



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

00-022597

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 **Qualité des Produits Issus de la Biotechnologie: Analyse des Vecteurs d'expression dans les Cellules Utilisées pour la Production Protéiques Dérivés de l'ADN-r**, ICH thème Q5B

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.

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.

.../2

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
Immeuble LCDC, Pré Tunney, L.A. 0603D
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

Qualité des produits issus de la biotechnologie:
Analyse des vecteurs d'expression dans les cellules
utilisées pour la production de produits protéiques dérivés
de l'ADN-r
ICH thème Q5B

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 quelles 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: Quality of Biotechnological Products: Analysis of the Expression Construct in Cells used for Production of R-DNA Derived Protein Products

N° de catalogue H42-2/67-19-2000F

ISBN 0-662-84884-5

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.	INTRODUCTION	<u>1</u>
2.	JUSTIFICATION DE L'ANALYSE DU VECTEUR D'EXPRESSION	<u>1</u>
3.	CARACTÉRISATION DU SYSTÈME D'EXPRESSION	<u>2</u>
	A. Vecteur d'expression et clone cellulaire servant à la constitution d'une banque de cellules primaire (BCP)	<u>2</u>
	B. Banques de cellules	<u>3</u>
	C. Limite de l'âge cellulaire in vitro pour la production	<u>4</u>
4.	CONCLUSION	<u>4</u>
5.	GLOSSAIRE	<u>5</u>

1. INTRODUCTION

Le présent document offre un guide pour la caractérisation des vecteurs d'expression utilisés pour la fabrication de produits protéiques recombinants au moyen de cellules eucaryotes ou procaryotes. Le présent document veut décrire les renseignements jugés utiles pour l'évaluation de la structure des vecteurs d'expression servant à la fabrication de protéines dérivées de l'ADN recombinant. Le présent document ne vise cependant pas à traiter l'ensemble de la question de la qualité des produits dérivés de l'ADN-r pour usage médicinal.

Le vecteur d'expression est un vecteur renfermant la séquence codante de la protéine recombinante qu'on veut fabriquer. Pour assurer la qualité et l'uniformité du produit final les segments du vecteur d'expression doivent être analysés au moyen de méthodes spécifiques aux acides nucléiques ainsi que par des épreuves portant sur la protéine recombinante purifiée. L'analyse du vecteur d'expression à l'échelle des acides nucléiques doit être considérée comme un élément de l'évaluation globale de la qualité; il faut toutefois se rappeler que cette analyse ne nous renseigne que sur la séquence codante d'un gène recombinant et ne donne aucune information sur la fidélité de la traduction ou sur les propriétés de la protéine recombinante, par exemple sur sa structure secondaire ou tertiaire ou sur les changements post- traductionnels qu'elle peut subir.

2. JUSTIFICATION DE L'ANALYSE DU VECTEUR D'EXPRESSION

Le but de l'analyse du vecteur d'expression est de déterminer que la séquence codante introduite dans la cellule hôte est celle désirée et qu'elle demeure dans la cellule pendant la durée de la culture et ce, jusqu'à la fin du processus de production. La séquence génétique d'une protéine recombinante fabriquée dans une cellule vivante peut subir des mutations pouvant altérer les propriétés de la protéine de manière potentiellement nuisible pour le patient. Aucune méthode d'analyse ne permet à elle seule de détecter toutes les modifications que peut subir une protéine. On peut recourir à des techniques d'analyse des protéines pour évaluer la séquence d'acides aminés et les caractéristiques structurales de la protéine exprimée suite à des modifications post-traductionnelles telles que la protéolyse, la glycosylation, la phosphorylation ou l'acétylation. Les données de l'analyse des acides nucléiques peuvent être utiles, car les techniques d'analyse de protéines ne permettent pas de détecter tous les changements de structure résultant de mutations de la séquence codante de la protéine recombinante. L'importance relative de l'analyse des acides nucléiques et de l'analyse de la protéine variera selon le produit considéré.

L'analyse des acides nucléiques peut servir à vérifier la séquence codante ainsi que l'état physique du vecteur d'expression. On fait cette analyse pour s'assurer que la protéine exprimée aura la séquence d'acides aminés exacte, non pour rechercher les séquences variantes présentes en faibles quantités. Lorsque les cellules de production contiennent plusieurs copies intégrées du vecteur d'expression, lesquelles ne seront pas nécessairement toutes transcrites, il peut être préférable d'évaluer le produit de la transcription par l'analyse de l'ARNm ou de l'ADNc, plutôt que par l'analyse de l'ADN génomique. Les approches analytiques examinant une population d'acides nucléiques provenant par exemple de différents clones ou de matériel amplifié par la méthode d'amplification en chaîne par la polymérase ("PCR"), peuvent être utilisées au lieu d'approches qui dépendent de la sélection de clones d'ADN individuels. D'autres techniques sensibles et rapides peuvent être considérées pour confirmer la séquence codante de la protéine recombinante dans le vecteur d'expression.

Les sections qui suivent décrivent l'information qu'il convient de fournir sur la caractérisation du vecteur d'expression durant la mise au point et la validation du système de production. Les méthodes d'analyse doivent être validées pour l'usage auquel elles sont destinées, en l'occurrence, la confirmation d'une séquence. L'information présentée à l'appui de la validation doit au moins comprendre une estimation des limites de détection des séquences variantes. Ceci doit être fait pour valider les méthodes de séquençage des acides nucléiques ou des protéines. Les fondements et les principes d'application proposés dans le présent document devront être régulièrement revus à la lumière des progrès de la technologie et de l'information scientifique.

3. CARACTÉRISATION DU SYSTÈME D'EXPRESSION

A. Vecteur d'expression et clone cellulaire servant à la constitution d'une banque de cellules primaire (BCP)

Le fabricant doit préciser la provenance de la séquence nucléotidique codant pour la protéine. Pour ce faire, il doit notamment indiquer l'identité et la provenance de la cellule de laquelle origine la séquence nucléotidique initiale. Il doit aussi décrire les méthodes utilisées pour préparer l'ADN codant pour la protéine.

Il convient de décrire en détail les différentes étapes de l'assemblage du vecteur d'expression. Dans cette description, on doit indiquer la provenance et la fonction des composantes du vecteur d'expression p. ex. les origines de réplication, les gènes de résistance aux antibiotiques, les promoteurs, les amplificateurs, et si la protéine est un produit de fusion ou non. Il faut une carte détaillée des composantes ainsi que la séquence

complète et annotée du plasmide, avec des indications désignant les régions séquencées lors de la construction du vecteur et celles dont la séquence a été trouvée dans des publications. Si d'autres protéines sont encodées dans le plasmide, il faut aussi le signaler. La séquence nucléotidique de la région codant pour le gène d'intérêt en question et les régions adjacentes insérées dans le vecteur jusqu'aux jonctions d'insertion inclusivement, doit être déterminée par le séquençage de l'ADN du vecteur.

Il importe de décrire la méthode utilisée pour introduire le vecteur d'expression dans la cellule hôte. De plus, les méthodes employées pour amplifier le vecteur d'expression et les critères qui ont motivé le choix du clone cellulaire utilisé pour la production doivent être décrits en détail.

B. Banques de cellules

Le système de production de la protéine recombinante doit comprendre des banques de cellules primaires et de cellules de travail bien définies. Une banque de cellules est un ensemble d'ampoules de composition uniforme conservées dans des conditions définies et qui contient une fraction aliquote d'un même pool de cellules. La banque de cellules primaire (BCP) est généralement constituée à partir du clone cellulaire sélectionné qui renferme le vecteur d'expression. La banque de cellules de travail (BCT) est obtenue par la multiplication des cellules d'une ou de plusieurs ampoules de la BCP. Il faut décrire en détail les antécédents de la lignée cellulaire utilisée et le processus par lequel les banques de cellules ont été constituées, en indiquant notamment les méthodes et les réactifs employés durant la culture, l'âge cellulaire *in vitro* et les conditions de conservation. Toutes les banques de cellules doivent être caractérisées pour les marqueurs phénotypiques et génotypiques pertinents pouvant inclure l'expression de la protéine recombinante ou la présence du vecteur d'expression.

Le vecteur d'expression présent dans la BCP devrait être analysé suivant les indications données ci-après. Si la BCP ne peut être soumise directement aux analyses, il faut analyser chaque BCT.

La cartographie de restriction ("restriction endonuclease mapping") ou d'autres techniques appropriées devraient être utilisées pour analyser le vecteur d'expression et déterminer le nombre de copies, la présence d'insertions ou de délétions et le nombre de sites d'intégration. Dans le cas des systèmes d'expression extrachromosomiques, il faut déterminer le pourcentage des cellules hôtes contenant le vecteur d'expression.

Il convient de vérifier la séquence codante de la protéine recombinante dans le vecteur d'expression. Si le système d'expression est extrachromosomique, il faut isoler le vecteur d'expression et vérifier la séquence nucléotidique codant pour le produit sans effectuer de clonage supplémentaire. Pour les cellules contenant des copies chromosomiques du vecteur d'expression, on peut vérifier la séquence nucléotidique codant pour le produit par reclonage et séquençage de ces copies. On peut aussi vérifier la séquence d'acides nucléiques codant pour le produit par séquençage d'un pool de clones d'ADNc ou de matériel amplifié par la méthode d'amplification en chaîne par la polymérase ("PCR"). La séquence d'acides nucléiques doit être identique, dans les limites de détection de la méthode utilisée, à celle du vecteur d'expression laquelle est déterminée suivant les indications données en 3.A; elle doit aussi correspondre à la séquence théorique de la protéine qu'on veut fabriquer.

C. Limite de l'âge cellulaire *in vitro* pour la production

La limite de l'âge cellulaire *in vitro* utilisé pour la production doit être établie d'après les données recueillies sur des cellules de production cultivées à l'échelle pilote ou à l'échelle réelle de production jusqu'à ce que les cultures atteignent ou dépassent l'âge cellulaire *in vitro* proposé. En général, on obtient les cellules de production à partir de la banque de cellules de travail; la banque de cellules primaire peut aussi servir à préparer des cellules de production, pourvu que cette approche soit adéquatement justifiée.

Le vecteur d'expression des cellules de production devrait être analysé une fois pour la BCP, suivant les indications données en 3.B, à l'exception que la séquence codante de la protéine doit être vérifiée soit par des méthodes portant sur les acides nucléiques ou par analyse du produit protéique final. Il faut pouvoir justifier toute hausse de la limite de l'âge cellulaire *in vitro* établie pour la production, par des données obtenues de la culture de cellules à une âge cellulaire *in vitro* qui est égal ou supérieur à la nouvelle limite.

4. CONCLUSION

Il est important de caractériser tant le vecteur d'expression que le protéine finale purifiée pour être en mesure d'assurer une production uniforme de produit dérivé de l'ADN recombinant. De plus, comme nous l'avons vu plus haut, il convient d'évaluer à la fois les résultats de l'analyse des acides nucléiques et de la protéine finale purifiée pour assurer la qualité d'un produit protéique recombinant.

5. GLOSSAIRE

Vecteur d'expression: Vecteur renfermant la séquence codant pour la protéine recombinante et les éléments nécessaires à son expression.

Régions de contrôle adjacentes: Séquences nucléotidiques non codantes adjacentes aux extrémités 5' et 3' de la séquence codant pour le produit; ces séquences renferment d'importants éléments qui influencent la transcription, la traduction ou la stabilité de la séquence codante. Elles comprennent notamment des séquences de promotion, d'amplification et d'épissage, mais ne renferment ni origines de réplication, ni gènes de résistance aux antibiotiques.

Site d'intégration: Site où une ou plusieurs copies du vecteur d'expression sont intégrées au génome de la cellule hôte.

Âge cellulaire *in vitro*: Mesure du temps écoulé depuis la décongélation d'une ou de plusieurs ampoules de la banque de cellules primaire (BCP) jusqu'à la récolte du bioréacteur de production; cette période peut être exprimée en fonction de la durée de culture, du nombre de doublements des cellules ou du nombre de repiquages, lorsque la sous-culture est faite selon une méthode spécifique pour la dilution de la culture.

Banque de cellules primaire (BCP): 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 (BCP). Les analyses pratiquées sur une nouvelle BCP (dérivée d'un clone cellulaire initial antérieur, d'une BCP ou d'une BCT devraient être les mêmes que celles effectuées sur la BCP, à moins qu'on puisse justifier une autre approche.

Échelle de l'usine pilote: Fabrication de la protéine recombinante par un procédé qui reproduit fidèlement les conditions qui existeront à l'échelle réelle de production. À l'exception du volume de production, les procédés de culture cellulaire, de récolte et de purification doivent être les mêmes que pour la fabrication à l'échelle réelle de production.

Marqueurs génotypiques et phénotypiques caractéristiques: Marqueurs permettant d'identifier la souche de la lignée cellulaire et comprenant des facteurs liés à l'expression de la protéine recombinante ou à la présence du vecteur d'expression.

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