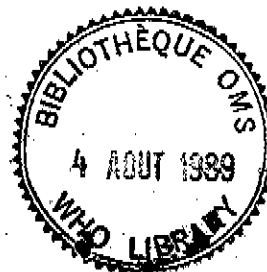




DIRECTIVES RELATIVES A L'ASSURANCE DE LA QUALITE  
DES PREPARATIONS PHARMACEUTIQUES OBTENUES PAR GENIE GENETIQUE

1. Introduction
2. Considérations générales
3. Champ d'application de ces directives
4. Normes
  - 4.1 Contrôle des matières premières
    - 4.1.1 Vecteur d'expression et cellule hôte
    - 4.1.2 Séquence du gène cloné
    - 4.1.3 Expression
  - 4.2 Contrôle de la production
    - 4.2.1 Cellules de semence et banque de cellules de travail du fabricant
    - 4.2.2 Production à un nombre de passages défini
    - 4.2.3 Production en culture continue
    - 4.2.4 Purification
  - 4.3 Contrôle du produit final
    - 4.3.1 Caractérisation du produit purifié
    - 4.3.2 Pureté
  - 4.4 Contrôle de routine des lots
    - 4.4.1 Uniformité
    - 4.4.2 Identité
    - 4.4.3 Activité
5. Substances de référence
6. Evaluation préclinique de l'innocuité



This document is not issued to the general public, and all rights are reserved by the World Health Organization (WHO). The document may not be reviewed, abstracted, quoted, reproduced or translated, in part or in whole, without the prior written permission of WHO. No part of this document may be stored in a retrieval system or transmitted in any form or by any means - electronic, mechanical or other - without the prior written permission of WHO.

The views expressed in documents by named authors are solely the responsibility of those authors.

Ce document n'est pas destiné à être distribué au grand public et tous les droits y afférents sont réservés par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS). Il ne peut être commenté, résumé, cité, reproduit ou traduit, partiellement ou en totalité, sans une autorisation préalable écrite de l'OMS. Aucune partie ne doit être chargée dans un système de recherche documentaire ou diffusée sous quelque forme ou par quelque moyen que ce soit - électronique, mécanique, ou autre - sans une autorisation préalable écrite de l'OMS.

Les opinions exprimées dans les documents par des auteurs cités nommément n'engagent que lesdits auteurs.

## 1. Introduction

Les présentes directives traitent de l'assurance de la qualité des produits pharmaceutiques obtenus par génie génétique (ADNr) et destinés à l'homme. Ce document a pour objet d'indiquer :

- a) quelles sont les méthodes appropriées de fabrication et de contrôle de ces produits et
- b) quelles sont les données propres à ces produits et qui doivent être soumises aux autorités nationales compétentes, à l'appui des déclarations d'expertise clinique et des demandes d'autorisation de mise sur le marché.

Il est de fait que les techniques de génie génétique appartiennent à un domaine en évolution constante et il importe d'adopter une attitude souple vis-à-vis des questions de contrôle de ces produits, de façon à pouvoir modifier les normes compte tenu de l'expérience acquise au fur et à mesure de leur production et de leur utilisation, et de la mise au point de nouvelles techniques. Les présentes directives remplacent donc celles publiées initialement en 1983 (dont on trouvera la version française dans le Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, 62 (2): 183-199 (1984) et ont pour objectif de fournir une base actualisée, solide et scientifiquement étayée pour la mise au point de médicaments au moyen des nouvelles biotechnologies, tout en assurant une protection correcte des malades. Ce document ne s'applique pas au contrôle des micro-organismes vivants génétiquement modifiés destinés à être directement employés chez l'homme, tels que les vaccins vivants.

## 2. Considérations générales

Les progrès réalisés en génétique moléculaire et en chimie des acides nucléiques permettent désormais d'identifier les gènes codant pour des protéines naturelles biologiquement actives, de les analyser très en détail, de les transférer d'un organisme à un autre et de les exprimer dans des conditions contrôlées assurant la synthèse efficace des polypeptides codés. On peut également fabriquer des gènes codant pour des produits modifiés, possédant une plus forte activité biologique et/ou des caractéristiques indésirables atténuées, et des gènes codant pour des substances entièrement nouvelles.

Il est possible de reproduire un gène qui existe à l'état naturel, ou une séquence de nucléotides obtenue par synthèse, codant pour un produit spécifique, en l'insérant dans un vecteur approprié au moyen d'endonucléases de restriction hautement spécifiques (qui coupent l'ADN du vecteur en des sites prédéterminés) et de ligases (qui soudent le gène inséré au vecteur). On peut ensuite introduire ce vecteur dans un micro-organisme ou une cellule hôte et sélectionner des clones portant le gène désiré, clones que l'on cultivera en masse de manière à obtenir une expression active du produit génique désiré.

Un gène se caractérise par une séquence spécifique de nucléotides sur l'un des brins de la double hélice de la molécule d'ADN. Lorsque l'on sépare ces deux brins, chacun d'entre eux sert de matrice pour la synthèse d'une copie complémentaire, ce qui constitue un mécanisme de reproduction fidèle des gènes avec conservation de la séquence linéaire des quatre nucléotides. Le décodage de cette information et la synthèse du produit génique se font en deux étapes : il y a d'abord transcription du brin d'ADN en ARN messager (ARNm), puis traduction de l'information portée par la molécule d'ARNm en une séquence d'acides aminés. Les facteurs qui interviennent dans l'expression de gènes étrangers introduits dans un hôte sont complexes et des travaux de recherche importants sont actuellement consacrés à l'expression active, contrôlée et fidèle de séquences d'ADN clonées stables.

Bon nombre de vecteurs utilisés à l'heure actuelle sont des plasmides bactériens et le clonage des gènes a été en grande partie effectué chez des procaryotes. Toutefois, d'autres systèmes vecteur-cellule hôte, mettant en jeu des eucaryotes, notamment des levures ou des lignées cellulaires continues (transformées), mammaliennes ou provenant d'insectes, ont été

mis au point et sont déjà employés dans certains cas pour la production. D'après certains auteurs, l'emploi de cellules animales comme hôtes présente des avantages particuliers par rapport aux systèmes bactériens. Par exemple, ces cellules peuvent déjà effectuer un grand nombre des modifications qui ont normalement lieu au niveau du squelette des protéines mammaliennes, par exemple l'adjonction de groupes glucidiques, et l'on pense que les cellules mammaliennes sont plus susceptibles que les bactéries de produire des protéines "humaines" dont la structure et la conformation dans l'espace seront fidèlement reproduites.

Certains facteurs peuvent compromettre l'innocuité et l'efficacité des produits obtenus par génie génétique et il convient de leur porter une attention particulière :

i) Les produits de gènes qui existent à l'état naturel et que l'on exprime chez des hôtes étrangers peuvent s'écarter, par leur structure et leurs propriétés biologiques ou immunologiques, des modèles naturels. Ces différences peuvent trouver leur origine soit au niveau génétique ou post-translationnel, soit au cours de la production ou de la purification.

ii) Les produits obtenus par génie génétique peuvent contenir des contaminants potentiellement dangereux, normalement absents dans leurs équivalents préparés par des méthodes classiques, et que le procédé de purification doit être capable d'éliminer. La contamination par de l'acide nucléique provenant des cellules mammaliennes transformées est particulièrement préoccupante en raison de la présence possible d'un ADN potentiellement oncogène. Le choix de la méthode de fabrication influera bien évidemment sur la nature et la diversité des contaminants possibles.

iii) Le passage de la mise au point au laboratoire à la production industrielle nécessite souvent d'importantes adaptations qui peuvent avoir des conséquences considérables sur la qualité de la substance et donc des répercussions au niveau des épreuves de contrôle. Une variabilité imprévue de la culture en cours de production peut être à l'origine de modifications qui favoriseront l'expression d'autres gènes du système hôte/vecteur, ou qui altéreront le polypeptide recherché. De telles variations peuvent se traduire par une diminution du rendement du système et/ou par des différences quantitatives et qualitatives au niveau des impuretés présentes dans le produit. Les mêmes considérations s'appliquent à la production en culture continue. En conséquence, il est impératif de disposer de méthodes permettant d'assurer l'uniformité des conditions de production et du produit final.

### 3. Champ d'application de ces directives

Les directives qui suivent sont classées en trois rubriques principales :

i) Contrôle des matières premières; données de référence sur la cellule hôte et sur l'origine, la nature et la séquence du gène employé pour la production.

ii) Contrôle du procédé de fabrication.

iii) Contrôle du produit final.

A cet égard, on estime que les substances obtenues par génie génétique sont semblables aux autres "produits biologiques" obtenus par les méthodes traditionnelles, comme les vaccins bactériens et viraux, pour lesquels un bon contrôle s'effectue à la fois au niveau du procédé de fabrication et au niveau du produit. Ainsi, pour assurer l'innocuité et l'efficacité du produit, les présentes directives mettent particulièrement l'accent sur les contrôles "en cours de fabrication", ainsi que sur la caractérisation complète du produit final. On estime également qu'il est indispensable de vérifier certains points du procédé de fabrication, tels que l'aptitude des méthodes de purification à éliminer tout matériel indésirable, par exemple de l'ADN.

Les normes relatives aux établissements producteurs (par exemple, Révision des Normes N° 1 pour les Substances biologiques : OMS, Série de Rapports techniques, N° 323), s'appliqueront aux produits obtenus par génie génétique, de même que les normes générales relatives au contrôle de la qualité des substances biologiques. Ainsi, il faudra surveiller de près la qualité de tous les réactifs utilisés pour la production, y compris les constituants des milieux de fermentation. Il faut éviter d'employer pour la production tout agent connu pour provoquer des réactions d'hypersensibilité chez certaines personnes, tel que la pénicilline ou d'autres bêta-lactamines. Bon nombre des normes générales relatives au contrôle de la qualité des substances biologiques, comme celles qui ont trait aux épreuves d'activité, de toxicité anormale, de pyrogénicité et de stérilité, s'appliqueront également aux produits obtenus par génie génétique.

Alors que les normes qui suivent doivent être considérées comme d'application générale, certains produits peuvent présenter des problèmes particuliers de contrôle de la qualité. Il faut donc effectuer une analyse soignée du mode de fabrication et du contrôle de la qualité pour chaque produit, en tenant bien compte de toutes ses particularités. En outre, la définition de normes relatives à un produit donné doit tenir compte de l'usage clinique auquel il est destiné. Ainsi, une préparation qu'il faudra administrer de façon répétée, ou à fortes doses, devra être soigneusement analysée à la recherche de traces de contaminants antigéniques. En revanche, une substance qui sera utilisée une seule fois pour une affection engageant le pronostic vital pourra nécessiter à juste titre des critères différents.

#### 4. Normes

##### 4.1 Contrôle des matières premières

###### 4.1.1 Vecteur d'expression et cellule hôte

Il conviendra de décrire la cellule hôte et le vecteur d'expression utilisés pour la production. Cette description devra comprendre des détails sur l'origine et l'identification du gène cloné, ainsi que sur la construction, la génétique et la structure du vecteur d'expression. Il faudra expliquer l'origine et la fonction de ses divers éléments : origines de répllication, promoteurs ou marqueurs de la résistance aux antibiotiques, et fournir une carte de restriction indiquant au moins les sites utilisés pour sa construction.

Il faudra également fournir des détails sur la méthode employée pour introduire le vecteur dans la cellule hôte, la forme sous laquelle il s'y trouve - intégrée ou extrachromosomique - et le nombre de copies du gène. On établira la stabilité génétique de l'association hôte/vecteur.

###### 4.1.2 Séquence du gène cloné

Il conviendra de donner la séquence nucléotidique du gène inséré et des régions de contrôle adjacentes dans le vecteur d'expression. Toutes les séquences exprimées présentant un intérêt devront être clairement décrites.

###### 4.1.3 Expression

On décrira en détail les mesures employées pour déclencher et contrôler l'expression du gène cloné dans la cellule hôte au cours de la production.

##### 4.2 Contrôle de la production

###### 4.2.1 Cellules de semence et banque de cellules de travail du fabricant

La production sera fondée sur le système de lots de semence, comprenant un lot-mère de cellules de semences et une banque de cellules de travail du fabricant issue du lot-mère de cellules de semence. Pour constituer un lot-mère de cellules de semence, on procédera au clonage d'une cellule hôte contenant le vecteur d'expression. Lors de la constitution des lots de semence, aucune autre lignée cellulaire ne devra être manipulée dans les mêmes locaux ou par les mêmes personnes.

On décrira en détail l'origine, la forme, le mode de stockage et la durée d'utilisation du matériel de semence compte tenu du rythme d'utilisation prévu. Il faudra également fournir des preuves de la stabilité du système d'expression dans le lot-mère de cellules de semence dans les conditions de stockage et de réactivation. Il conviendra de caractériser précisément les nouveaux lots de semence et d'établir les critères d'acceptabilité auxquels ils devront répondre.

Si l'on emploie des cellules d'eucaryotes supérieurs pour la production, il faudra se servir de marqueurs distinctifs de la cellule, tels que profil des isoenzymes ou caractéristiques immunologiques, pour établir l'identité de la semence. On fournira des détails sur la tumorigénicité des lignées cellulaires continues. Si l'on emploie des cultures microbiennes, on précisera les caractéristiques phénotypiques spécifiques pouvant servir de base à l'identification.

La séquence d'ADN du gène cloné doit normalement être vérifiée au stade du lot-mère de cellules de semence. Toutefois, dans certains cas, par exemple lorsqu'on insère plusieurs copies du gène dans le génome d'une lignée cellulaire continue, il peut s'avérer inapproprié de séquencer le gène cloné à ce stade. Dans ces cas, l'hybridation-transfert de l'ADN cellulaire total ou le séquençage de l'ARNm peuvent être intéressants; il faut alors accorder une attention particulière à la caractérisation du produit final.

Dans la mesure du possible, on fournira la preuve que le lot de semence est exempt de tout agent contaminant, qu'il s'agisse d'un agent potentiellement oncogène ou d'un agent infectieux - bactérien, mycoplasmatique, fongique ou viral. On recherchera particulièrement les virus qui contaminent couramment les animaux de l'espèce d'où a été tirée la lignée cellulaire. De préférence, les lots de semence seront exempts de tout contaminant. Toutefois, certaines lignées cellulaires contiennent des virus endogènes, par exemple des rétrovirus, qui peuvent s'avérer difficiles à éliminer. On recherchera la présence de ces micro-organismes dans les diverses conditions connues pour provoquer leur induction et on rapportera les résultats obtenus. Il faudra montrer que les contaminants spécifiques identifiés comme étant des agents endogènes de la banque de cellules de travail ou du fabricant, comme faisant partie du vecteur, ont été inactivés et/ou éliminés par les méthodes de purification utilisées au cours de la production.

#### 4.2.2 Production à un nombre de passages défini

Il conviendra de décrire en détail les méthodes et les matériels utilisés pour assurer la croissance cellulaire et induire la production. On fournira des données sur la fréquence, l'importance et la nature de toute contamination microbienne des bacs de culture juste avant la récolte, ainsi que sur la sensibilité des méthodes utilisées pour détecter cette contamination; on fixera les limites admissibles de contamination.

Il faudra également présenter des données relatives à l'uniformité de la croissance cellulaire et au maintien du rendement en produit. On établira des critères de rejet des lots de culture. Il faudra, compte tenu des données relatives à la stabilité du système cellule hôte/vecteur, obtenues par des repiquages en série jusqu'au nombre utilisé pour la production et au-delà, définir quel sera le nombre maximum de doublements de la population cellulaire ou de passages autorisés pour la production.

On contrôlera par une méthode appropriée les caractéristiques du système cellule hôte/vecteur en fin de cycle de production. Par exemple, il pourra être intéressant d'avoir des renseignements détaillés sur le nombre de copies du plasmide et le degré de rétention du vecteur d'expression dans la cellule hôte, et d'effectuer une cartographie de restriction du vecteur contenant le gène inséré. Le cas échéant (voir 4.2.1), il conviendra de déterminer pour chaque banque de cellules de travail du fabricant la séquence nucléotidique du fragment codant pour la substance recherchée, au moins une fois après mise en culture à l'échelle industrielle. Si plusieurs copies du vecteur sont intégrées dans le génome de la cellule hôte, il peut être difficile de vérifier directement la séquence d'ADN. En de tels cas, il faut envisager d'isoler la séquence nucléotidique de l'ARNm et de la déterminer ou d'effectuer une hybridation-transfert (Southern blot) de l'ADN total.

#### 4.2.3 Production en culture continue

Comme précédemment (4.2.2), on décrira en détail les méthodes et les matériels utilisés pour assurer la croissance cellulaire et induire la production. En outre, on accordera une attention toute particulière aux méthodes utilisées pour contrôler la production. Une surveillance devra s'exercer pendant toute la durée de vie de la culture, à un rythme et selon un type de contrôle qui dépendront de la nature du système de production et du produit lui-même.

Il faudra pouvoir disposer de renseignements relatifs à l'intégrité moléculaire du gène exprimé et aux caractéristiques phénotypiques et génotypiques de la cellule hôte après culture prolongée. On apportera également la preuve que le rendement ne varie pas au-delà des limites définies. L'acceptabilité des récoltes pour un traitement ultérieur devra être strictement fonction du programme de surveillance appliqué, et il conviendra de définir très précisément ce qu'est un "lot" de produit destiné à un traitement ultérieur. Il conviendra également d'établir des critères de rejet des récoltes ou d'interruption prématurée de la culture. On recherchera périodiquement s'il y a eu contamination microbienne, à des intervalles qui dépendront du mode de récolte.

Il conviendra de préciser la durée d'utilisation de la culture continue, compte tenu des données relatives à la stabilité du système et à l'uniformité du produit obtenu jusqu'à cette limite et au-delà. En cas de culture continue prolongée, il faudra entièrement réévaluer la lignée cellulaire et le produit à des intervalles calculés d'après les données relatives à la stabilité du système hôte/vecteur et aux caractéristiques du produit.

#### 4.2.4 Purification

On décrira en détail les méthodes de récolte, d'extraction et de purification. On accordera une attention particulière à l'élimination de toute contamination par des virus, des acides nucléiques ou des substances antigéniques indésirables.

Les méthodes qui font appel à la chromatographie d'affinité, dans laquelle sont utilisées des substances biologiques telles que les anticorps monoclonaux, devront comprendre des mesures appropriées pour faire en sorte que ces substances, ou tout autre contaminant potentiel associé à leur emploi, par exemple des virus, ne compromettent pas l'innocuité du produit final.

Il conviendra de faire une étude exhaustive de l'aptitude de la méthode de purification à éliminer tout matériel indésirable, à savoir les protéines de la cellule hôte, l'acide nucléique, les glucides, les virus ou autres impuretés, notamment les substances chimiques indésirables introduites par le procédé de purification lui-même. De la même façon, on analysera la reproductibilité de la méthode. On peut avoir besoin des données recueillies lors des études de validation des méthodes de purification pour démontrer l'absence d'ADN ou de virus à chaque étape de purification et à la fin du processus. De telles études, qui feront appel à des expériences pilotes, seront fondées sur les résultats obtenus avec un groupe de virus soigneusement choisi, offrant un éventail de caractéristiques physico-chimiques représentatives des contaminants potentiels, ou avec un ADN radio marqué ajouté à la préparation brute ("spiking"). Leurs résultats donneront un modèle théorique de l'élimination des contaminants en cours de purification.

#### 4.3 Contrôle du produit final

On établira l'identité, la pureté et la stabilité du produit final en vrac. Le type d'épreuve nécessaire et le degré de pureté attendu dépendront de plusieurs facteurs, notamment de la nature du produit, de l'usage auquel il est destiné, de la méthode de production et de purification, ainsi que de l'expérience que l'on a du procédé de fabrication.

#### 4.3.1 Caractérisation du produit purifié

Il sera capital de caractériser le produit de façon rigoureuse par des méthodes chimiques, physiques et biologiques. On s'efforcera tout particulièrement d'utiliser un large éventail de techniques analytiques exploitant les différentes propriétés physiques ou chimiques de la molécule : dimensions, charge, point isoélectrique, composition en acides aminés et caractère hydrophobe. Il peut également s'avérer nécessaire d'y inclure des épreuves permettant d'établir que le produit possède la conformation et le degré d'agrégation désirés. Parmi les techniques utilisables on peut citer :

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide, l'isoélectrofocalisation, la chromatographie (d'exclusion, à phases inversées, par échange d'ions, par interaction hydrophobe ou d'affinité), la cartographie de la chaîne peptidique, l'analyse des acides aminés, la dispersion optique, la spectroscopie U.V., le dichroïsme circulaire et d'autres techniques spectroscopiques. Une caractérisation supplémentaire du produit à l'aide de techniques immunochimiques pourrait également fournir des renseignements intéressants.

Dans la mesure du possible, on comparera les propriétés du produit à celles de la molécule naturelle.

Il faudra montrer que le produit obtenu possède bien l'activité biologique prévue, activité que l'on fixera (unités d'activité biologique/ml). En outre, il sera particulièrement intéressant de déterminer l'activité spécifique du matériel hautement purifié (unités d'activité/masse du produit).

On devra connaître suffisamment en détail la séquence pour pouvoir caractériser correctement le produit. Le degré de vérification de cette séquence dépendra de l'importance des autres épreuves de caractérisation effectuées. Dans certains cas, une détermination partielle de la séquence et une cartographie partielle de la chaîne peptidique peuvent suffire et, dans d'autres, on pourra avoir besoin de déterminer la séquence entière. On sera attentif à la présence possible d'une méthionine N-terminale, de séquences signal et de tête et autres modifications N- et C-terminales éventuelles (telles qu'acétylation, amination ou dégradation partielle par des exopeptidases). Il faudra rechercher les autres modifications post-traductionnelles, telles que la glycosylation, et les caractériser correctement. On accordera une attention particulière au fait que de telles modifications peuvent différer de celles trouvées dans la molécule naturelle et peuvent influencer sur les propriétés biologiques et pharmacologiques du produit.

#### 4.3.2 Pureté

Il conviendra de fournir des données relatives aux contaminants présents dans le produit, notamment des estimations de leur concentration maximale. On fixera le degré de contamination admissible et les critères de rejet d'un lot de production.

Il importe que les techniques employées pour démontrer la pureté de la substance fassent appel à un éventail de propriétés physico-chimiques le plus large possible. On sera attentif aux épreuves de mise en évidence d'une contamination par un virus, par un acide nucléique, ou par d'autres matériels indésirables provenant de l'hôte, ainsi qu'aux éléments qui ont pu être ajoutés en cours de fabrication ou de purification. On fixera des limites pour toutes les impuretés décelées, qui seront identifiées et caractérisées comme il convient.

Dans les substances devant être administrées de façon répétée ou à doses élevées, on recherchera les éléments antigéniques à l'état de traces et les impuretés liées à la substance, tels qu'agrégats ou produits de dégradation susceptibles de contaminer le produit final, et on leur fixera des limites supérieures rigoureuses. Pour déceler les antigènes contaminants, on pourra employer des épreuves telles que l'immuno-transfert, les titrages radio-immunologiques, et les titrages immuno-enzymatiques (ELISA) au moyen d'anticorps hautement spécifiques élaborés contre le produit, de lysats de cellules hôtes, de fractions cellulaires ou de constituants des milieux de culture appropriés. La détection de l'antigène sera limitée par la spécificité et la sensibilité de l'immunsérum utilisé, aussi ces

titrages immunologiques viendront-ils compléter, et non remplacer, l'analyse, par coloration au bleu de Coomassie et à l'argent, des gels obtenus par électrophorèse en gel de polyacrylamide - SDS. Chez les malades ayant reçu des doses importantes ou répétées de la substance au cours des essais cliniques, on sera attentif à l'apparition d'anticorps dirigés contre les antigènes contaminants et contre le produit.

#### 4.4 Contrôle de routine des lots

Il est bien clair qu'il ne faudra pas effectuer toutes les épreuves décrites précédemment sur chaque lot. Certaines serviront uniquement à établir la validité ou l'acceptabilité d'une méthode, alors que d'autres seront effectuées sur un nombre limité de lots pour confirmer la régularité de la production. Ainsi, il faudra effectuer pour chaque substance une analyse complète des premiers lots obtenus, afin d'attester la régularité de la production en matière d'identité, de pureté et d'activité. Par la suite, on peut se contenter d'un nombre restreint d'épreuves comme indiqué ci-dessous.

##### 4.4.1 Régularité

On caractérisera le plus complètement possible, comme indiqué ci-dessus, un nombre acceptable de lots consécutifs de produit fini, par exemple six, afin de déterminer l'uniformité de leur composition. On notera toute différence relevée d'un lot à l'autre. Les données ainsi obtenues serviront de base à la spécification du produit.

##### 4.4.2 Identité

On choisira certaines des épreuves de caractérisation de la substance active purifiée pour confirmer l'identité du produit dans chaque lot. Cependant, les épreuves spécifiques permettant de caractériser correctement un produit donné d'un lot à l'autre dépendront de la nature du produit et de sa méthode de fabrication. En fonction de l'importance des autres épreuves d'identification, on vérifiera certaines séquences N- et C-terminales, ou on emploiera une autre méthode comme la cartographie de la chaîne peptidique.

##### 4.4.3 Pureté

On contrôlera la pureté de chaque lot, pureté qui devra se situer dans des limites précises. Pour chaque lot de produit obtenu en lignées continues de cellules mammaliennes (lignées cellulaires transformées), cette analyse devra comprendre des épreuves sensibles et fiables permettant de mettre en évidence l'ADN provenant de la cellule hôte (par exemple l'hybridation de l'ADN contaminant immobilisé, à l'aide de sondes appropriées); on fixera des limites supérieures rigoureuses pour la quantité d'ADN hétérogène admissible dans la substance. Les problèmes théoriques posés par l'ADN transformant issu des substrats cellulaires seront minimisés du fait de la diminution globale de la quantité d'acide nucléique contaminant (OMS, Série de Rapports techniques, N° 747 (1987)). Il est recommandé d'effectuer également ce type d'analyse sur tous les lots de produit obtenus à partir d'autres cellules eucaryotes et de fixer des limites de teneur en ADN résiduel, jusqu'à ce qu'on ait davantage de renseignements sur leur innocuité. On recherchera la présence d'ADN provenant des systèmes d'expression procaryotes (par exemple, provenant d'un vecteur ou d'un plasmide) chaque fois qu'il s'agira d'établir la qualité et l'innocuité d'un produit.

En ce qui concerne les produits devant être administrés de façon prolongée ou à doses élevées, on recherchera la présence de protéines cellulaires résiduelles au moyen d'un titrage suffisamment sensible (par exemple capable de déceler des quantités exprimées en parties par million) et l'on fixera des limites supérieures rigoureuses.

##### 4.4.3 Activité

Dans la mesure du possible, on déterminera l'activité de chaque lot de substance au moyen d'une préparation de référence nationale ou internationale étalonnée en unités d'activité biologique. Si l'on ne dispose pas d'une telle préparation, une préparation de référence interne approuvée peut être employée pour normaliser les épreuves.

5. Substances de référence

Les analyses décrites dans les sections 4.3 et 4.4 contribueront à établir une spécification définitive du produit.

On conservera comme substances de référence chimique et biologique un lot de produit, de préférence évalué cliniquement, et entièrement caractérisé sur le plan de sa composition chimique, de sa pureté, et de son activité biologique, avec dans la mesure du possible séquençage complet des acides aminés. Le cas échéant, on comparera ces propriétés à celles d'une préparation hautement purifiée de la molécule naturelle.

6. Evaluation d'innocuité préclinique

Le but des épreuves d'innocuité précliniques est de déterminer si les nouveaux médicaments peuvent avoir des effets inattendus et indésirables. Toutefois, les épreuves classiques d'innocuité ou de toxicologie recommandées pour les médicaments sont d'une application limitée en ce qui concerne les substances obtenues par recombinaison de l'ADN. En effet, ces dernières posent des problèmes particuliers en matière d'épreuves de toxicité chez les animaux et, pour évaluer leur innocuité, il faudra prendre en compte de nombreux facteurs. Par exemple, certaines protéines, comme les interférons, sont hautement spécifiques d'espèce et, par conséquent, la protéine humaine est pharmacologiquement bien plus active chez l'homme que chez toute autre espèce. En outre, les séquences d'acides aminés des protéines humaines seront souvent très différentes de celles de leurs analogues naturels chez d'autres espèces, tout comme le seront les groupes glucidiques. Ainsi, chez des hôtes étrangers, ces protéines provoquent fréquemment des réponses immunitaires qui peuvent, en fin de compte, modifier leurs effets biologiques et se traduire par une toxicité due à la formation de complexes immuns. Bien entendu, une telle toxicité aura peu d'incidence sur l'innocuité de la substance chez l'homme, à qui elle est destinée.

C'est entre autres pour ces raisons qu'il faudra probablement adopter une approche plus souple pour l'évaluation préclinique de l'innocuité des produits obtenus par génie génétique. Bien qu'il ne fasse aucun doute que des épreuves d'innocuité devront être appliquées à la plupart des produits, la gamme des épreuves à employer devra être déterminée au cas par cas, en consultation avec l'autorité nationale délivrant les autorisations de mise sur le marché. Selon le cas, on aura recours à un large éventail de techniques pharmacologiques, biochimiques, immunologiques, toxicologiques et histopathologiques pour évaluer les effets de l'exposition aiguë et chronique à toute une gamme de doses d'un produit, mais sans perdre de vue les points susmentionnés concernant la spécificité d'espèce et la formation d'anticorps. Pour les études dont la durée dépasserait quatre semaines, il faudra envisager d'employer des espèces connues pour leur faible réponse en anticorps vis-à-vis du produit à examiner.

- - -