

Farmaci biologici/biotecnologici

Carlo Pini (carlo.pini@iss.it)

Centro Nazionale per la Ricerca e la Valutazione dei
Prodotti Immunobiologici (CRIVIB)

Istituto Superiore di Sanità – Roma



Che cosa è un farmaco biologico



Guidance for applicants on biologicals

- A biological medicinal product is a product, the active substance of which is a biological substance. A biological substance is a substance that is produced by or extracted from a biological source and for which a combination of physico-chemical-biological testing and the production process and its control is needed for its characterisation and the determination of its quality.

This definition is given both in Part I of Annex I of Directive 2001/83/EC (as amended by Directive 2003/63/EC) and in the introductory statements to Annex I of EC/1084/2003 and EC/1085/2003.


According to this definition the substance should be of biological origin and, due to its complexity, a combination of physico-chemical-biological testing together with testing and control of the production process is needed for its characterisation and determination of quality.



Farmaci biologici

- Farmaci (principalmente proteine, glicoproteine o polisaccaridi) ottenuti in forma non purificata mediante procedimenti di produzione non basati su sintesi chimica ma che utilizzano processi estrattivi da materiali di partenza grezzi
- Tali materiali di partenza possono essere costituiti da colture di cellule procariotiche o eucariotiche non modificate, plasma, prodotti naturali (pollini per allergeni), ecc.
- La loro attività farmacologica non può essere in genere espressa con metodi chimico/fisici ma richiede lo sviluppo e l'impiego di opportuni saggi di attività biologica (*potency*).

Processi di produzione

- Estrattivi
 - Colture
 - Batteri/Virus
 - Raccolta del microrganismo
 - Altre fonti
 - Processo di purificazione
 - Inattivazione delle molecole rilevanti (se del caso)
 - (tossina  tossoide/anatossina)
 - Controlli “in process”
 - Formulazione

Controlli di rilascio



Farmaci biotecnologici

(Farmaci biologici ottenuti mediante processi biotecnologici)

- Farmaci (proteine o glicoproteine) ottenuti mediante processi di estrazione e purificazione a partire da substrati cellulari che hanno subito un procedimento di ingegnerizzazione (inserzione del gene di interesse) o modifica (fusione cellulare, linee continue, monoclonali) di varia entità.
- La loro attività farmacologica può essere in genere espressa anche con metodi chimico/fisici ma richiede spesso lo sviluppo e l'impiego di opportuni saggi di attività biologica (*potency*).

Processi di produzione

- Tecniche di ingegneria genetica
 - Identificazione delle molecole di interesse
 - Clonaggio
 - Sequenza
 - Screening di library di espressione
 - Identificazione del/dei clone/i
 - Site- directed mutagenesis
 - Generazione di molecole prive di tossicità (pertosse)
 - Clonaggio
 - Produzione su vasta scala e Purificazione
 - Controlli in “process”
 - Formulazione
 - Controlli di rilascio

Clonaggio di un gene di interesse

Isolate mRNA from the source material



Prepare single-stranded cDNA by reverse transcriptase

PCR



Phage



Design primers on the basis of the N-terminal sequence of the protein

CR amplification of single-stranded cDNA by degenerated primers

cloning of the PCR product and sequencing of the clone

Prepare an expression library in appropriate vectors

Screening of the library with monoclonal/polyclonal antibodies

subcloning and sequencing of DNA clones



Expression in host cells *E.coli*, CHO, *Pichia*, insects and characterisation of the recombinant product

Farmaci Biologici e Biotecnologici

- Farmaci Biologici
 - vaccini batterici e virali
 - emoderivati
 - allergeni
 - citochine naturali non ottenute da linee continue
- Farmaci biotecnologici
 - rDNA, anticorpi monoclonali,
 - citochine ottenute da linee continue
 - Farmaci innovativi (terapia cellulare, terapia genica,....)

Farmaci Biologici e Biotecnologici

- Non è possibile valutare il farmaco biotecnologico senza l'esperienza scientifica legata al farmaco biologico
- Molti approcci scientifici/metodologici originano dal farmaco biologico
- Il farmaco biotecnologico si affianca al farmaco biologico ma in molti casi non lo sostituisce
- Esistono farmaci biotecnologici che non hanno equivalenti biologici e viceversa
- Esiste innovatività anche nel settore dei farmaci biologici

Farmaci Biologici e Biotecnologici

- Sebbene abbiano molti aspetti in comune, i farmaci biologici e biotecnologici si differenziano in vari aspetti, sia da un punto di vista produttivo che regolatorio.

Produzione Farmaci Biologici/biotecnologici

- Materiale di partenza (cellule, plasma, polline, ecc.)



- Bulk (Drug Substance) non formulato (API, GMP Parte II)

Attività alla portata di piccoli



centri scientifici/universitari

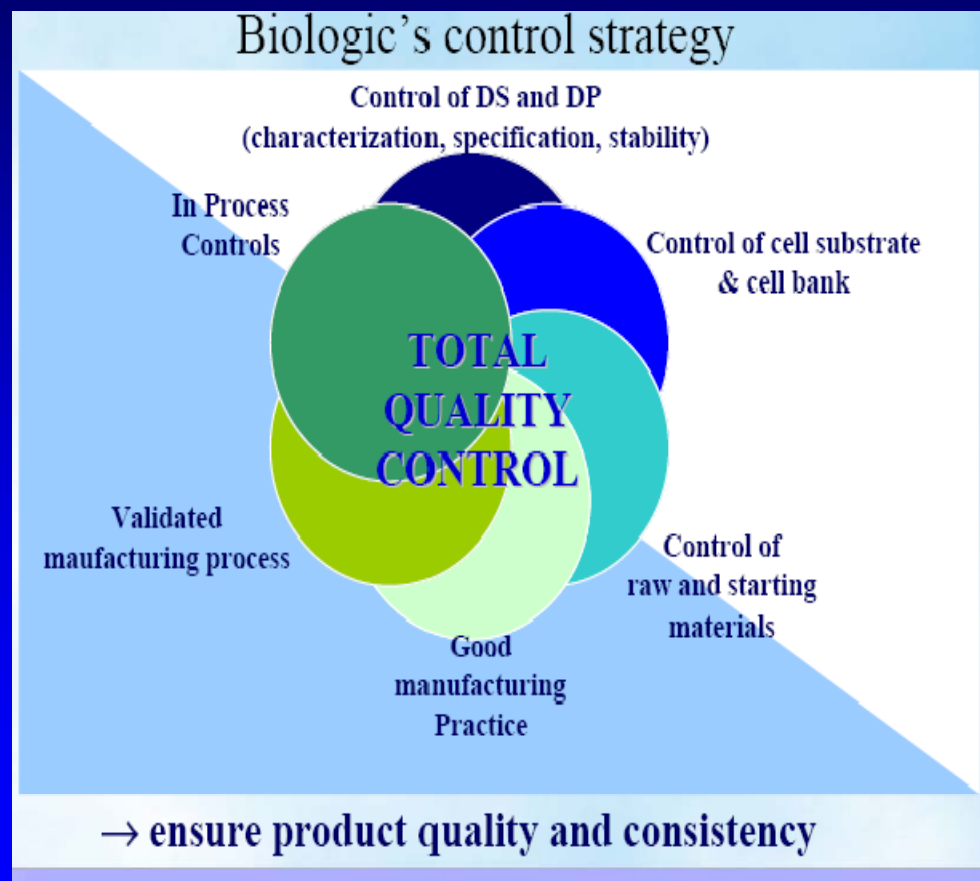
- Prodotto Finito (Drug Product) formulato (GMP Annex 1, 2)

Attività altamente specializzata e costosa

Aspetti che definiscono la qualità dei farmaci Biologici e Biotecnologici

- ☒ Controllo del materiale di partenza
- ☒ Controllo del processo di produzione
- ☒ Controllo del prodotto finito

☒ GMP



Esempi di Prodotti Biologici/Biotecnologici

- Emoderivati classici e citochine naturali
- Vaccini
- Allergeni

Emoderivati e citochine naturali

- Albumina
- Fattori della coagulazione
- Immunoglobuline
- Frazioni del complemento (C1q inibitore)

- Interferon alfa naturale (miscela di INF)

Vaccini

- Batterici
 - Vivi attenuati (BCG)
 - Uccisi non purificati (Pertosse cellulare, WCP)
 - Purificati (tutti gli altri, D, T, Pertosse acellulare, Emofilo, Pneumococco, meningococco, ecc.)
- Virali
 - Vivi attenuati (MMR, OPV, varicella, ecc.)
 - Uccisi (IPV)
 - Purificati (influenza, r-HepB e r-HepA, Papilloma, ecc.)

Allergeni (Estratti allergenici)

- Ottenuti dalle fonti allergeniche mediante semplici procedure di estrazione in tamponi acquosi
- **Miscele complesse di componenti allergeniche e non**
- “Prodotti allergenici”: estratti formulati che possono essere o lasciati non modificati o trattati chimicamente (soprattutto a scopo terapeutico)

Controllo del processo di produzione dei farmaci biologici

- Il processo di produzione deve essere attentamente convalidato, con particolare riguardo ad alcune fasi di processo, quali lo scaling up e altri cambiamenti
- Opportune specifiche *in process* devono consentire di definire la qualità dei vari intermedi
- Rimozione/inattivazione di microrganismi (virus, prioni, ecc.)

Controllo del prodotto biologico finito

- Caratterizzazione chimico-fisica
 - In genere non soddisfacente
 - Attuabile per alcuni vaccini, per gli emoderivati e per alcuni allergeni
- Caratterizzazione immunologica
 - per vaccini e per alcuni allergeni
- Attività biologica
 - Per tutti tranne molti allergeni e l'albumina

Riproducibilità dei lotti di prodotto finito

- Al fine di conferire un opportuno significato agli studi di efficacia, i dati del prodotto finito devono mostrare la riproducibilità da lotto a lotto sia delle caratteristiche del principio attivo che delle impurezze.
- Cambiamenti della formulazione in corso di sviluppo potrebbero inficiare i dati di sicurezza ed efficacia e modificare il profilo di stabilità (comparsa di nuove impurezze legate al processo e/o al prodotto)

Impatto della qualità sulla sicurezza ed efficacia

- Tossicità
 - Residui, impurezze, ecc.
- Immunogenicità
 - Del prodotto
 - Di degradati o aggregati
 - Di impurezze di processo
- cross-reattività con molecole self degli anticorpi eventualmente indotti

Ne caso in cui le tipologie di prodotto in esempio fossero ottenute mediante l'impiego di un processo di ingegnerizzazione (Prodotti Biotecnologici), andrebbero considerati alcuni aspetti in aggiunta a quanto sintetizzato sino ad ora. Ad esempio....

Analisi delle banche di cellule MCB e WCB

- Una completa analisi costituisce elemento fondamentale per la valutazione della qualità e sicurezza di prodotti ottenuti da banche cellulari
- Tale caratterizzazione deve essere effettuata sulla/e banca/e che originano il prodotto in esame e sulla popolazione che si ottiene oltre il numero di divisioni che costituiscono il limite imposto nel processo di produzione (Extended population).

MCB e WCB

- Costrutto

- Sequenza nucleotidica, metodo per la preparazione del DNA
- Assemblaggio del costrutto
 - Origine di replicazione, geni per la resistenza ad antibiotici, promotori, proteina di fusione, siti di clivaggio, loro stabilità, dati di sequenza dopo la manipolazione incluse le flanking regions, ecc.
- Mappe di restrizione, controllo del costrutto dopo inserzione e/o integrazione

- Stabilità

- Post production cells

Produzione biotecnologici

- Definizione dei processi di fermentazione
 - single harvest, multiple harvest and extended population
- Procedimento di purificazione
 - Intermedi avanzati e prodotti finiti ben caratterizzabili
 - convalide di processo e specifiche per le impurezze quali proteine e acidi nucleici dell'ospite
 - Limiti in process
 - inattivazione/rimozione virale

Controllo del prodotto biotecnologico finito

- Caratterizzazione fisico chimica
 - peso molecolare, punto isoelettrico
- Analisi strutturale
- Modifiche post traduzionali
 - glicosilazione, acetilazione, idrossilazione, deaminazione, ossidazione, ecc.
- Dati conformazionali
 - light scattering, spettroscopia UV, CD e spettrometria di massa
- Attività biologica

Prodotti Biologici/biotecnologici e cambiamenti nel processo di produzione

- Sistema di espressione/seeds/banks
 - MCB, WCB, MS, WS
- Fermentazione/
 - Raw material , condizioni di coltura, attrezzature, nuovo sito/officina
- Processo di purificazione
 - Cambiamenti nelle colonne/resine, specs (impurezze), nuovi step, downstream process, nuovo sito/officina per la purificazione, attrezzature
- Formulazione e filling
 - Eccipienti, Attrezzature, Cambiamenti nel processo, Scaling up or down, Additional site/facility, condizioni di trasporto
- Prodotto finito
 - Batch definition, Shelf life, Container/closure system , condizioni di conservazione, condizioni di trasporto

Comparability Guideline

- Guideline on Comparability of Medicinal products containing Biotechnology-derived proteins as active substance:
 - Quality Issues
 - Non Clinical and Clinical issues

Into operation since December 2003

- ICH Q5E Comparability of Biotechnological/Biological Products subject to changes in their manufacturing process – Step 4, adopted Yokohama Nov 2004

“Comparability exercise”

- Sebbene il concetto sia ampio, l’esercizio di comparabilità si applica più facilmente ai prodotti biotecnologici
- Un pre-requisito per poter avviare l’esercizio è che il principio attivo (active substance) sia caratterizzato
- L’approccio e i concetti alla base della comparabilità possono comunque essere applicati ai prodotti biologici, purché essi possano essere, analogamente, adeguatamente caratterizzati.

Analisi del prodotto biotecnologico *in process-drug product*

- Caratterizzazione fisico chimica
 - peso molecolare, punto isoelettrico
- Analisi strutturale
- Modifiche post traduzionali
 - glicosilazione, acetilazione, idrossilazione, deaminazione, ossidazione, ecc.
- Dati conformazionali
 - light scattering, spettroscopia UV, CD e spettrometria di massa
- Attività biologica

Esempi di metodi

- Aminoacid sequence
- Aminoacid composition
- Terminal amino acid sequence
- Peptide map
- Sulfhydryl groups and disulfide bridges
- Carbohydrate structure
- MW (HPLC, SDS-PAGE, mass spectrometry)
- Isoforms (IEF)
- Extinction coefficient (UV, visible)
- Electrophoresis
- Liquid chromatography
- CD, NMR

Outcome della comparazione

- Il cambiamento non influenza la qualità dell'intermedio/prodotto finito
- Il cambiamento potrebbe/potrà influenzare la qualità dell'intermedio e/o del prodotto finito

In ogni caso l'impatto sulla safety e efficacy deve essere valutato e l'approccio definito da caso a caso.

Conclusioni

- I farmaci Biologici (Biotecnologici) sono costituiti da principi attivi complessi (macromolecole) che richiedono una caratterizzazione chimico-fisica e biologica articolata.
- Tali farmaci richiedono una valutazione scientifica secondo un'ottica peculiare non molto confrontabile, per molti aspetti, con quella seguita per il farmaco da sintesi chimica
- La qualità dei prodotti biologici (biotecnologici) è legata ad un insieme di caratteristiche che comprendono il materiale di partenza, il processo e le caratteristiche del prodotto finito.
- La valutazione di tali aspetti al fine di poter concludere circa la accettabile qualità di un prodotto in esame viene effettuata seguendo precisi parametri tecnici stabiliti in sedi internazionali