

# Industrializzazione e regolamentazione



## di prodotti biotecnologici

### ❖ **Obiettivi formativi**

Prospettiva industriale relativa ai requisiti di sviluppo e produzione di prodotti biotecnologici per la cura e la prevenzione di malattie, sia dal punto di vista tecnico che normativo.

### ❖ **Docente**

PhD Gabriele Meli

### ❖ **FOCUS**

Industrializzazione di processo

### ❖ **Orario lezioni**

Martedì e Mercoledì 17-19

### ❖ **Modalità di esame**

Scritto

### ❖ **Contatto preferenziale**

[gabriele.meli78@gmail.com](mailto:gabriele.meli78@gmail.com)

Questo corso contiene informazioni a scopo didattico, non correlate in alcun modo a dati rilevanti per Bracco Imaging S.p.A. e fa riferimento alla formazione personale ed all'esperienza professionale secondo il mio punto di vista.

GABRIELE MELI

# Prodotti biotecnologici (ICH Q5A)



## Concetti chiave

- Questa linea guida valuta la sicurezza dei prodotti biotecnologici derivati da linee cellulari di origine umana o animale (cioè, mammifero, aviaria, insetto) e delinea i dati che devono essere presentati nella domanda di commercializzazione/pacchetto di registrazione.
- Lo scopo del documento riguarda i prodotti derivati da colture cellulari ottenute da banche cellulari caratterizzate in maniera specifica.
- Riguarda prodotti derivanti da colture cellulari in vitro, come:
  - interferoni;
  - anticorpi monoclonali;
  - prodotti ricombinanti derivati dal DNA;
  - prodotti derivati da cellule di ibridoma coltivate in vivo.

# Prodotti biotecnologici (ICH Q5A)

## Concetti chiave

- Il rischio di contaminazione virale è una caratteristica comune a tutti i prodotti biotecnologici derivanti da linee cellulari.
- Tale contaminazione potrebbe avere gravi conseguenze cliniche e può derivare dalla contaminazione delle stesse linee cellulari di origine (substrati cellulari) o dall'introduzione non intenzionale di virus durante la produzione.
- **Ad oggi, tuttavia, i prodotti biotecnologici derivati da linee cellulari non sono stati implicati nella trasmissione di virus.**
- Tuttavia, si prevede che la sicurezza di questi prodotti per quanto riguarda la contaminazione virale possa essere ragionevolmente assicurata solo dall'applicazione di un programma di test sui virus e dalla valutazione della rimozione e dell'inattivazione del virus ottenuto dal processo di fabbricazione, come descritto di seguito.

N.B. Il termine virus esclude agenti trasmissibili non convenzionali come quelli associati all'encefalopatia spongiforme bovina (BSE).

# Prodotti biotecnologici (ICH Q5A)



## Concetti chiave

Nel tempo si sono consolidati tre principali approcci complementari per controllare la potenziale contaminazione virale dei prodotti biotecnologici:

1. Selezionare e testare linee cellulari e altre materie prime, compresi i componenti dei medium, per l'assenza di virus che possono essere infettivi e/o patogeni per l'uomo;
2. Valutare la capacità dei processi di produzione di eliminare i virus infettivi;
3. Testare il prodotto in fasi appropriate di produzione per valutare l'assenza di virus infettivi contaminanti.

# Prodotti biotecnologici (ICH Q5A)



## Concetti chiave

- I test sono penalizzati dalla limitazione intrinseca dei saggi virali quantitativi: la capacità di rilevare basse concentrazioni virali dipende, per ragioni statistiche, dalla dimensione del campione in esame.
- Pertanto, nessun approccio singolo stabilirà necessariamente la sicurezza di un prodotto.
- **L'assenza del virus infettivo nel prodotto finale dovrà essere avvalorata da test diretti ad individuarne la presenza, ma anche da una dimostrazione che il regime di purificazione è in grado di rimuovere e/o inattivare i virus stessi.**

# Prodotti biotecnologici (ICH Q5A)



## Concetti chiave

La valutazione della sicurezza nei prodotti Biotech deve quindi essere fatta case-by-case e step-by-step. I fattori che dovrebbero essere presi in considerazione comprendono la caratterizzazione e la convalida di:

- linea cellulare;
- natura dei virus rilevati;
- costituenti del mezzo di coltura;
- metodi di coltura;
- progettazione di impianti e attrezzature.

La contaminazione virale dei prodotti biotecnologici può derivare dalla fonte originale delle linee cellulari o dall'introduzione involontaria del virus durante i processi di produzione.

# Prodotti biotecnologici (ICH Q5A)

## Contaminazione virale

1. Virus che potrebbero essere presenti nel Master Cell Bank (MCB)
  - Le cellule possono presentare un'infezione virale latente o persistente (ad es. Herpesvirus) o un retrovirus endogeno che possono essere trasmessi verticalmente da una generazione di cellule all'altra, poiché il genoma virale persiste all'interno della cellula. Tali virus possono essere espressi costitutivamente o possono manifestarsi inaspettatamente come virus infettivi.
  - I virus possono essere introdotti nel MCB attraverso diverse vie, come:
    - derivazione di linee cellulari da animali infetti;
    - uso del virus per stabilire la linea cellulare;
    - uso di reagenti biologici contaminati come componenti di siero animale;
    - contaminazione durante la manipolazione delle celle.

# Prodotti biotecnologici (ICH Q5A)

## Contaminazione virale

### 2. Virus avventizi che potrebbero essere introdotti durante la produzione

- I virus estranei possono essere introdotti nel prodotto finale da diverse vie tra cui:
  - l'uso di reagenti biologici contaminati come componenti di siero animale;
  - l'uso di un virus per l'induzione dell'espressione di geni specifici che codificano una proteina desiderata;
  - l'uso di un reagente contaminato, come una colonna di affinità per gli anticorpi monoclonali;
  - l'uso di un eccipiente contaminato durante la formulazione;
  - contaminazione durante la manipolazione cellulare e medium.

Il monitoraggio dei parametri della coltura cellulare può essere utile per la diagnosi precoce di una potenziale contaminazione virale avventizia.



# Prodotti biotecnologici (ICH Q5A)

---

## Master Cell Bank (MCB)

- L'esame approfondito per la contaminazione virale endogena e non endogena deve essere eseguito sul MCB;
- Per le linee cellulari etero-ibride in cui uno o più partner sono primati umani o primati non umani, è necessario eseguire test per rilevare i virus di origine umana o non umana dei primati in quanto la contaminazione virale derivante da tali cellule può rappresentare un rischio particolare;
- I test per virus non endogeni dovrebbero includere test di inoculazione in vitro e in vivo e qualsiasi altro test specifico, inclusi test specifici per specie come il test di produzione di anticorpi murini (MAP), che sono appropriati, sulla base della storia di passaggio della linea cellulare , per rilevare possibili virus contaminanti.

# Prodotti biotecnologici (ICH Q5A)



## Working Cell Bank (WCB)

- Ogni WCB come substrato di cellule di partenza per la produzione di farmaci dovrebbe essere testato per il virus avventizio mediante test diretto o mediante analisi di cellule al limite dell'età cellulare in vitro, avviato dal WCB;
- Quando sono stati eseguiti appropriati test per l'individuazione del virus non endogeno sul MC e le cellule coltivate fino a oltre il limite di età delle cellule in vitro derivate, non è necessario eseguire test simili sul WCB iniziale.
- Generalmente non sono necessari test di produzione di anticorpi per il WCB.
- Sarebbe inoltre accettabile un approccio alternativo in cui vengono eseguiti i test completi sul WCB anziché sull'MCB.

# Prodotti biotecnologici (ICH Q5A)

## Cellule in vitro al limite dell'età utilizzate per la produzione

- Il limite dell'età delle cellule in vitro utilizzato per la produzione, dovrebbe essere basato su dati derivati da cellule di produzione, espansive in scala pilota o su scala commerciale, per l'età delle cellule in vitro proposta o oltre.
- Generalmente, le cellule di produzione sono ottenute dall'espansione del WCB; l'MCB potrebbe anche essere utilizzato per preparare le cellule di produzione.
- Le cellule al limite dell'età dovrebbero essere valutate per quei virus endogeni che potrebbero non essere stati rilevati nell'MCB e nel WCB.
- L'esecuzione di test idonei (ad esempio, in vitro e in vivo) almeno una volta su cellule al limite dell'età delle cellule in vitro utilizzate per la produzione fornirebbe ulteriore garanzia che il processo di produzione non è soggetto a contaminazione da virus avventizio.
- **Se vengono rilevati virus avventizi a questo livello, il processo deve essere attentamente controllato per determinare la causa della contaminazione e completamente ridisegnato se necessario.**

# Prodotti biotecnologici (ICH Q5A)

## Saggi di identificazione virali raccomandati

- Numerosi saggi possono essere utilizzati per il rilevamento di virus endogeni e avventizi.
- Poiché le tecniche più appropriate possono cambiare con il progresso scientifico, le proposte alternative, se accompagnate da dati di supporto adeguati, possono essere accettabili.
- I produttori sono incoraggiati a discutere queste alternative con le autorità di regolamentazione. Altri test possono essere necessari a seconda del caso specifico.
- Le analisi dovrebbero includere controlli appropriati per garantire un'adeguata sensibilità e specificità.
- Ogni volta che è possibile prevedere una probabilità relativamente elevata di presenza di un virus specifico dalla specie di origine del substrato cellulare, possono essere necessari test e / o approcci specifici.

# Prodotti biotecnologici (ICH Q5A)



## Saggi di identificazione virali raccomandati

- Se la linea cellulare utilizzata per la produzione è di origine non umana, devono essere eseguiti test aggiuntivi per virus umani, come quelli che causano malattie da immunodeficienza ed epatite, a meno che non sia diversamente giustificato.
- La reazione a catena della polimerasi (PCR) può essere appropriata per il rilevamento di sequenze di questi virus umani e di altri virus specifici.

# Prodotti biotecnologici (ICH Q5A)



## Saggi di identificazione virali raccomandati

### 1. Test per retrovirus

- Per il MCB e per le cellule coltivate fino a oltre il limite di età delle cellule in vitro utilizzate per la produzione, devono essere eseguiti test per i retrovirus, compresi i test di infettività in colture cellulari sensibili e studi di microscopia elettronica (EM).
- Se non viene rilevata infettività e non sono state osservate particelle retrovirali o simili ai retrovirus, è necessario eseguire la trascrittasi inversa (RT) o altri test appropriati per rilevare i retrovirus che potrebbero essere non infettivi.
- Gli studi di induzione non sono ritenuti utili.

# Prodotti biotecnologici (ICH Q5A)



## Saggi di identificazione virali raccomandati

### 2. Saggi in vitro

- I test in vitro vengono effettuati mediante l'inoculazione di un test in varie colture cellulari indicatrici suscettibili, in grado di rilevare un'ampia gamma di virus umani e animali.
- La scelta delle cellule utilizzate nel test è governata dalla specie di origine della banca cellulare da testare, ma dovrebbe includere una linea cellulare di primati e non umana suscettibile di virus umani.
- La natura del dosaggio e il campione da testare sono regolati dal tipo di virus che potrebbe eventualmente essere presente in base all'origine o alla manipolazione delle cellule.

# Prodotti biotecnologici (ICH Q5A)

## Saggi di identificazione virali raccomandati

### 3. Saggi in vivo

- Un test di prova deve essere inoculato in animali, compresi topi da latte e adulti, e in uova embrionate per rivelare virus che non possono crescere nelle colture cellulari.
- Ulteriori specie animali possono essere utilizzate a seconda della natura e della fonte delle linee cellulari testate.
- Lo stato di salute degli animali dovrebbe essere monitorata e qualsiasi anomalia dovrebbe essere studiata per stabilire la causa della malattia.



# Prodotti biotecnologici (ICH Q5A)



## Saggi di identificazione virali raccomandati

### 4. Test per la produzione di anticorpi

- Virus specifici per specie presenti nelle linee cellulari di roditori possono essere rilevati inoculando un test in animali privi di virus ed esaminando il livello di anticorpi sierici o l'attività enzimatica dopo un periodo specificato.

Esempi di tali test sono il test di produzione di anticorpi murini (MAP), test di produzione di anticorpi di ratto (RAP) e il test di produzione di anticorpi di criceto (HAP).

# Prodotti biotecnologici (ICH Q5A)

## Accettabilità delle linee cellulari

- Si può assumere che alcune linee cellulari utilizzate per la fabbricazione del prodotto conteranno retrovirus endogeni, altri virus o sequenze virali.
- In tali circostanze, l'accettabilità delle linee cellulari contenenti virus diversi dai retrovirus endogeni sarà considerata su base individuale dalle autorità di regolamentazione, tenendo conto di un'analisi **rischio/beneficio** sulla natura della contaminazione virale, basata su:
  - beneficio del prodotto rispetto all'uso clinico previsto;
  - potenziale per infettare l'uomo o per causare la malattia negli esseri umani;
  - processo di purificazione del prodotto (ad es. dati sulla valutazione della clearance virale) e l'estensione dei test sui virus condotti sulla maggior parte dei prodotti purificati.

# Prodotti biotecnologici (ICH Q5A)

## Test per virus in bulk non processati

- La massa non trasformata costituisce uno o più raggruppamenti di cellule e terreni di coltura. Quando le celle non sono facilmente accessibili (ad esempio fibre cave o sistemi simili), la massa non trasformata può essere costituita da fluidi raccolti nel fermentatore.
- Un campione rappresentativo della massa non trasformata, rimosso dal reattore di produzione prima di un'ulteriore lavorazione, rappresenta uno dei livelli più adatti in cui è possibile determinare la possibilità di contaminazione avventizia del virus con un'alta probabilità di rilevabilità.
- La prova appropriata per i virus deve essere eseguita a livello di massa non lavorata a meno che il test del virus non sia reso più sensibile da un'elaborazione parziale iniziale (ad esempio, la massa non lavorata può essere tossica nelle colture di cellule di prova, mentre la massa parzialmente lavorata può non essere tossica).

# Prodotti biotecnologici (ICH Q5A)

## Test per virus in bulk non processati

- In alcuni casi può essere più appropriato testare una miscela composta da cellule intatte e distrutte e i loro supernatanti di coltura cellulare rimossi dal reattore di produzione prima di un'ulteriore elaborazione.
- I dati provenienti da almeno 3 lotti non trasformati, campionati a caso su scala pilota o su scala commerciale devono essere presentati come parte della domanda per la commercializzazione.
- Si raccomanda ai produttori di sviluppare programmi per la valutazione in corso dei virus avventizi nei lotti di produzione.
- In generale, il materiale raccolto in cui è stato rilevato il virus avventizio non deve essere utilizzato per fabbricare il prodotto.
- Se vengono rilevati virus avventizi a questo livello, il processo deve essere attentamente controllato per determinare la causa della contaminazione e le azioni appropriate intraprese.

# Prodotti biotecnologici (ICH Q5A)



## Test per virus in bulk non processati

L'ambito, l'estensione e la frequenza dei test sui virus della massa non lavorata dovrebbero essere determinati prendendo in considerazione diversi punti tra cui:

- la natura delle linee cellulari utilizzate per produrre i prodotti desiderati;
- i risultati e l'estensione dei test dei virus eseguiti durante la qualifica delle linee cellulari;
- il metodo di coltivazione;
- le fonti di materie prime e i risultati degli studi di clearance virale.
- I test di screening in vitro, che utilizzano una o più linee cellulari, sono generalmente impiegati per testare la massa non processata. Se appropriato, è possibile utilizzare un test PCR o altri metodi idonei.