

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

00-022591

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, **Évaluation de la Sécurité Virologique des Produits Issus de la Biotechnologie et Dérivés de Lignées Cellulaires d'Origine Humaine ou Animale**, ICH thème Q5A.

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 publications<sup>1</sup>.

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



# LIGNE DIRECTRICE À L'INTENTION DE L' INDUSTRIE

Évaluation de la sécurité virologique des produits issus de  
la biotechnologie et dérivés de lignées cellulaires d'origine  
humaine ou animale  
ICH thème Q5A

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](http://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:*** Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin

N° de catalogue H42-2/67-18-2000F

ISBN 0-662-84883-7

## 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**

I.	INTRODUCTION .....	<u>1</u>
II	SOURCES POTENTIELLES DE CONTAMINATION VIRALE .....	<u>2</u>
A.	Virus pouvant être présents dans la banque de cellules primaire (BCP) .....	<u>3</u>
B.	Virus fortuits pouvant être introduits durant la production .....	<u>3</u>
III.	QUALIFICATION DE LA LIGNÉE CELLULAIRE: ÉPREUVES VIROLOGIQUES .....	<u>3</u>
A.	Épreuves virologiques suggérées pour la BCP, la banque de cellules de travail (BCT) et pour les cellules à la limite de l'âge cellulaire <i>in vitro</i> utilisées pour la production .....	<u>3</u>
1.	<i>Banque de cellules primaire</i> .....	<u>4</u>
2.	<i>Banque de cellules de travail</i> .....	<u>4</u>
3.	<i>Cellules à la limite de l'âge cellulaire in vitro utilisé pour la production</i> .....	<u>4</u>
B.	Épreuves recommandées pour la détection et l'identification des virus .....	<u>5</u>
1.	<i>Dépistage des rétrovirus</i> .....	<u>5</u>
2.	<i>Épreuves in vitro</i> .....	<u>5</u>
3.	<i>Épreuves in vivo</i> .....	<u>6</u>
4.	<i>Épreuves de production d'anticorps</i> .....	<u>6</u>
C.	Acceptabilité des lignées cellulaires .....	<u>6</u>
IV.	DÉPISTAGE DES VIRUS DANS LE VRAC NON TRAITÉ .....	<u>6</u>
V.	JUSTIFICATION ET PROTOCOLE DES ÉTUDES DE CLAIRANCE VIRALE ET DES ÉPREUVES VIROLOGIQUES SUR LE VRAC PURIFIÉ .....	<u>7</u>
VI.	ÉVALUATION ET CARACTÉRISATION DES MÉTHODES DE CLAIRANCE VIRALE .....	<u>10</u>
A.	Choix des virus pour l'évaluation et la caractérisation de la clairance virale . . . .	<u>11</u>
1.	<i>Virus « pertinents » et virus « modèles »</i> .....	<u>11</u>
2.	<i>Autres considérations</i> .....	<u>12</u>
B.	Conception et répercussions des études d'évaluation et de caractérisation de la clairance virale .....	<u>13</u>
1.	<i>Installation et personnel</i> .....	<u>13</u>
2.	<i>Système de production à échelle réduite</i> .....	<u>13</u>

3.	Analyse de l'élimination des virus au cours des étapes de la production	13
4.	Élimination ou inactivation de virus	14
5.	Évaluation de l'inactivation	14
6.	Fonction et régénération des colonnes	15
7.	Précautions particulières	15
C.	Interprétation des études de clairance virale	16
D.	Limites des études de clairance virale	18
E.	Analyse statistique	19
F.	Réévaluation de la clairance virale	19
VII.	RÉSUMÉ	20
VIII.	GLOSSAIRE	20
Tableau 1	Épreuves virologiques à effectuer une seule fois selon le type de banque de cellules	23
Tableau 2	Exemples d'épreuves virologiques pouvant être utilisées et limites de ces épreuves	24
Tableau 3	Détection de virus dans des épreuves de production d'anticorps	25
Tableau 4	Plan d'action relatif à l'évaluation et à la caractérisation de la clairance virale du procédé et aux épreuves virologiques sur le vrac purifié	26
ANNEXE 1	Produits dérivés de banques de cellules caractérisées et cultivées subséquentement <i>in vivo</i>	27
ANNEXE 2	Choix des virus pour les études de clairance virale	28
Tableau A-1	Exemples de virus qui ont été utilisés dans des études de clairance virale	29
ANNEXE 3	Considérations statistiques liées aux épreuves virologiques	30
ANNEXE 4	Calcul des facteurs de réduction dans les études de clairance virale	32
ANNEXE 5	Calcul du nombre de particules par dose	33

## I. INTRODUCTION

Le présent document a trait à l'évaluation de la sécurité virologique des produits issus de la biotechnologie dérivés de lignées de cellules caractérisées d'origine humaine ou animale (mammifères, oiseaux, insectes) et indique les données qui doivent être présentées dans la demande de commercialisation ou d'homologation. Aux fins du présent document, le terme « virus » exclut les agents transmissibles non conventionnels comme ceux associés à l'encéphalopathie spongiforme des bovins (ESB) et à la tremblante du mouton. On encourage les répondants à discuter avec les autorités réglementaires de toute question liée à l'ESB.

Le document traite des produits dérivés de cultures de cellules provenant de banques de cellules caractérisées. Il traite des produits dérivés de cultures de cellules *in vitro*, tels les interférons, les anticorps monoclonaux et les produits issus de l'ADN recombinant, comprenant les vaccins à sous-unités recombinants; il traite également des produits dérivés d'hybridomes cultivés *in vivo* en liquide d'ascite. Dans ce dernier cas, certaines considérations spéciales s'appliquent. Il faut donc référer à l'information additionnelle sur les épreuves réalisées sur des cellules multipliées *in vivo* qui figurent dans l'Annexe 1. Le présent document ne vise pas les vaccins inactivés, tous les vaccins vivants renfermant des agents qui se répliquent spontanément, ni les vecteurs vivants modifiés génétiquement.

Le risque de contamination virale est une caractéristique commune à tous les produits issus de la biotechnologie dérivés de lignées de cellules. Une telle contamination peut avoir de graves conséquences cliniques; elle peut provenir de la contamination des lignées cellulaires originales (substrats cellulaires) ou de l'introduction fortuite de virus durant la production. Toutefois, jusqu'à maintenant les produits issus de la biotechnologie dérivés de lignées cellulaires n'ont pas été la cause de la transmission de virus. Néanmoins, il reste que la sécurité de ces produits en ce qui a trait à la contamination par des virus ne peut être raisonnablement assurée que par l'instauration d'un programme de dépistage des virus et par l'évaluation de la capacité du procédé de fabrication d'éliminer ou d'inactiver les virus, comme il est décrit plus bas.

Trois approches complémentaires principales sont en usage pour le contrôle d'une contamination virale éventuelle des produits issus de la biotechnologie:

- a) choisir et tester les lignées cellulaires et les autres matières premières, y compris les éléments constitutifs du milieu, et vérifier qu'elles sont exemptes de virus indésirables qui peuvent être infectieux et/ou pathogènes pour les humains;
- b) évaluer la capacité des procédés de production d'éliminer les virus infectieux;



- c) soumettre le produit, aux étapes appropriées de sa production, à des épreuves permettant de confirmer l'absence de virus infectieux.

Toutes les épreuves sont soumises à la limite inhérente à la mesure quantitative des virus, soit la capacité de détecter de faibles concentrations de virus qui dépend, pour des raisons statistiques, de la taille de l'échantillon. Par conséquent, aucune approche ne pourra établir nécessairement à elle seule la sécurité du produit. Dans bien des cas, l'assurance que des virus infectieux sont absents du produit final ne proviendra pas uniquement d'épreuves virologiques directes, mais également de la démonstration que le protocole de purification est capable d'éliminer ou d'inactiver les virus.

Le type et l'étendue des épreuves virologiques et des études de clairance virale requises à différentes étapes de la production dépendront de divers facteurs et devront être établis dans chaque cas et étape par étape. Les facteurs à considérer sont le degré de caractérisation et de qualification de la banque de cellules, la nature des virus décelés, les composantes du milieu de culture, les méthodes de culture, le type d'installation et d'équipement, les résultats des épreuves virologiques après la culture des cellules, la capacité du procédé d'éliminer les virus et enfin le type de produit et son usage clinique prévu.

Le présent document présente un cadre général pour les épreuves virologiques, les expériences nécessaires pour l'évaluation de la clairance virale et une approche recommandée pour la conception des épreuves virologiques et des études de clairance virale. Des renseignements connexes sont présentés dans les annexes et certaines définitions ont été réunies dans un glossaire.

Le fabricant doit adapter les recommandations présentées dans le présent document à son produit et à son procédé de fabrication. L'approche utilisée par le fabricant dans sa stratégie globale de vérification de la sécurité virologique doit être expliquée et justifiée. Il serait utile que le fabricant fournisse, outre les données détaillées, un résumé de son évaluation de la sécurité virologique de qui pourra faciliter la tâche des autorités réglementaires. Ce résumé devrait contenir une brève description de tous les aspects des études de sécurité virologique et des stratégies utilisées pour prévenir la contamination par des virus visés par le présent document.

## **II SOURCES POTENTIELLES DE CONTAMINATION VIRALE**

La contamination par des virus des produits issus de la biotechnologie peut provenir de la source originale des lignées cellulaires ou de l'introduction accidentelle de virus dans le cadre des procédés de production.

**A. Virus pouvant être présents dans la banque de cellules primaire (BCP)**

Les cellules peuvent présenter une infection virale latente ou persistante (p.ex. virus herpès) ou renfermer un rétrovirus endogène dont le génome persiste dans la cellule et qui peut se transmettre verticalement d'une génération de cellules à l'autre. De tels virus peuvent s'exprimer constitutivement ou devenir inopinément infectieux.

Les virus peuvent être introduits dans les BCP de plusieurs façons : 1) utilisation de lignées cellulaires provenant d'animaux infectés; 2) utilisation de virus pour établir la lignée cellulaire; 3) utilisation de réactifs biologiques contaminés, p. ex. constituants sériques animaux; 4) contamination durant la manipulation des cellules.

**B. Virus fortuits pouvant être introduits durant la production**

Des virus fortuits peuvent être introduits dans le produit final de diverses façons. Mentionnons, entre autres : 1) l'utilisation de réactifs biologiques contaminés, tels des constituants sériques animaux; 2) l'utilisation d'un virus pour provoquer l'expression de gènes codant spécifiquement une protéine d'intérêt; 3) l'utilisation d'un réactif contaminé, tel un anticorps monoclonal sur une colonne d'affinité; 4) l'utilisation d'un excipient contaminé durant la formulation; 5) la contamination durant la manipulation des cellules et des milieux. Une surveillance des paramètres de la culture cellulaire peut être utile pour détecter précocement une contamination virale fortuite.

**III. QUALIFICATION DE LA LIGNÉE CELLULAIRE: ÉPREUVES VIROLOGIQUES**

Une étape importante dans la qualification d'une lignée cellulaire utilisée dans l'obtention d'un produit issu de la biotechnologie comprend des épreuves virologiques appropriées.

**A. Épreuves virologiques suggérées pour la BCP, la banque de cellules de travail (BCT) et pour les cellules à la limite de l'âge cellulaire *in vitro* utilisées pour la production**

Le *tableau 1* donne un exemple d'épreuves virologiques à exécuter une fois seulement à diverses phases de la culture cellulaire, notamment la BCP, la BCT et les cellules à la limite de l'âge cellulaire *in vitro* utilisé pour la production.

### **1. Banque de cellules primaire**

Il faut réaliser des épreuves poussées de dépistage de la contamination de la BCP par des virus endogènes et non endogènes. Dans le cas des lignées cellulaires hétérohybrides dans lesquelles un ou plusieurs des partenaires sont d'origine humaine ou d'autres primates, il faut réaliser des épreuves de dépistage des virus humains ou d'autres primates, puisqu'une contamination virale de ces cellules peut présenter un danger particulier.

Les épreuves de dépistage de virus non endogènes doivent comprendre des épreuves d'inoculation *in vitro* et *in vivo* et toutes les autres épreuves spécifiques appropriées, notamment l'épreuve de production d'anticorps de souris ("mouse antibody production" ou "MAP"), basées sur les antécédents de repiquage de la lignée cellulaire, de façon à déceler la présence éventuelle de virus.

### **2. Banque de cellules de travail**

Chaque BCT utilisée comme substrat cellulaire pour la production d'un médicament doit faire l'objet d'un dépistage des virus fortuits, soit par le moyen d'une épreuve de dépistage, soit par l'analyse des cellules parvenues à la limite de l'âge cellulaire *in vitro* qui proviennent de cette BCT. Lorsque des épreuves appropriées de dépistage des virus non endogènes ont été réalisées sur la BCP et que des cellules cultivées au moins jusqu'à la limite de l'âge cellulaire *in vitro* ont été obtenues de la BCT et ont fait l'objet d'une épreuve de dépistage de la présence de virus fortuits, il n'est pas nécessaire de répéter ces épreuves sur la BCT initiale. Les épreuves de production d'anticorps ne sont habituellement pas nécessaires dans le cas de la BCT. Une autre approche dans laquelle toutes les épreuves sont réalisées sur la BCT plutôt que sur la BCP serait également acceptable.

### **3. Cellules à la limite de l'âge cellulaire *in vitro* utilisé pour la production**

La limite de l'âge cellulaire *in vitro* utilisé pour la production doit être basée sur des données provenant de cellules utilisées pour la production à l'échelle pilote ou industrielle et multipliées au moins jusqu'à l'âge cellulaire *in vitro* proposé. En général, les cellules utilisées pour la production sont obtenues par multiplication de la BCT; la BCP pourrait également être utilisée pour préparer ces cellules. Les cellules à la limite de l'âge cellulaire *in vitro* doivent faire l'objet d'un dépistage des virus endogènes qui pourraient ne pas avoir été décelés dans la BCT et la BCP. L'exécution des épreuves appropriées (p.ex. *in vitro* et *in vivo*) au moins une fois sur des cellules à la limite de l'âge cellulaire *in vitro* utilisé pour la production sert à confirmer que le procédé de production n'est pas sujet à la contamination par des virus fortuits. Lorsque des virus fortuits sont détectés à ce niveau, il faut vérifier minutieusement le procédé pour déterminer la cause de la contamination et le modifier complètement au besoin.

## B. Épreuves recommandées pour la détection et l'identification des virus

De nombreuses épreuves peuvent servir à détecter les virus endogènes et fortuits. Le *tableau 2* en donne des exemples. Ces protocoles d'épreuves sont ceux qui sont recommandés à l'heure actuelle, mais la liste n'est ni exhaustive ni définitive. Comme les techniques les plus pertinentes peuvent changer avec les progrès de la science, on pourra proposer des techniques de remplacement, à la condition qu'elles soient étayées par des données adéquates. On incite les fabricants à en discuter avec les autorités réglementaires. D'autres épreuves peuvent se révéler nécessaires selon le cas. Pour que les épreuves soient suffisamment sensibles et spécifiques, il faut prévoir les contrôles appropriés. Des épreuves ou approches spécifiques peuvent s'avérer nécessaires lorsque, d'après l'espèce d'origine du substrat cellulaire, il est fort probable qu'un certain virus soit présent. Lorsque la lignée cellulaire utilisée pour la production est d'origine humaine ou provient d'un autre primate, il faut réaliser des épreuves additionnelles de détection des virus humains, comme les virus responsables de l'immunodéficience et de l'hépatite, à moins de justifications contraires. L'amplification en chaîne par la polymérase ("PCR" ou «polymerase chain reaction») peut se révéler utile pour détecter des séquences de ces virus humains ou celles d'autres virus spécifiques. Voici une brève description de la méthode générale et des considérations théoriques sur lesquelles le fabricant doit fonder son approche.

### 1. Dépistage des rétrovirus

Dans le cas de la BCP et des cellules cultivées au moins jusqu'à la limite de l'âge cellulaire *in vitro* utilisé pour la production, il faut faire un dépistage des rétrovirus, et réaliser notamment des épreuves d'infectivité au moyen de cultures de cellules susceptibles et des études au microscope électronique (ME). Lorsqu'on ne décèle pas d'infectivité et qu'aucun rétrovirus ou particule semblable n'est observé au ME, on doit utiliser la transcriptase inverse (TI) ou d'autres épreuves appropriées pour détecter des rétrovirus qui pourraient se révéler non infectieux. Des études d'induction ne se sont pas révélées utiles.

### 2. Épreuves *in vitro*

Dans les épreuves *in vitro*, on inocule le produit d'essai (*voir le tableau 2*) dans diverses cultures cellulaires indicatrices susceptibles capables de déceler toute une gamme de virus humains et animaux pertinents. On choisit les cellules en fonction de l'espèce d'origine de la banque de cellules, mais il faut inclure une lignée cellulaire humaine ou provenant d'un autre primate vulnérable aux virus humains. La nature de l'épreuve et de l'échantillon à analyser dépend du type de virus susceptible d'être présent selon l'origine des cellules ou à cause de leur manipulation. Il faut rechercher les virus cytopathogènes et hémadsorbants.

### 3. *Épreuves in vivo*

Le produit d'essai (*voir le tableau 2*) doit être inoculé à des animaux, notamment à des souris non sevrés et à des souris adultes, et dans des oeufs embryonnés pour révéler les virus qui ne se multiplient pas dans les cultures cellulaires. On peut utiliser d'autres espèces animales selon la nature et la source des lignées cellulaires utilisées. Il faut surveiller la santé des animaux et enquêter sur toute anomalie pour établir la cause de la maladie.

### 4. *Épreuves de production d'anticorps*

On peut déceler certains virus spécifiques à l'espèce dans des lignées cellulaires de rongeur en inoculant le produit d'essai (*voir le tableau 2*) à des animaux exempts de virus et en déterminant le taux d'anticorps sériques ou l'activité enzymatique après une certaine période. On peut utiliser par exemple l'épreuve de production d'anticorps de souris ("MAP"), l'épreuve de production d'anticorps de rat ("RAP") et l'épreuve de production d'anticorps de hamster ("HAP"). Le *tableau 3* indique les virus qui peuvent être décelés par les épreuves de production d'anticorps.

## C. **Acceptabilité des lignées cellulaires**

On sait que certaines lignées cellulaires utilisées pour la fabrication du produit renfermeront des rétrovirus endogènes, d'autres virus ou des séquences virales. Dans de telles circonstances, le protocole recommandé pour la fabrication est décrit à la section V du présent document. Les autorités réglementaires détermineront dans chaque cas l'acceptabilité des lignées cellulaires renfermant des virus autres que des rétrovirus endogènes, en tenant compte de l'analyse des risques et des avantages, basée sur l'avantage que présente le produit et son usage clinique prévu, la nature des virus présents, leur capacité d'infecter des humains ou de causer des maladies aux humains, le procédé de purification du produit (p. ex. les données d'évaluation de la clairance virale) et le nombre d'épreuves virologiques effectuées sur le vrac purifié.

## IV. **DÉPISTAGE DES VIRUS DANS LE VRAC NON TRAITÉ**

Le vrac non traité est constitué d'une ou de plusieurs récoltes de cellules et de milieux de culture. Lorsque les cellules ne sont pas facilement accessibles (p. ex. réacteur à fibres creuses ou systèmes semblables), le vrac non traité est constitué du liquide recueilli dans le fermenteur. En prélevant un échantillon représentatif du vrac non traité dans le réacteur de production avant tout

traitement ultérieur, on a une forte probabilité de détecter une contamination par des virus fortuits, le cas échéant. Les épreuves appropriées de détection des virus doivent être exécutées à l'étape du vrac non traité, à moins qu'une épreuve soit rendue plus sensible grâce à un traitement partiel initial (p. ex. le vrac non traité peut être toxique pour les cultures de cellules, alors que le vrac partiellement traité peut ne pas l'être).

Dans certains cas, il peut être préférable de réaliser l'épreuve sur un mélange constitué de cellules intactes et de cellules lysées, et d'enlever le surnageant de la culture de cellules du réacteur de production avant tout traitement ultérieur. Des données provenant d'au moins trois lots de vrac non traité à l'échelle pilote ou industrielle doivent être présentées dans le cadre d'une demande de commercialisation ou d'homologation.

On recommande aux fabricants d'élaborer des programmes d'évaluation continue de la présence de virus fortuits dans les lots de production. On doit déterminer l'ampleur, le nombre et la fréquence des épreuves virologiques à effectuer sur le vrac non traité à partir de plusieurs facteurs, dont la nature des lignées cellulaires utilisées pour l'obtention des produits désirés, les résultats et le nombre des épreuves virologiques exécutées durant la qualification des lignées cellulaires, la méthode de culture, les sources de matières premières et les résultats des études de clairance virale. En général des épreuves *in vitro*, utilisant une ou plusieurs lignées cellulaires sont employées pour dépister la présence de virus dans le vrac non traité. On peut utiliser au besoin la méthode "PCR" ou d'autres méthodes appropriées.

En général, le matériel récolté dans lequel des virus fortuits ont été détectés ne doit pas être utilisé dans la fabrication du produit. Lorsque des virus fortuits sont détectés à cette étape, il faut vérifier minutieusement le procédé pour déterminer la cause de la contamination et prendre les mesures appropriées.

## **V. JUSTIFICATION ET PROTOCOLE DES ÉTUDES DE CLAIRANCE VIRALE ET DES ÉPREUVES VIROLOGIQUES SUR LE VRAC PURIFIÉ**

Il est important de concevoir le protocole le plus pertinent et le plus rationnel pour les épreuves virologiques à l'étape de la BCP, aux diverses étapes de la production du médicament et jusqu'au produit final, en passant par une évaluation et une caractérisation de la clairance virale du vrac non traité. L'évaluation et la caractérisation de la clairance virale jouent ici un rôle important. L'objectif devrait être d'obtenir la meilleure assurance que le produit est libre de contamination virale.

Lors du choix des virus à utiliser dans une étude de clairance, il est utile de faire la distinction entre la nécessité d'évaluer la capacité du procédé d'éliminer les virus que l'on sait présents et celle d'établir la robustesse du procédé par la caractérisation de la clairance de virus modèles non spécifiques (voir plus loin). Le glossaire donne une définition des virus pertinents, modèles spécifiques et modèles non spécifiques. Pour évaluer un procédé, il est nécessaire de connaître la quantité de virus qui peut être présent dans ce procédé, p.ex. dans le vrac non traité, et quelle quantité peut être éliminée. Il est également utile de connaître l'influence du temps sur les méthodes d'inactivation afin d'assurer l'efficacité du procédé. Dans l'évaluation de la clairance de contaminants connus, il faut effectuer des études poussées d'inactivation en fonction du temps, faire la démonstration que l'inactivation ou l'élimination peut être reproduite et évaluer les paramètres du procédé. Lorsqu'on caractérise la robustesse de clairance d'un procédé de fabrication à l'aide de virus modèles non spécifiques, il faut porter une attention particulière aux virus dépourvus d'enveloppe dans le protocole de l'étude. L'ampleur des études de caractérisation de la clairance virale pourra dépendre des résultats des épreuves réalisées sur des lignées cellulaires et sur le vrac non traité. Ces études seront effectuées de la manière décrite ci-après (*section VI*).

Le *tableau 4* offre un exemple d'un plan d'action relatif à l'évaluation et à la caractérisation de la clairance virale du procédé ainsi qu'aux épreuves virologiques effectuées sur le vrac purifié, basé sur les résultats des épreuves virologiques sur des cellules ou sur le vrac non traité. On envisage divers cas. Dans tous les cas, il faut effectuer une caractérisation de la clairance à l'aide de virus modèles non spécifiques. Les situations les plus courantes sont les **cas A** et **B**. Les systèmes de production contaminés par un virus autre qu'un rétrovirus de rongeur ne sont normalement pas utilisés. Lorsqu'il existe des motifs probants et justifiés de produire un médicament à l'aide d'une lignée cellulaire dans les **cas C, D** ou **E**, il faut en discuter avec les autorités réglementaires. Dans les **cas C, D** et **E**, il est important de prévoir des étapes efficaces et validées d'inactivation ou d'élimination du virus en question dans le procédé de fabrication.

**Cas A :** Lorsqu'aucun virus ou particule semblable à un virus ou à un rétrovirus n'a été décelé dans les cellules ou dans le vrac non traité, les études d'élimination et d'inactivation doivent être effectuées à l'aide de virus modèles non spécifiques, ainsi qu'il a déjà été précisé.

**Cas B :** Lorsqu'on a décelé uniquement un rétrovirus de rongeur (ou une particule semblable à un rétrovirus de rongeur jugée non pathogène, comme les particules de type A et R), il faut effectuer une évaluation du procédé à l'aide d'un virus modèle spécifique, comme le virus de la leucémie murine. Le vrac purifié doit être analysé à l'aide de

méthodes très spécifiques et très sensibles pour la détection du virus en question. En ce qui a trait à l'autorisation de commercialisation, il faut fournir des données provenant d'au moins trois lots de vrac purifié à l'échelle pilote ou industrielle. Des lignées cellulaires comme CHO, C127, BHK et des hybridomes murins ont été fréquemment utilisés comme substrats pour la production de médicaments et aucun problème de sécurité lié à la contamination des produits par des virus n'a été signalé. Dans le cas des lignées cellulaires dans lesquelles les particules endogènes ont été amplement caractérisées et dont la clairance a été démontrée, il n'est habituellement pas nécessaire de vérifier l'absence de particules non infectieuses dans le vrac purifié. Il convient d'effectuer des études avec des virus modèles non spécifiques, comme dans le **cas A**.

**Cas C :** Lorsque les cellules ou le vrac non traité renferment un virus autre qu'un rétrovirus de rongeur, pour lequel aucune preuve de sa capacité d'infecter les humains n'a été démontrée (comme les virus indiqués dans la *note 2* du *tableau 3*, sauf les rétrovirus de rongeur (**cas B**)), les études d'évaluation de l'élimination et de l'inactivation des virus doivent être effectuées avec le virus identifié. S'il n'est pas possible d'utiliser le virus identifié, il faut utiliser des virus pertinents ou des virus modèles spécifiques pour démontrer que la clairance est acceptable. Il faut déterminer, dans le cadre de l'évaluation du procédé à l'égard de ces virus, l'inactivation du virus identifié en fonction du temps (ou encore du virus pertinent ou du virus modèle spécifique) aux étapes cruciales de l'inactivation. Les méthodes utilisées pour les épreuves virologiques sur le vrac purifié doivent être très spécifiques et très sensibles pour la détection du virus en question. Pour les fins de l'autorisation de commercialisation, il faut fournir des données provenant d'au moins trois lots de vrac purifié fabriqué à l'échelle pilote ou industrielle.

**Cas D :** Lorsqu'un pathogène connu pour l'humain est identifié, comme ceux indiqués dans la *note 1* du *tableau 3*, le produit ne sera acceptable que dans des circonstances exceptionnelles. Dans un tel cas, il est recommandé d'utiliser le virus identifié pour les études d'évaluation de l'élimination et de l'inactivation des virus et des méthodes très spécifiques et très sensibles pour la détection du virus en question. S'il n'est pas possible d'utiliser le virus identifié, il faut utiliser des virus pertinents ou des virus modèles spécifiques (voir ci-après). Il doit être démontré que le procédé permet l'élimination et l'inactivation des virus utilisés durant les procédés de purification et d'inactivation. Il faut obtenir des données d'inactivation en fonction du temps pour les étapes cruciales de l'inactivation dans le cadre du processus d'évaluation. Les méthodes utilisées pour les épreuves sur le vrac purifié doivent être très spécifiques et très sensibles pour la détection du virus en question. Pour les fins de l'autorisation de commercialisation, il faut fournir des données provenant d'au moins trois lots de vrac purifié fabriqué à l'échelle pilote ou industrielle.



**Cas E :** Lorsqu'un virus qui ne peut être classé par les méthodes actuelles et détecté dans les cellules ou le vrac non traité, le produit est habituellement considéré comme inacceptable car le virus peut se révéler pathogène. Dans le cas très rare où il existe des motifs probants et justifiés de fabriquer un médicament à l'aide d'une telle lignée cellulaire, les autorités réglementaires doivent être consultées avant d'aller plus loin.

## VI. ÉVALUATION ET CARACTÉRISATION DES MÉTHODES DE CLAIRANCE VIRALE

L'évaluation et la caractérisation des méthodes d'élimination ou d'inactivation des virus jouent un rôle important dans l'établissement de la sécurité d'emploi des produits issus de la biotechnologie. De nombreux cas de contamination dans le passé ont été liés à des agents dont la présence n'était pas connue ou même soupçonnée et, bien que des produits biologiques dérivés de diverses sources autres que des lignées cellulaires bien caractérisées aient été impliqués, une évaluation de la clairance virale permet d'assurer que le procédé peut éliminer des virus inconnus, non soupçonnés et dangereux. Les études doivent être bien documentées et bien contrôlées.

L'objectif des études de clairance virale est d'évaluer les étapes du procédé qui peuvent être considérées comme efficaces dans l'inactivation ou l'élimination des virus et d'évaluer quantitativement le degré de réduction globale des virus que le procédé permet d'obtenir. On peut obtenir cette information en ajoutant délibérément des quantités importantes d'un virus à la matière première et/ou aux différentes fractions obtenues lors des diverses étapes du procédé et en démontrant son élimination ou son inactivation au cours des étapes subséquentes. Il n'est pas nécessaire d'évaluer ou de caractériser chaque étape d'un procédé de fabrication si l'on arrive à démontrer une clairance adéquate avec un plus petit nombre d'étapes. Il ne faut pas oublier que d'autres étapes du procédé peuvent avoir un effet indirect sur le degré d'inactivation ou d'élimination des virus obtenu. Les fabricants doivent expliquer et justifier l'approche utilisée dans les études destinées à évaluer la clairance virale. On peut obtenir une réduction de l'infectivité des virus en éliminant les virions ou en les inactivant. Pour chaque étape de production évaluée, il faut décrire les mécanismes probables de perte de l'infectivité virale en indiquant si elle est due à l'inactivation ou à l'élimination. En ce qui concerne les étapes d'inactivation, il faut planifier l'étude de façon à prélever des échantillons à différents temps, puis à dessiner une courbe d'inactivation (voir la section VI.B.5).

Les études d'évaluation de la clairance virale sont réalisées pour démontrer la clairance d'un virus dont la présence est reconnue dans la BCP et/ou pour procurer une certaine assurance que des virus fortuits qui n'ont pu être détectés, ou qui pourraient être introduits dans le procédé de

production, seront éliminés ou inactivés. Les facteurs de réduction sont normalement exprimés sur une échelle logarithmique, ce qui signifie que si l'infectivité résiduelle d'un virus ne sera jamais réduite à zéro, elle pourra quand même être grandement réduite mathématiquement.

Outre les études de clairance virale visant les virus dont la présence est reconnue, il faut réaliser des études pour caractériser la capacité d'éliminer ou d'inactiver d'autres virus. L'objet des études sur des virus dont la présence n'est pas reconnue ou prévue, mais qui peuvent présenter diverses propriétés biochimiques et biophysiques, est de caractériser la robustesse du procédé plutôt que d'obtenir une valeur cible d'inactivation ou d'élimination. Il est souhaitable de démontrer la capacité du procédé de production d'inactiver ou d'éliminer les virus (*voir la section VI.C*). Ces études n'ont pas pour but d'évaluer un risque spécifique lié à la sécurité d'emploi du produit. Il n'est donc pas nécessaire d'obtenir une valeur de clairance spécifique.

#### **A. Choix des virus pour l'évaluation et la caractérisation de la clairance virale**

Les virus choisis pour les études d'évaluation et de caractérisation de la clairance virale du procédé, doivent être choisis pour leur ressemblance aux virus qui peuvent contaminer le produit et doivent présenter une large gamme de propriétés physico-chimiques, de manière à vérifier la capacité du système d'éliminer les virus en général. Le fabricant doit justifier le choix des virus conformément aux objectifs de l'étude d'évaluation et de caractérisation et aux indications fournies dans la présente directive.

##### ***1. Virus « pertinents » et virus « modèles »***

L'un des aspects importants d'une étude de clairance virale est de déterminer quels virus on doit utiliser. Ces virus appartiennent à trois catégories : les virus pertinents, les virus modèles spécifiques et les virus modèles non spécifiques.

Les virus pertinents sont des virus utilisés dans les études de clairance virale qui sont soit les virus identifiés ou des virus appartenant aux mêmes espèces que ceux dont la présence est reconnue ou qui sont susceptibles de contaminer le substrat cellulaire ou tout autre réactif ou matériel utilisé dans le procédé de production. Il faut faire la démonstration que la méthode de purification et/ou d'inactivation peut éliminer ou inactiver ces virus. Lorsqu'aucun virus pertinent n'est disponible ou lorsqu'il n'est pas bien adapté aux études de clairance virale (p. ex. lorsqu'on ne peut pas en obtenir un titre suffisamment élevé *in vitro*), il faut le remplacer par un virus modèle spécifique. Un virus modèle spécifique approprié peut être un virus étroitement apparenté au virus observé ou soupçonné (même genre ou famille) et dont les propriétés physiques et chimiques sont semblables.

Les lignées cellulaires dérivées de rongeurs renferment habituellement des particules de rétrovirus endogènes ou des particules apparentées qui peuvent se révéler infectieuses (particules de type C) ou non infectieuses (particules cytoplasmiques de type A et R). Il importe de déterminer la capacité du procédé de fabrication d'éliminer ou d'inactiver les rétrovirus de rongeurs présents dans les produits obtenus de ces cellules. On peut utiliser pour ce faire un virus de la leucémie murine, qui est un virus modèle spécifique dans le cas des cellules d'origine murine. Lorsque des lignées cellulaires humaines sécrétant des anticorps monoclonaux ont été obtenues par l'immortalisation des lymphocytes B par le virus Epstein-Barr ("EBV"), il faut déterminer la capacité du procédé de fabrication d'éliminer ou d'inactiver un virus herpès. Le virus de la pseudorange peut également être utilisé comme virus modèle spécifique.

Lorsque l'objectif est de caractériser la capacité du procédé de fabrication d'éliminer ou d'inactiver les virus en général, c.-à-d. de caractériser la robustesse de la méthode de clairance, il faut effectuer des études de caractérisation de la clairance virale avec un virus modèle non spécifique aux propriétés différentes. Les données obtenues d'études avec des virus pertinents ou des virus modèles spécifiques peuvent également contribuer à cette évaluation. Il n'est pas nécessaire d'utiliser tous les types de virus. La préférence doit aller aux virus qui montrent une résistance importante aux traitements physiques ou chimiques. Les résultats obtenus avec ces virus fournissent des données utiles sur la capacité du procédé de production d'éliminer ou d'inactiver les virus en général. Le choix et le nombre de virus utilisés dépendront de la qualité et de la caractérisation des lignées cellulaires et du procédé de production.

*L'annexe 2 et le tableau A-1* donnent des exemples de virus modèles utiles possédant diverses structures physico-chimiques et des exemples de virus qui ont été utilisés dans des études de clairance virale.

## **2. *Autres considérations***

Les points suivants sont aussi à considérer:

- a) Il est souhaitable d'utiliser des virus qui peuvent être cultivés à des titres élevés, mais ce n'est pas toujours possible.
- b) Il faut une épreuve efficace et fiable pour la détection de chaque virus utilisé et pour chaque étape de fabrication vérifiée.
- c) Il faut porter attention aux dangers que certains virus peuvent présenter pour la santé du personnel qui exécute les études de clairance.

**B. Conception et répercussions des études d'évaluation et de caractérisation de la clairance virale****1. Installation et personnel**

Les BPF interdisent l'introduction des virus dans une installation de production. Par conséquent, les études de clairance virale doivent être effectuées dans un laboratoire séparé doté du matériel permettant de faire des travaux virologiques, avec un personnel d'expérience dans ce domaine et aidé du personnel de production chargé de concevoir et de préparer une version à échelle réduite de la méthode de purification.

**2. Système de production à échelle réduite**

La validité de la réduction de l'échelle de production doit être démontrée. Le degré de purification obtenu avec la version à échelle réduite doit être le plus représentatif possible de celui qu'il est possible d'obtenir avec le procédé de production. Dans le cas de matériel de chromatographie, la hauteur du lit des colonnes, le taux du débit linéaire, le ratio débit/volume du lit de la colonne (temps de contact), les types de tampons et de gels, le pH, la température et la concentration des protéines, des sels et du produit doivent être représentatifs du procédé à l'échelle industrielle. Le profil d'éluion obtenu doit être similaire. Les mêmes considérations s'appliquent à d'autres méthodes. On doit discuter des écarts inévitables et de leur influence sur les résultats.

**3. Analyse de l'élimination des virus au cours des étapes de la production**

Lorsqu'on exécute des études de clairance virale, il est souhaitable d'évaluer la contribution de plus d'une étape de production à l'élimination de virus. Il faut évaluer séparément chaque étape susceptible de contribuer à l'élimination ou à l'inactivation de virus et donner une définition exacte de ce qu'est une étape de production. Il faut une quantité suffisante de virus à chaque étape pour obtenir une évaluation adéquate de l'efficacité de cette étape. En général, il faut ajouter le virus au matériel en cours de procédé à chaque étape évaluée. Dans certains cas, il suffit d'ajouter un titre élevé de virus au vrac non purifié et d'en vérifier la concentration entre les diverses étapes. Lorsque l'élimination de virus résulte de l'utilisation de méthodes de séparation, il est recommandé, le cas échéant et dans la mesure du possible, de déterminer la distribution de la charge virale dans les différentes fractions. Lorsqu'on utilise des tampons virucides dans plusieurs étapes du procédé de fabrication, on peut faire appel à d'autres stratégies, comme l'addition en parallèle de virus dans des tampons moins virucides, dans le cadre de l'évaluation globale du procédé. Il faut déterminer le titre du virus avant et après chaque étape vérifiée. Les épreuves quantitatives de l'infectivité doivent être suffisamment sensibles et reproductibles et elles doivent être exécutées avec un nombre suffisant d'échantillons en parallèle pour assurer la validité statistique du résultat. Lorsque cela

s'avère justifié, on peut avoir recours à des épreuves quantitatives non liées à l'infectivité. Il faut inclure des virus témoins dans toutes les épreuves d'infectivité pour assurer la sensibilité de la méthode. En outre, il faut établir la valeur statistique des prélèvements de virus présents à faible concentration (*Annexe 3*).

#### **4. Élimination ou inactivation de virus**

On peut réduire l'infectivité d'un virus en l'éliminant ou en l'inactivant. Pour chaque étape de production évaluée, il faut indiquer si le mécanisme probable de perte de l'infectivité virale tient à une inactivation ou à une élimination du virus. Lorsque le procédé de production ne permet pas d'obtenir une réduction adéquate de l'infectivité et que l'élimination du virus est considérée comme un facteur important de la sécurité d'emploi du produit, il faut introduire des étapes spécifique ou additionnelles d'inactivation ou d'élimination. Il peut être nécessaire de faire la distinction entre l'élimination et l'inactivation à une étape donnée, par exemple lorsqu'il est possible qu'un tampon utilisé dans plus d'une étape contribue à l'inactivation à chaque étape; ainsi, il faut distinguer la contribution à l'inactivation d'un tampon utilisé dans plusieurs étapes de chromatographie et l'élimination obtenue à chacune de ces étapes.

#### **5. Évaluation de l'inactivation**

Pour évaluer l'inactivation de virus, il faut ajouter aux matières premières non traitées ou à des matières intermédiaires une quantité connue de virus infectieux et calculer le facteur de réduction obtenu. Il faut comprendre que l'inactivation d'un virus n'est pas une simple réaction du premier ordre et qu'elle est habituellement plus complexe, avec une phase 1 rapide et une phase 2 lente. Il faut donc planifier l'étude de façon à prélever des échantillons à différents temps puis à obtenir une courbe d'inactivation. Il est recommandé que les études d'inactivation comprennent au moins un point de prélèvement dans le temps compris entre le temps zéro et le temps d'exposition minimum, en plus du point correspondant au temps d'exposition minimum. Les données additionnelles sont particulièrement importantes lorsque le virus est un virus pertinent réputé pathogène pour l'humain et qu'on veut établir une méthode d'inactivation efficace. Toutefois, dans le cas des études d'inactivation dans lesquelles des virus modèles non spécifiques sont utilisés ou lorsque des virus modèles spécifiques sont utilisés à la place de virions telles les particules intracytoplasmiques apparentées à un rétrovirus que l'on trouve dans les cellules CHO, il faut montrer que la clairance est reproductible dans au moins deux études indépendantes. Dans la mesure du possible, il faut déterminer la charge virale initiale à partir du virus détecté dans le matériel de départ auquel il a été inoculé. Si cela n'est pas possible, on peut calculer la charge virale initiale à partir du titre de la préparation virale utilisée pour

inoculer le matériel de départ. Lorsque l'inactivation est trop rapide pour tracer une courbe d'inactivation dans les conditions d'usage du procédé, il faut prévoir des témoins appropriés démontrant que l'inactivation est réellement responsable de la réduction de l'infectivité.

#### **6. Fonction et régénération des colonnes**

La capacité des colonnes de chromatographie et autres dispositifs utilisés dans le procédé de purification dans le but d'éliminer les virus peut varier avec le temps et après un usage répété. Un calcul de la stabilité de la clairance virale après plusieurs utilisations peut justifier l'utilisation répétée de ces colonnes. Il faut fournir l'assurance que tout virus potentiellement retenu par le système de production est adéquatement détruit ou éliminé avant que le système ne soit réutilisé, par exemple en démontrant que les méthodes de nettoyage et de régénération inactivent ou éliminent vraiment le virus.

#### **7. Précautions particulières**

- a) Dans la préparation d'un virus dont le titre est élevé, il faut éviter l'agrégation qui pourrait accroître l'élimination du virus, mais réduire son inactivation et fausser ainsi la corrélation avec la production réelle.
- b) Afin d'assurer la fiabilité des épreuves de dépistage, il faut porter attention à la quantité minimale de virus pouvant être détectée.
- c) L'étude doit prévoir des épreuves témoins en parallèle pour évaluer la perte d'infectivité due à des raisons comme la dilution, la concentration, la filtration ou le stockage des échantillons avant le titrage.
- d) Un petit volume de virus doit être ajouté au produit de façon à ne pas diluer ou modifier les caractéristiques du produit. Un échantillon protéique dilué lors des épreuves n'est plus identique au produit obtenu à l'échelle industrielle.
- e) De petites différences au niveau des tampons, des milieux ou des réactifs, par exemple, peuvent modifier la clairance virale de façon notable.
- f) L'inactivation des virus se fait en fonction du temps. Par conséquent, le temps qu'un produit, auquel on a ajouté un virus, demeure dans une solution tampon ou dans une colonne de chromatographie doit correspondre aux conditions du procédé à l'échelle industrielle.

- g) Il faut évaluer séparément la toxicité ou l'interférence que peuvent présenter les tampons et le produit dans les épreuves utilisées pour déterminer le titre du virus, car ces éléments peuvent avoir un effet néfaste sur les cellules indicatrices. Si les solutions sont toxiques pour les cellules indicatrices, il pourra être nécessaire de diluer ou de dialyser le tampon renfermant le virus ajouté ou d'en modifier le pH. Si le produit a lui-même une activité antivirale, il pourra être nécessaire d'exécuter une étude de clairance sans le produit dans un essai à blanc, quoique le fait d'omettre le produit ou de lui substituer une protéine semblable ne possédant pas d'activité antivirale puisse avoir un effet sur le comportement du virus à certaines étapes de la production. Il faut prévoir suffisamment de témoins pour indiquer l'effet des techniques utilisées uniquement pour préparer l'échantillon (p. ex. dialyse, stockage) sur l'élimination ou l'inactivation du virus ajouté.
- h) De nombreuses étapes de purification font appel de façon répétitive aux mêmes tampons ou colonnes. Il faut tenir compte des effets de cette approche dans l'analyse des données. L'efficacité d'une méthode d'élimination des virus peut varier selon l'étape de la fabrication à laquelle elle est utilisée.
- i) Le facteur de réduction global peut être sous-estimé lorsque les conditions de production ou les tampons sont trop cytotoxiques ou virucides; il faut en discuter dans chaque cas. Le facteur de réduction global peut également être surestimé à cause de limitations inhérentes ou d'une conception inadéquate des études de clairance virale.

## C. Interprétation des études de clairance virale

### *Acceptabilité*

Le but d'une évaluation de l'inactivation ou de l'élimination des virus est d'analyser et de caractériser les étapes du procédé qui peuvent être considérées comme efficaces dans l'inactivation ou l'élimination des virus et de déterminer quantitativement le niveau global de réduction des virus que le procédé de fabrication permet d'obtenir. Dans le cas des virus qui contaminent le produit, c'est-à-dire dans les cas B à E, il est important de montrer que les virus sont non seulement éliminés ou inactivés, mais que la méthode de purification a une capacité supérieure de clairance virale pour assurer au produit final un degré suffisant de sécurité d'emploi. La quantité de virus éliminée ou inactivée par le procédé de production doit être comparée à la quantité de virus qui peut être présente dans le vrac non traité.

Pour effectuer cette comparaison, il est important d'évaluer la quantité de virus dans le vrac non traité. Pour ce faire, on doit utiliser des épreuves d'infectivité ou d'autres méthodes comme la microscopie électronique à transmission (MET). Le procédé de purification dans son ensemble doit pouvoir éliminer beaucoup plus de virus que la quantité qu'on estime être présente dans l'équivalent d'une dose unique du vrac non traité. Voir l'annexe 4 pour le calcul des facteurs de réduction des virus et l'annexe 5 pour le calcul du nombre de particules par dose.

Les fabricants doivent reconnaître que les mécanismes de clairance peuvent différer d'une catégorie de virus à l'autre. Il faut tenir compte d'un ensemble de facteurs dans l'évaluation des données appuyant l'efficacité des méthodes d'inactivation ou d'élimination des virus soit:

- i) la pertinence du virus témoin utilisé;
- ii) la conception des études de clairance;
- iii) la réduction logarithmique obtenue;
- iv) le temps nécessaire à l'inactivation;
- v) les effets éventuels d'une variation des paramètres du procédé sur l'inactivation ou l'élimination des virus;
- vi) la limite de sensibilité de l'épreuve;
- vii) la sélectivité possible des méthodes d'inactivation ou d'élimination à l'égard de certaines catégories de virus.

On peut obtenir une clairance efficace en ayant recours à des étapes d'inactivation multiples, à des étapes de séparation multiples et complémentaires ou à un ensemble d'étapes d'inactivation et de séparation. Comme les méthodes de séparation peuvent dépendre des propriétés physico-chimiques très spécifiques d'un virus qui influencent son interaction avec les matrices de gel et ses propriétés de précipitation, les virus modèles et le virus cible peuvent être séparés de manière différente. Les paramètres de la fabrication influençant la séparation doivent être adéquatement définis et contrôlés. Des différences peuvent provenir de la modification des propriétés de surface, par exemple la



glycosylation. Toutefois, en dépit de ces variables éventuelles, on peut obtenir une élimination efficace grâce à un ensemble d'étapes de séparation complémentaires ou un ensemble d'étapes d'inactivation et de séparation. Par conséquent, des étapes de séparation bien conçues, telles des méthodes de chromatographie, des étapes de filtration et d'extraction, peuvent éliminer efficacement les virus à la condition qu'elles soient exécutées dans des conditions bien contrôlées. Une étape efficace d'élimination des virus devrait donner une réduction reproductible de la charge virale dans au moins deux études indépendantes.

On exprime généralement le facteur de réduction global sous forme de la somme des facteurs individuels. Toutefois, une réduction du titre du virus de l'ordre de  $1 \log_{10}$  ou moins serait considérée négligeable et, à moins d'être justifiée, serait ignorée.

Lorsque le procédé de production ne permet d'obtenir qu'une faible réduction de l'infectivité et que l'élimination des virus est considérée comme un facteur important de la sécurité d'emploi du produit, il faut introduire au moins une autre étape spécifique d'inactivation ou d'élimination. Les fabricants doivent justifier l'acceptabilité des facteurs de réduction obtenus pour tous les virus. Les résultats seront évalués en fonction des facteurs susmentionnés.

#### **D. Limites des études de clairance virale**

Les études de clairance virale sont utiles pour confirmer que le produit final présente un degré acceptable de sécurité d'emploi, mais elles n'établissent pas elles-même cette sécurité d'emploi. Toutefois, un certain nombre de facteurs dans la conception et l'exécution des études de clairance virale peuvent mener à une évaluation fautive de la capacité du procédé d'éliminer l'infectivité virale. Ces facteurs comprennent:

1. les préparations de virus utilisées dans les études de clairance virale d'un procédé de production seront probablement obtenues à partir d'une culture de tissu. Au cours d'une étape de production un virus provenant d'une culture de tissu peut se comporter différemment du virus à l'état natif, par exemple, lorsque la pureté ou le degré d'agrégation du virus natif et du virus cultivé diffèrent;
2. l'inactivation d'un virus se produit souvent suivant une courbe biphasique dans laquelle une phase initiale rapide est suivie par une phase plus lente. Il est possible qu'un virus qui a pu survivre à une première étape d'inactivation soit plus résistant

à des étapes ultérieures. Par exemple, si la fraction virale résistante prend la forme d'agrégats, le virus peut résister à toute une gamme de traitements chimiques différents ainsi qu'à la chaleur;

3. la capacité de l'ensemble du procédé d'éliminer l'infectivité est exprimée sous forme de la somme des logarithmes des facteurs de réduction obtenus à chaque étape. La somme des facteurs de réduction obtenus en plusieurs étapes, notamment lorsque les étapes ne donnent qu'une faible réduction (p.ex. inférieure à 1  $\log_{10}$ ), peut surestimer la capacité véritable d'élimination des virus. De plus, il ne faut pas inclure des valeurs de réduction obtenues par la répétition de méthodes identiques ou presque, à moins qu'on puisse le justifier;
4. l'expression des facteurs de réduction sous forme de réduction logarithmique du titre signifie que l'infectivité résiduelle pourra être grandement réduite, mais qu'elle ne sera jamais réduite à zéro. Par exemple, une réduction de l'infectivité d'une préparation renfermant 8  $\log_{10}$  d'unités infectieuses par mL d'un facteur de 8  $\log_{10}$  laisse une infectivité de zéro  $\log_{10}$  par mL ou une unité infectieuse par mL, compte tenu de la limite de détection de l'épreuve;
5. le procédé à l'échelle pilote peut différer du procédé à l'échelle industrielle, malgré le soin apporté à la conception d'un procédé à échelle réduite;
6. l'addition de facteurs de réduction provenant de mécanismes d'inactivation similaires dans le cadre du procédé de fabrication peut surestimer la clairance virale globale.

## **E. Analyse statistique**

Les études de clairance virale doivent être accompagnées d'une analyse statistique des données permettant d'évaluer les résultats. Les résultats des études doivent être valides sur le plan statistique pour appuyer les conclusions émises (*voir l'annexe 3*).

## **F. Réévaluation de la clairance virale**

Lorsque des changements importants sont apportés au procédé de production ou à la méthode de purification, il faut envisager que ces changements aient des effets directs et indirects sur la clairance virale et réévaluer le système au besoin. Par exemple, des

changements apportés au procédé de production peuvent modifier considérablement la quantité de virus produite par la lignée cellulaire; la modification des étapes du procédé peut modifier le degré de clairance virale.

## VII. RÉSUMÉ

Le présent document propose des approches pour l'évaluation du risque de contamination virale et pour l'élimination des virus d'un produit qui contribuent à la sécurité d'emploi des produits issus de la biotechnologie dérivés de lignées cellulaires animales ou humaines; le document souligne également la valeur de diverses stratégies :

- A. caractérisation ou analyse approfondie du substrat cellulaire de départ afin d'identifier tout virus présent à titre de contaminant;
- B. évaluation du risque par une détermination du tropisme humain des contaminants;
- C. établissement d'un programme approprié d'épreuves pour la détection de virus fortuits dans le vrac non traité;
- D. conception minutieuse d'études de clairance virale à l'aide de différentes méthodes d'inactivation ou d'élimination des virus dans le même procédé de production de manière à obtenir une clairance virale maximale;
- E. réalisation d'études évaluant l'inactivation et l'élimination des virus.

## VIII. GLOSSAIRE

### **Âge cellulaire *in vitro***

Temps écoulé depuis la décongélation d'une ou de plusieurs ampoules de la banque de cellules primaire jusqu'à la récolte du produit dans le contenant de production : il peut correspondre à la durée de culture, au nombre de doublements de la population cellulaire ou au nombre de passages suivant une procédure définie pour diluer la culture.

### **Banque de cellules primaire (BCP)**

Portion d'un pool de cellules, lequel a généralement été préparé dans des conditions définies, à partir du clone cellulaire sélectionné; le pool est divisé en plusieurs portions, réparties en autant de contenants qui sont conservés dans des conditions définies. Toutes les banques de cellules de travail sont obtenues à partir de la banque de cellules primaire. Les nouvelles banques de cellules

primaires (issues d'un clone cellulaire, d'une banque de cellules primaire ou d'une banque de cellules de travail obtenus préalablement) doivent subir les analyses prévues pour les banques de cellules primaires, à moins qu'on puisse justifier une autre approche.

### **Banque de cellules de travail (BCT)**

La banque de cellules de travail se prépare avec des portions d'une suspension cellulaire homogène obtenues par culture de la banque de cellules primaire dans des conditions définies.

### **Caractérisation de la clairance virale du procédé**

Études de la clairance virale dans lesquelles des virus modèles non spécifiques sont utilisés pour évaluer la capacité du procédé de fabrication d'éliminer ou d'inactiver des virus.

### **Cellules de production**

Substrat cellulaire utilisé pour fabriquer le produit.

### **Clairance virale**

Élimination du virus cible par l'élimination des virions ou l'inactivation de l'infectivité du virus.

### **Évaluation de la clairance virale du procédé**

Études de la clairance virale dans lesquelles des virus pertinents ou des virus modèles spécifiques sont utilisés pour déterminer la capacité du procédé de fabrication d'éliminer ou d'inactiver ces virus.

### **Inactivation**

Réduction de l'infectivité d'un virus par une modification chimique ou physique.

### **Substrat cellulaire**

Cellules utilisées pour fabriquer le produit.

### **Temps d'exposition minimal**

Période la plus courte pendant laquelle une étape de traitement est maintenue.

### **Particule apparentée à des virus**

Structure visible au microscope électronique morphologiquement apparentée à des virus connus.

### **Virus**

Agent infectieux, potentiellement pathogène, ne possédant qu'un type d'acide nucléique (ARN ou ADN), incapable de croître seul et de se diviser par fission binaire et se multipliant à partir de son matériel génétique dans une cellule hôte.

### **Virus fortuit**

Virus contaminant introduit accidentellement.

### **Virus endogène**

Entité virale dont le génome fait partie de la lignée germinale de l'espèce d'origine de la lignée cellulaire et qui est intégrée de manière covalente au génome de l'animal d'où provient la lignée cellulaire. Aux fins du présent document, les virus non intégrés et introduits intentionnellement, tel l' "EBV" ("Epstein-Barr virus") utilisé pour immortaliser des substrats cellulaires ou le virus de la papillomatose bovine, font partie de cette catégorie.

### **Virus modèle non spécifique**

Virus utilisé pour caractériser la clairance virale du procédé lorsque le but visé est de caractériser la capacité du procédé de fabrication d'éliminer ou d'inactiver les virus en général, c.-à-d. de caractériser la robustesse du procédé de purification.

### **Virus modèle spécifique**

Virus étroitement apparenté au virus connu ou soupçonné (même genre ou famille), dont les propriétés physiques et chimiques sont semblables à celles du virus observé ou soupçonné.

### **Virus non endogène**

Virus présent dans la banque de cellules primaire, mais provenant de sources extérieures.

### **Virus pertinent**

Virus utilisé dans les études de la clairance virale du procédé. Il s'agit soit du virus identifié ou d'un virus de la même espèce que l'on croit capable, ou est susceptible de contaminer le substrat cellulaire ou tout autre réactif ou matière utilisés dans le procédé de production.

### **Vrac non traité**

Une ou plusieurs récoltes réunies de cellules et de milieux de culture. Lorsque les cellules ne sont pas facilement accessibles, le vrac non traité est constitué du liquide recueilli dans le fermenteur.

**Tableau 1 Épreuves virologiques à effectuer une seule fois selon le type de banque de cellules**

	<i>BCP</i>	<i>BCT<sup>a</sup></i>	Cellules à la limite <sup>b</sup>
<b>Épreuves de détection des rétrovirus et d'autres virus endogènes</b>			
Infectivité	+	-	+
Microscopie électronique <sup>c</sup>	+ <sup>c</sup>	-	+ <sup>c</sup>
Transcriptase inverse <sup>d</sup>	+ <sup>d</sup>	-	+ <sup>d</sup>
Autres épreuves spécifiques de détection de virus <sup>e</sup>	le cas échéant <sup>e</sup>	-	le cas échéant <sup>e</sup>
<b>Épreuves de détection des virus non endogènes ou fortuits</b>			
Épreuves <i>in vitro</i>	+	- <sup>f</sup>	+
Épreuves <i>in vivo</i>	+	- <sup>f</sup>	+
Épreuves de production d'anticorps <sup>g</sup>	+ <sup>g</sup>	-	-
Autres épreuves spécifiques de détection de virus <sup>h</sup>	+ <sup>h</sup>	-	-

a. Voir la section III.A.2.

b. Cellules à la limite : cellules à la limite de l'âge cellulaire *in vitro* utilisé pour la production (voir la section III.A.3).

c. Peut également détecter d'autres agents.

d. Pas nécessaire si l'épreuve d'infectivité rétrovirale donne un résultat positif.

e. Pour les lignées cellulaires dont on sait qu'elles ont été infectées par ces agents.

f. Pour la première BCT, cette épreuve doit être exécutée sur des cellules à la limite de l'âge cellulaire *in vitro* obtenues à partir de cette BCT; pour les autres BCT, on peut n'effectuer qu'une seule épreuve *in vitro* et *in vivo*, soit directement sur la BCT soit sur les cellules à la limite de l'âge cellulaire *in vitro*.

g. P. ex. "MAP, RAP, HAP", — utilisées habituellement dans le cas de lignées cellulaires de rongeur.

h. P. ex. pour les lignées cellulaires d'origine humaine, d'autre primate ou d'autres lignées cellulaires, le cas échéant.

**Tableau 2 Exemples d'épreuves virologiques pouvant être utilisées et limites de ces épreuves**

ÉPREUVE	PRODUIT D'ESSAI	CAPACITÉ DE DÉTECTION	LIMITE DE DÉTECTION
Production d'anticorps	Lysat de cellules et leur milieu de culture	Antigènes viraux spécifiques	Antigènes non infectieux dans les systèmes d'épreuve animaux
Dépistage des virus <i>in vivo</i>	Lysat de cellules et leur milieu de culture	Large gamme de virus pathogènes pour les humains	Agent incapables de se répliquer ou de provoquer la maladie dans le système d'épreuve
Dépistage des virus <i>in vitro</i> :		Large gamme de virus pathogènes pour les humains	Agent incapables de se répliquer ou de provoquer la maladie dans le système d'épreuve
1. Caractérisation d'un témoin cellulaire	1. Lysat de cellules et leur milieu de culture (pour la culture, des cellules intactes doivent faire partie du produit d'essai)		
2. Dépistage dans le procédé de production	2. Produit récolté du vrac non traité ou lysat de cellules et leur milieu de culture provenant du réacteur de production		
MET sur :		Virus et particules apparentées à des virus	Épreuve qualitative avec identification
1. Substrat cellulaire	1. Cellules viables		
2. Surnageant de culture de tissu	2. Surnageant de culture acellulaire		
Transcriptase inverse (TI)	Surnageant de culture acellulaire	Rétrovirus et expression de la TI virale	Ne détecte que les enzymes dont l'activité est optimale dans des conditions optimales. L'interprétation peut être difficile à cause de la présence d'enzymes cellulaires; bruit de fond avec certains échantillons concentrés
Infectivité par des rétrovirus (RV)	Surnageant de culture acellulaire	Rétrovirus infectieux	RV incapables de se répliquer ou de former des plages isolées dans le système d'épreuve choisi
Coculture	Cellules viables	Rétrovirus infectieux	RV incapables de se répliquer
1. Infectivité			1. Voir infectivité par RV ci-dessus
2. Titre de la MET			2. Voir MET ci-dessus <sup>a</sup>
3. Titre de la TI			3. Voir TI ci-dessus
PCR (amplification en chaîne par la polymérase)	Cellules, liquide de culture et autres matières	Séquences virales spécifiques	Des séquences amorces doivent être présentes. N'indique pas si le virus est infectieux

a En outre, difficulté de distinguer le produit d'essai des cellules indicatrices.

**Tableau 3 Détection de virus dans des épreuves de production d'anticorps**

«MAP»	«HAP»	«RAP»
Virus de l'ectromélie <sup>2,3</sup>	Virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCM) <sup>1,3</sup>	Virus Hantaan <sup>1,3</sup>
Virus Hantaan <sup>1,3</sup>	Virus de la pneumonie murine (PVM) <sup>2,3</sup>	Virus KRV <sup>2,3</sup>
Virus K <sup>2</sup>	Réovirus de type 3 (Réo3) <sup>1,3</sup>	Virus de l'encéphalomyélite murine (Theilers, GDVII) <sup>2</sup>
Virus à lactico-déshydrogénase (LDM) <sup>1,3</sup>	Virus Sendai <sup>1,3</sup>	Virus de la pneumonie murine (PVM) <sup>2,3</sup>
Virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCM) <sup>1,3</sup>	SV5	Coronavirus du rat (RCV) <sup>2</sup>
Virus MVM <sup>2,3</sup>		Réovirus de type 3 (Réo3) <sup>1,3</sup>
Adénovirus murin (MAV) <sup>2,3</sup>		Virus Sendai <sup>1,3</sup>
Cytomégalovirus murin (MCMV) <sup>2,3</sup>		Virus SDAV <sup>2</sup>
Virus de l'encéphalomyélite murine (Theilers, GDVII) <sup>2</sup>		Virus Toolan (HI) <sup>2,3</sup>
Virus de l'hépatite murine (MHV) <sup>2</sup>		
Rotavirus murin (EDIM) <sup>2,3</sup>		
Virus PVM <sup>2,3</sup>		
Virus du polyome <sup>2</sup>		
Réovirus de type 3 (Réo3) <sup>1,3</sup>		
Virus Sendai <sup>1,3</sup>		
Virus thymique <sup>2</sup>		

1. Virus pour lesquels on possède des données indiquant qu'ils peuvent infecter les humains ou d'autres primates.
2. Virus pour lesquels on ne possède pas de données indiquant qu'ils peuvent infecter les humains.
3. Virus capable de se répliquer *in vitro* dans des cellules provenant d'humains ou d'autres primates.



**Tableau 4 Plan d'action relatif à l'évaluation et à la caractérisation de la clairance virale du procédé et aux épreuves virologiques sur le vrac purifié**

	<i>Cas A</i>	<i>Cas B</i>	<i>Cas C</i> <sup>2</sup>	<i>Cas D</i> <sup>2</sup>	<i>Cas E</i> <sup>2</sup>
<b>STATUT</b>					
Présence de virus <sup>1</sup>	-	-	+	+	(+) <sup>3</sup>
Particules apparentés à des virus <sup>1</sup>	-	-	-	-	(+) <sup>3</sup>
Particules apparentés à des rétrovirus <sup>1</sup>	-	+	-	-	(+) <sup>3</sup>
Virus identifiés	sans objet	+	+	+	-
Virus pathogènes pour les humains	sans objet	-4	-4	+	inconnus
<b>ACTION</b>					
Caractérisation de la clairance virale du procédé à l'aide de virus modèles non spécifiques	oui <sup>5</sup>	oui <sup>5</sup>	oui <sup>5</sup>	oui <sup>5</sup>	oui <sup>7</sup>
Évaluation de la clairance virale du procédé à l'aide de virus pertinents ou de virus modèles spécifiques	non	oui <sup>6</sup>	oui <sup>6</sup>	oui <sup>6</sup>	oui <sup>7</sup>
Épreuve virologique sur le vrac purifié	sans objet	oui <sup>8</sup>	oui <sup>8</sup>	oui <sup>8</sup>	oui <sup>8</sup>

- Résultats des épreuves virologiques sur le substrat cellulaire et/ou au niveau du vrac non traité. Les cultures cellulaires utilisées pour la production qui sont contaminées par des virus seront en général inacceptables. Les virus endogènes (tels les rétrovirus) ou les virus qui font partie intégrante de la BCP pourront être acceptables si des méthodes adéquates d'évaluation de la clairance virale sont appliquées.
- L'utilisation de matières premières contaminées par des virus, que ces virus soient réputés infectieux et/ou pathogènes ou non, ne sera admise que dans des cas exceptionnels.
- Virus observés par des méthodes directes ou indirectes.
- Jugés non pathogènes.
- Il faut effectuer une caractérisation de la clairance virale du procédé à l'aide de virus modèles non spécifiques.
- Il faut effectuer une évaluation de la clairance virale du procédé à l'aide de virus pertinents ou de virus modèles spécifiques.
- Voir le texte sous le cas E.
- Il faut confirmer l'absence de virus détectable dans le cas du vrac purifié à l'aide de méthodes très spécifiques et très sensibles pour la détection du virus en question. Aux fins de l'autorisation de commercialisation, il faut fournir des données provenant d'au moins 3 lots de vrac purifié obtenu à l'échelle pilote ou industrielle. Toutefois, dans le cas de lignées cellulaires comme les cellules CHO dont les particules endogènes ont été amplement caractérisées et pour lesquelles une clairance adéquate a été démontrée, il n'est habituellement pas nécessaire de vérifier la présence de particules non infectieuses dans le vrac purifié.

## **ANNEXE 1            Produits dérivés de banques de cellules caractérisées et cultivées subséquentement *in vivo***

Dans le cas des produits fabriqués à partir de liquides récoltés d'animaux inoculés avec des cellules provenant de banques caractérisées, il faut fournir des renseignements additionnels concernant les animaux.

Dans la mesure du possible, les animaux utilisés dans la fabrication de produits biotechnologiques ou biologiques doivent être obtenus de colonies bien définies exemptes d'organismes pathogènes spécifiques. Il faut effectuer les épreuves virologiques appropriées, telles celles indiquées au *tableau 3*. Les procédures de quarantaine utilisées pour les animaux nouvellement arrivés et pour les animaux malades doivent être décrites et l'assurance donnée que toutes les méthodes pour circonscrire, nettoyer, et décontaminer, utilisées dans le laboratoire sont suffisantes pour empêcher la propagation d'agents fortuits. Pour ce faire, on peut recourir à un programme sentinelle. Il faut également inclure une liste des agents qui font l'objet d'épreuves de dépistage. Les services vétérinaires doivent être disponibles sur place ou faciles à obtenir. Il faut indiquer dans quelle mesure le vivarium est isolé d'autres secteurs de l'établissement de production. Le personnel de soutien doit être formé adéquatement afin d'assurer la sécurité d'emploi du produit.

Le système de soutien pour les animaux doit être complètement décrit. Ceux-ci comprennent le régime alimentaire, les horaires de nettoyage et d'alimentation, les dispositions relatives à des soins vétérinaires périodiques au besoin et les détails quant à la gestion des animaux après l'inoculation.

Le premier matériel récolté des animaux peut être considéré comme l'équivalent du vrac non traité provenant d'un bioréacteur. Par conséquent, toutes les considérations ayant trait aux épreuves indiquées à la section IV du présent document s'appliquent. En outre, le fabricant doit déterminer le degré de contamination du vrac non traité, déterminer si le matériel est exempt de mycoplasmes et exécuter des épreuves spécifiques à l'espèce ainsi que des épreuves *in vivo* chez des souris adultes et des souriceaux non sevrés.

## ANNEXE 2      Choix des virus pour les études de clairance virale

### A.      Exemples de virus « modèles » utiles

1.      Virus modèles non spécifiques présentant une gamme de structures physico-chimiques :
  - SV40 (*Polyomavirus maccacae* 1), virus de la poliomyélite humaine 1 (Sabin), parvovirus humain ou d'autres petits virus dépourvus d'enveloppe;
  - un virus parainfluenza ou un virus influenza, le virus Sindbis ou d'autres virus à ARN, de taille moyenne à grande, à enveloppe;
  - un virus herpès (p. ex. HSV-1 ou un virus de la pseudorange), ou d'autres virus à ADN de taille moyenne à grande.

Ces virus ne constituent que des exemples; leur utilisation n'est pas obligatoire.

2.      Dans le cas des substrats cellulaires de rongeurs, on utilise couramment des rétrovirus murins comme virus modèles spécifiques.

### B.      Exemples de virus qui ont été utilisés dans des études de clairance virale

Le *tableau A-1* énumère plusieurs virus qui ont été utilisés dans des études de clairance virale. Toutefois, il ne s'agit que d'exemples; il n'est pas obligatoire d'utiliser les virus figurant dans ce tableau, et on invite les fabricants à envisager d'autres virus, notamment ceux qui pourraient être plus appropriés pour leur propre procédé de fabrication. En général, il faut évaluer la capacité du procédé d'éliminer au moins trois virus différents possédant des caractéristiques différentes.

**Tableau A-1 Exemples de virus qui ont été utilisés dans des études de clairance virale**

Virus	Famille	Genre	Hôte naturel	Génome	Envel.	Taille (nm)	Forme	Résistance*
Virus de la stomatite vésiculeuse	Rhabdo	Vésiculovirus	Chevaux Bovins	ARN	oui	70x150	Oblongue	Faible
Virus parainfluenza	Paramyxo	Paramyxovirus	Divers	ARN	oui	100-200+	polym./sphér.	Faible
MuLV	Rétro	Oncovirus de type C	Souris	ARN	oui	80-110	Sphérique	Faible
Virus Sindbis	Toga	Alphavirus	Humains	ARN	oui	60-70	Sphérique	Faible
BVDV	Flavi	Pestivirus	Bovins	ARN	oui	50-70	Polym./sphér.	Faible
Virus de la pseudorange	Herpès		Porcs	ADN	oui	120-200	Sphérique	Moyenne
Poliovirus Sabin type 1	Picorna	Entérovirus	Humains	ARN	non	25-30	Icosaédrique	Moyenne
Virus de l'encéphalo-myocardite (EMC)	Picorna	Cardiovirus	Souris	ARN	non	25-30	Icosaédrique	Moyenne
Réovirus	Réo	Orthoréovirus	Divers	ARN	non	60-80	Sphérique	Moyenne
SV40	Papova	Polyomavirus	Singes	ADN	non	40-50	Icosaédrique	Très élevée
Parvovirus (canin, porcin)	Parvo	Parvovirus	Chiens Porcs	ADN	non	18-24	Icosaédrique	Très élevée

\* Résistance à des traitements physico-chimiques basée sur des études de procédé de production. La résistance est relative à un traitement particulier, et elle est utilisée dans le contexte de la connaissance de la biologie du virus et de la nature du procédé de fabrication. Les résultats réels varieront en fonction du traitement.

Ces virus ne sont donnés qu'en exemple; leur utilisation n'est pas obligatoire.

### **ANNEXE 3            Considérations statistiques liées aux épreuves virologiques**

Le titrage des virus présente des problèmes de variation communs à toutes les épreuves biologiques. Il faut effectuer une évaluation de la précision des titrages de virus et des facteurs de réduction qui en sont dérivés et déterminer la validité des épreuves de manière à définir la fiabilité de l'étude. L'objectif de l'évaluation statistique est d'établir que l'étude a été effectuée à un niveau acceptable de compétence virologique.

1. Les méthodes peuvent être binaires ou quantitatives. Les méthodes binaires comprennent les épreuves d'infectivité chez des animaux ou la détermination de la dose infectieuse en culture tissulaire (DICT), dans lesquelles on indique si les animaux ou les cultures sont infectés ou non. On établit alors le degré d'infectivité en fonction de la proportion des animaux ou des cultures infectés. Dans les méthodes quantitatives, l'infectivité mesurée varie continuellement avec la quantité de virus. Les méthodes quantitatives comprennent les épreuves de comptage des plages où chaque plage correspond à une unité infectieuse. Les épreuves binaires et quantitatives peuvent toutes deux faire l'objet d'une évaluation statistique.
2. Les variations d'une épreuve peuvent provenir d'erreurs de dilution, d'effets et de différences statistiques qui peuvent être inconnus ou difficiles à contrôler. Ces effets sont susceptibles d'être plus importants lorsqu'on compare les résultats de différentes séries d'une épreuve (variation entre plusieurs répétitions d'une même épreuve) que lorsqu'on compare les résultats d'une seule épreuve (variation à l'intérieur d'une épreuve).
3. L'intervalle de confiance à 95 % pour les résultats de la variation à l'intérieur d'une épreuve devrait être de l'ordre de  $\pm 0,5 \log_{10}$  de la moyenne. On peut déterminer la variation à l'intérieure d'une épreuve par des méthodes statistiques courantes. On peut mesurer la variation entre plusieurs répétitions d'une même épreuve en incluant une préparation de référence, dont l'estimation de l'activité, pour être acceptable, devrait être précise à environ  $\pm 0,5 \log_{10}$  de la moyenne établie dans le laboratoire. Les épreuves moins précises peuvent être acceptables à la condition d'être justifiées.
4. L'intervalle de confiance à 95 % pour le facteur de réduction observé devrait être calculé dans la mesure du possible dans des études de clairance de virus pertinents et de virus modèles spécifiques. Si l'intervalle de confiance à 95 % pour les épreuves virologiques sur le matériel de départ est de +s et que celle pour les épreuves virologiques du matériel après l'étape est de +a, l'intervalle de confiance à 95 % pour le facteur de réduction est égale à :  
$$\pm \sqrt{S^2 + a^2}.$$

**Probabilité de détection des virus présents à de faibles concentrations**

À de faibles concentrations de virus (p. ex dans la fourchette de 10 à 1 000 particules infectieuses par litre), il est évident qu'un échantillon de quelques millilitres peut ou non renfermer des particules infectieuses. La probabilité,  $p$ , que cet échantillon ne renferme pas de virus infectieux est de :

$$P = ((V-v)/V)^n$$

où  $V$  (litres) est le volume total de la matière à tester,  $v$  (litres) est le volume de l'échantillon et  $n$  est le nombre absolu de particules infectieuses distribuées statistiquement dans  $V$ .

Lorsque  $V \gg v$ , l'équation répond à la distribution de Poisson :

$$p = e^{-cv}$$

où  $c$  est la concentration des particules infectieuses par litre.

ou,  $c = \ln p / -v$ .

À titre d'exemple, lorsque l'épreuve porte sur un volume d'échantillon de 1 mL, la probabilité  $p$  à des concentrations de virus comprises entre 10 et 1 000 particules infectieuses par litre est :

$c$	10	100	1000
$p$	0,99	0,90	0,37

Cela indique que pour une concentration de 1 000 virus par litre, un volume de 1 mL ne renfermera pas de virion dans 37 % de l'échantillonnage.

Lorsqu'une partie seulement d'un échantillon est soumise à une épreuve virologique et que l'épreuve donne un résultat négatif, il faut calculer la quantité de virus qui devrait être présente dans l'échantillon total pour donner un résultat positif et tenir compte de cette valeur dans le calcul d'un facteur de réduction. Des intervalles de confiance à 95 % sont souhaitables. Toutefois, dans certains cas, cela peut s'avérer peu pratique à cause des facteurs limitatifs propres à la matière.

#### **ANNEXE 4 Calcul des facteurs de réduction dans les études de clairance virale**

On définit le facteur de réduction des virus d'une étape de purification ou d'inactivation comme le  $\log_{10}$  du rapport de la charge virale d'une matière avant la purification à la charge virale de la matière après la purification, alors que cette matière est prête à être utilisée dans l'étape suivante du procédé. En utilisant les abréviations suivantes :

Matériel de départ :

vol v'; titre  $10^{a'}$ ;

charge virale :  $(v')(10^{a'})$ ,

Matériel final :

vol v"; titre  $10^{a''}$ ;

charge virale :  $(v'')(10^{a''})$ ,

Les facteurs de réduction individuels  $R_i$  sont calculés à partir de l'équation suivante :

$$10^{R_i} = (v')(10^{a'}) / (v'')(10^{a''})$$

Cette formule tient compte à la fois du titre et du volume de la matière avant et après l'étape de purification.

Étant donné l'imprécision inhérente à certaines épreuves de titrage de virus, les facteurs de réduction individuels utilisés pour le calcul d'un facteur de réduction global doivent être supérieurs à 1.

Le facteur de réduction global d'un procédé de production complet est la somme du logarithme des facteurs de réduction des étapes individuelles. Il représente le logarithme du rapport de la charge virale au début de la première étape de clairance du procédé à la charge virale à la fin de la dernière étape de clairance du procédé. Les facteurs de réduction sont normalement exprimés sur une échelle logarithmique, ce qui signifie que l'infektivité ne sera jamais réduite à zéro, mais qu'elle pourra être grandement réduite mathématiquement.

## ANNEXE 5 Calcul du nombre de particules par dose

Ce calcul s'applique aux virus pour lesquels on peut faire une évaluation du nombre au départ, tels les rétrovirus endogènes.

Exemple :

### I. Hypothèses

Concentration mesurée ou estimée de virus dans le matériel de récolte de culture de cellules =  $10^6$ /mL

Facteur de clairance virale calculé =  $>10^{15}$

Volume de la récolte de culture nécessaire pour obtenir une dose de produit = 1 litre ( $10^3$  mL)

### II. Évaluation du nombre de particules/dose

$\frac{(10^6 \text{ unités virales/mL}) \times (10^3 \text{ mL/dose})}{\text{facteur de clairance } >10^{15}}$

=  $\frac{10^9 \text{ particules/dose}}{\text{facteur de clairance } > 10^{15}}$

=  $<10^{-6}$  particules/dose

Par conséquent, on peut s'attendre à moins d'une particule par million de doses.