de produits biologiques, et plus particulièrement certains vaccins viraux, sont préparés au moyen de cellules primaires.

Comme les cellules primaires sont utilisées dès le premier repiquage, après leur mise en culture à partir du tissu d'origine, il est impossible de les caractériser en détail avant qu'elles ne soient utilisées, comme on peut le faire pour les substrats cellulaires issus de banques de cellules. De plus, bon nombre des produits biologiques fabriqués au moyen de cellules primaires ne subissent aucun traitement poussé (p. ex. une purification). Malgré ces différences, pour vérifier si les substrats de cellules primaires sont appropriés et sécuritaires pour l'élaboration des produits biologiques recherchés, on applique une approche qui ressemble à bien des égards à celle qui est décrite dans la présente ligne directrice ainsi que dans d'autres documents références.

Dans la présente annexe, est indiquée l'information que le fabricant doit fournir sur le substrat cellulaire dans sa demande de mise en marché, lorsque celle-ci porte sur un produit biologique obtenu au moyen de cellules primaires. En fait, les renseignements à fournir concernent trois points : 1) la source du tissu ou organe d'origine et toute autre matière brute d'origine animale utilisée dans la préparation du substrat de cellules primaires, 2) la méthode de préparation du substrat de cellules primaires et 3) les analyses effectuées sur le substrat de cellules primaires pour assurer l'innocuité du produit.

II. Origine du tissu et autres matières brutes

Le fabricant doit fournir des renseignements sur les animaux dont proviennent les tissus utilisés pour préparer les substrats de cellules primaires. Les tissus doivent être prélevés sur des sujets sains certifiés exempts d'agents pathogènes suite aux contrôles vétérinaires et en laboratoire. Dans la mesure du possible, les animaux donneurs doivent provenir de colonies ou de troupeaux élevés en isolement et exempts d'agents pathogènes. Il ne doivent pas avoir été utilisés préalablement pour d'autres travaux expérimentaux. Ils doivent être isolés en quarantaine de durée suffisante avant que leurs tissus soient utilisés pour la préparation de substrats cellulaires. Certains pays exigent que les animaux soient mis en quarantaine dans le pays où les cellules primaires doivent être préparées. Le fabricant doit s'informer des exigences à remplir auprès des autorités nationales ou régionales concernées.

Le fabricant doit fournir des renseignements sur les matériaux et les composantes entrant dans la préparation des substrats de cellules primaires et indiquer l'identité et la provenance de tous les réactifs d'origine humaine ou animale employés. Il convient en outre de décrire les analyses et les épreuves auxquelles on soumet les matières d'origine animale pour certifier qu'elles sont exemptes de contaminants et d'agents fortuits détectables.

III. Préparation du substrat de cellules primaires

Le fabricant doit décrire les méthodes utilisées pour isoler les cellules du tissu d'origine, pour établir les cultures de cellules primaires et pour entretenir les cultures cellulaires établies.

IV. Analyses des substrats de cellules primaires

Le fabricant doit décrire les épreuves et les analyses de qualification effectuées pour déterminer si le substrat de cellules primaires peut être utilisé à des fins de production. Comme nous l'avons déjà signalé, en raison même de la nature du substrat, il est impossible de faire des vérifications et une caractérisation poussées avant la mise en production: c'est donc pendant la production que l'on vérifie si le substrat est exempt d'agents fortuits. Cette vérification peut comporter les opérations suivantes : observation des cultures de production ou de cultures témoins non infectées avant, pendant et en deçà de la période de production; inoculation de liquides provenant de cultures de production et de cultures témoins non infectées à diverses cultures de cellules indicatrices (permettant de détecter une gamme étendue de virus) suivi de l'observation de changements cytopathogènes et épreuves pour mettre en évidence des virus hémadorbants, de même que d'autres épreuves pour déceler des agents particuliers (tels que des rétrovirus) si besoin est. Des renseignements additionnels concernant certaines épreuves virologiques spécifiques sont donnés dans les directives nationales, régionales ou internationales applicables.

Les cellules doivent être soumises à un ensemble d'épreuves dont la nature, ainsi que celle des méthodes à employer pour les réaliser, varient selon l'espèce dont provient le tissu utilisé, la nature des agents fortuits qui pourraient être présents, la nature du produit, l'usage clinique auquel il est destiné, les divers aspects du procédé de fabrication et l'étendue des analyses auxquelles est soumis le produit final. Le fabricant doit expliquer et justifier son approche en fonction du produit.