



I farmaci biologici: dallo sviluppo alla clinica

Mauro A. Ninci

Medical Affairs Director – Genzyme

16 settembre 2014

Erik Familial Hypercholesterolemia USA

genzyme
A SANOFI COMPANY

Definizione di farmaco biologico

- Prodotto medicinale la cui sostanza attiva è una sostanza “biologica”.
- Una sostanza biologica è una sostanza
 - prodotta o estratta da una fonte biologica
 - che necessita per la propria caratterizzazione e per la determinazione qualitativa una combinazione di test fisico-chimici e biologici associati ad uno specifico **processo produttivo** ed al suo controllo.

Prodotti biologici: un insieme ampio ed eterogeneo

Origine biologica:

- Estrattiva
 - Animale: tessuti e fluidi
 - Umana: sangue, cellule, urine, tessuti.
- Substrati cellulari (cellule procariotiche ed eucariotiche)
 - Colture: batteri, virus, cellule
 - Espressione di sistemi produttivi:
 - Induzione della secrezione
 - Manipolazione genetica per l'espressione di geni esogeni -> **prodotti biotecnologici**
- Animali transgenici
- Piante transgeniche

Prodotti biologici: un insieme ampio ed eterogeneo

Prodotti differenti:

- Macromolecole
 - Proteine o polisaccaridi estratti da fluidi o tessuti di origine animale od umana
 - Derivati plasmatici
 - Derivati urinari (FSH, HCG....)
 - Derivati tissutali (eparina)
 - Proteine ricombinanti, ivi inclusi gli anticorpi monoclonali
- Vaccini (vivi o inattivati)

Prodotti biotecnologici

- Fattori della coagulazione
 - tPA, proteina C attivata, FVIIa, FVIII, FIX, ...
- Citochine e fattori di crescita
 - EPO, IFN- α , IFN- β 1, PEG-IFN- α , IL-1, G-CSF, ...
- Ormoni
 - insulina, somatotropina, FSH, hCG, LH, TSH, calcitonina, PTH, ...
- Vaccini
 - Epatite B, Papilloma virus, ...
- Enzimi
 - β -glucocerebrosidasi, α -galattosidasi
- Anticorpi monoclonali
 - Immunosoppressori, morbo di Crohn
 - Tumore mammario, linfoma non-Hodgkin, LLC
 - Coronaropatie
 - Asma e allergie
 - Diagnostici
 - Sclerosi multipla
 - ...

La sfida dei prodotti biologici

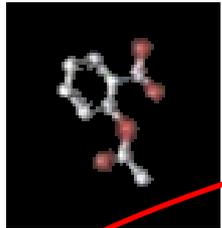
- Entità molecolari complesse
- La produzione necessita di
 - sistemi di espressione e
 - sistemi di produzione e purificazione
 - Metodi analitici per il controllo di qualità espressamente disegnati
- La valutazione del solo prodotto finale non può garantire qualità e sicurezza → influenza del processo

Triplice sfida

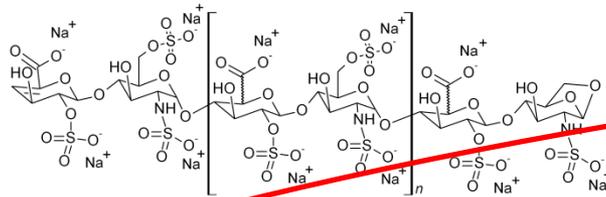
- La molecola e la sua complessità
- Il processo (sistema vivente)
- Il metodo d'analisi

COMPLESSITA' DI STRUTTURA

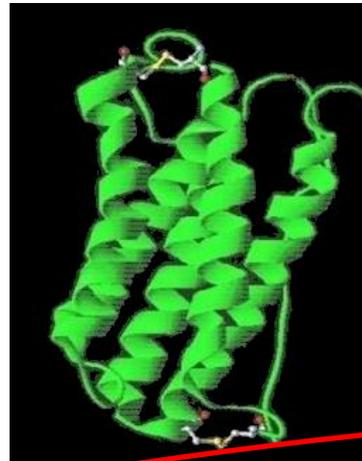
Complessità dei prodotti e massa molecolare



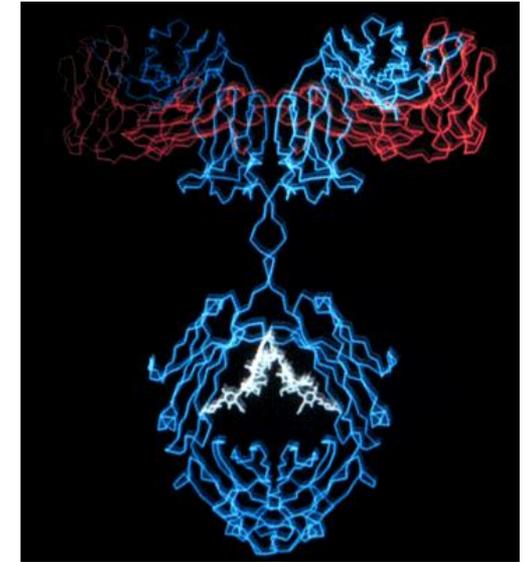
Aspirina
PM: 180 Da



Eparina a basso PM
PM: 4.5 KDa



Interferone alfa
165 AA, PM: 19.6 KDa



Mab (IgG)
~660AA, PM: ~150 Kda

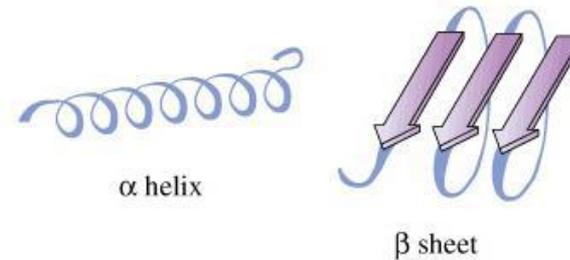
MASSA MOLECOLARE

Complessità dei prodotti e struttura (proteine)

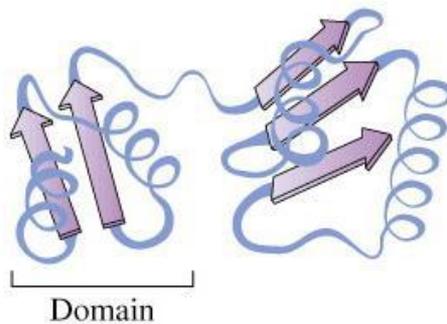
(a) Primary structure

–Ala–Glu–Val–Thr–Asp–Pro–Gly–

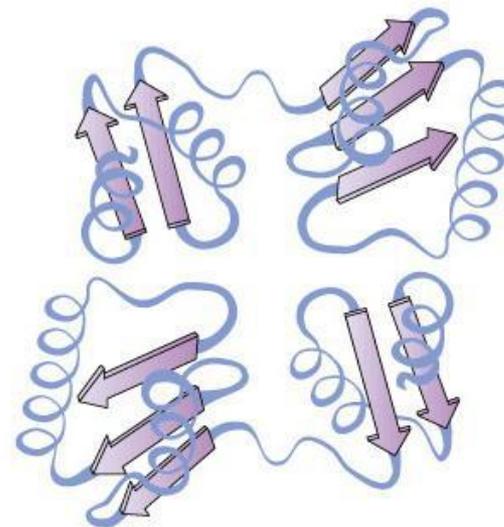
(b) Secondary structure



(c) Tertiary structure



(d) Quaternary structure

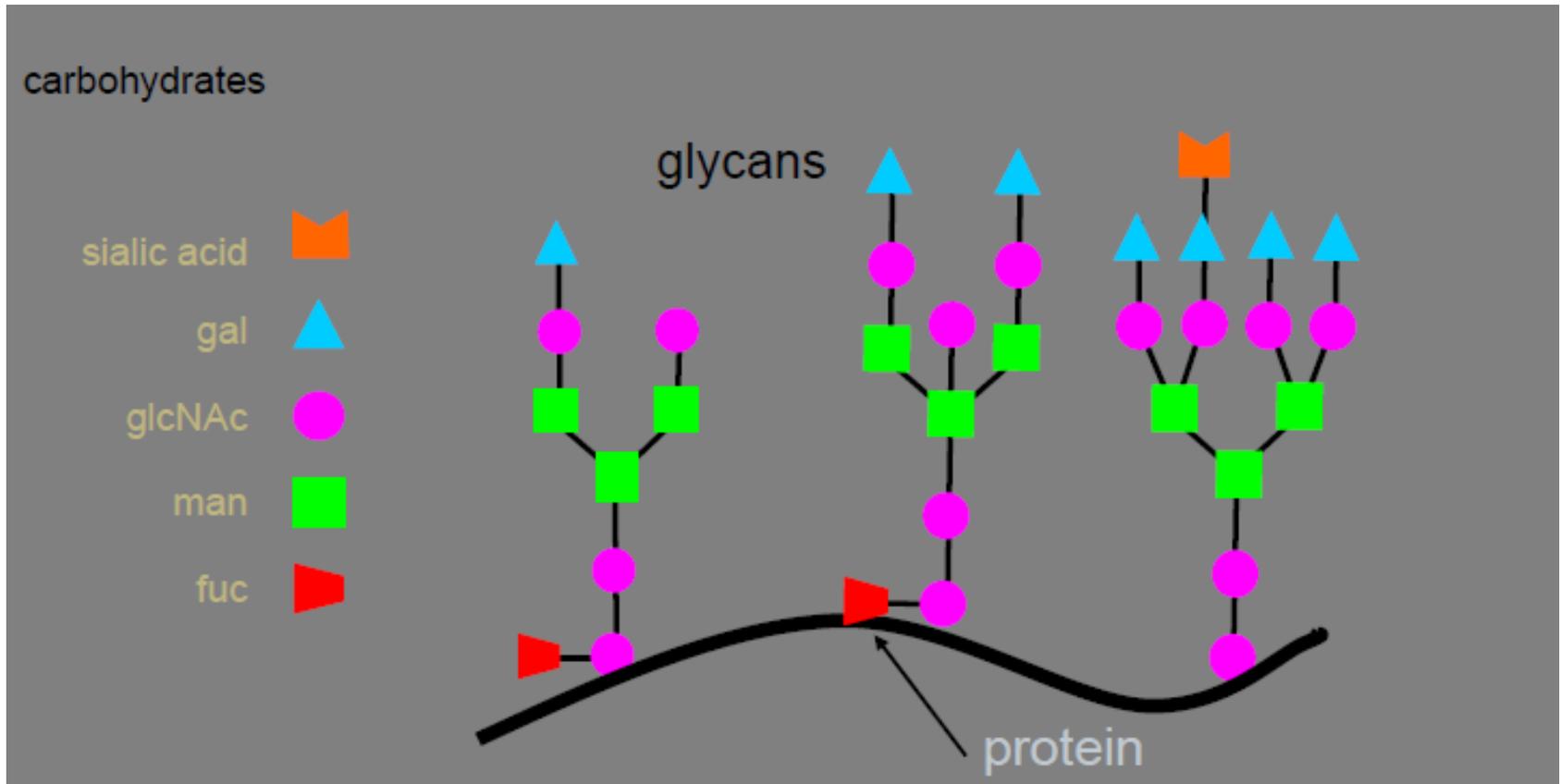


Horton HR, et al. Principles of Biochemistry. 3^a ed. 2002.

Modificazioni post-traduzionali

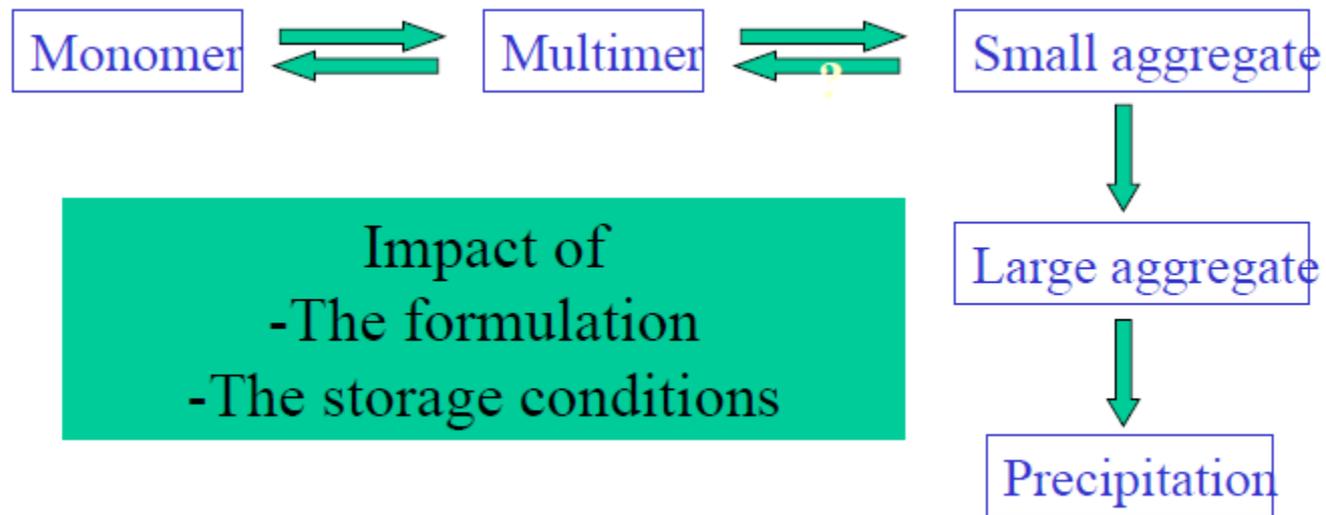
- Dopo la traduzione una proteina viene ulteriormente modificata dalla cellula:
 - Glicosilazione
 - Solfatazione, amidazione, ecc.
 - Necessario uno specifico setting enzimatico
 - Assente nelle cellule procariotiche
 - Specifico per ciascuna linea cellulare eucariotica
 - Non (necessariamente) sotto il controllo del gene interessato
 - Dipendente da linea cellulare di produzione e **condizioni di coltura**
- Anche la glicosilazione è un fenomeno complesso: esistono varie forme di glicosilazione
 - Pattern glucidico, micro-eterogeneità

Glicosilazione → strutture glucidiche complesse



Manipolazioni post-sintetiche → mannosio ed ERT

Modificazioni spontanee: instabilità e aggregazione



COMPLESSITA' DI PROCESSO

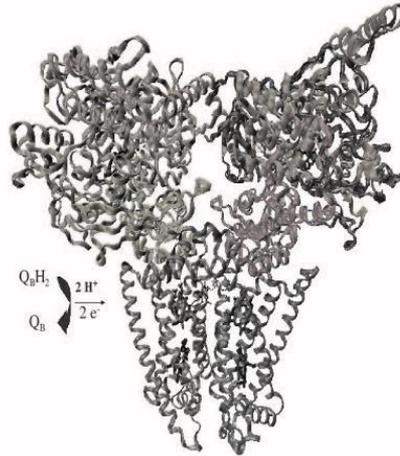
Biosimilare: diverso produttore, differente processo produttivo



Il paradigma «un processo – un prodotto»

Fluttuazioni nel processo produttivo (es, pH, T°, terreni di coltura)

Variazioni del processo produttivo



Microeterogeneità del lotto

Variabilità del lotto

Inconsistenza del lotto

«Deriva» da micromutazioni

IL PROCESSO PRODUTTIVO DETERMINA IL PROFILO DI PRODOTTO

I prodotti biologici sono **unici**

I prodotti biologici sono **ben altro che il principio attivo**

Piccoli cambiamenti possono avere un **grande impatto** su Q / S / E

COMPLESSITA' DI ANALISI

Caratterizzazione: struttura e proprietà chimico-fisiche

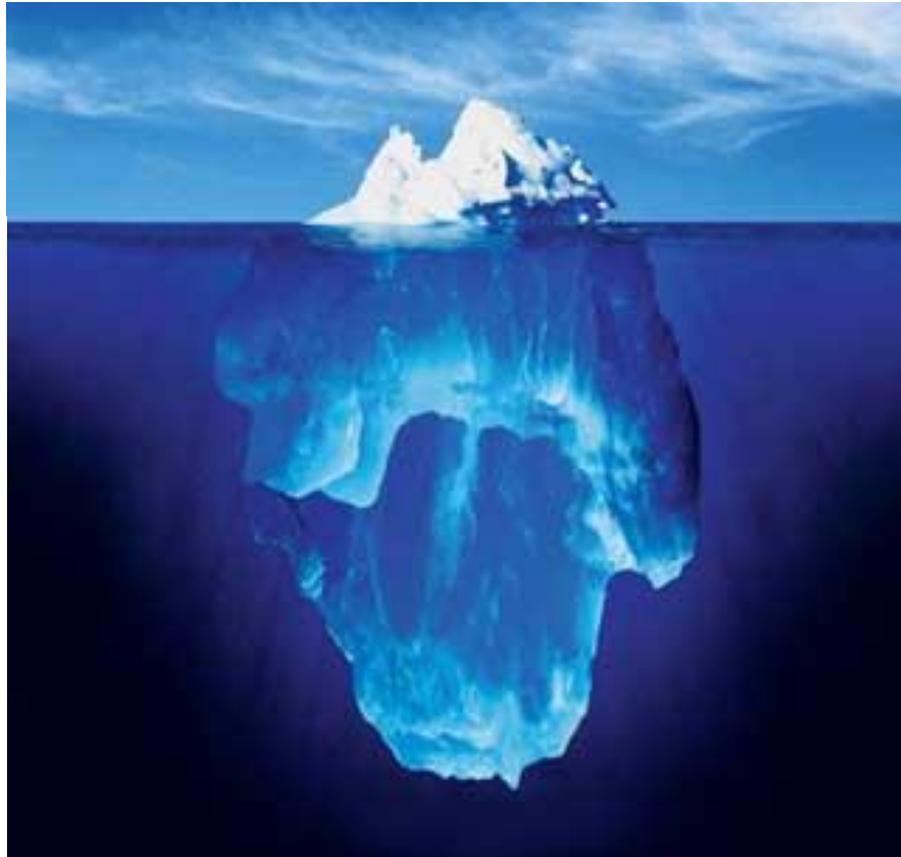
- Strutture molecolari complesse con differenti attributi qualitativi da saggiare:
 - Identità
 - Purezza / contaminanti
 - Varianti e contaminanti
 - Conformazione / aggregazione
 - Attività biologica
- Un ampio range di strumenti analitici a disposizione:
 - Assorbimento UV
 - Dicroismo circolare in spettroscopia
 - Analisi all'IR
 - Spettroscopia in fluorescenza
 - Spettroscopia in RMN
 - Approcci calorimetrici
 - Determinazioni immunochimiche: ELISA; immunoprecipitazione; biosensori
 - Attività biologica: in linee cellulari o animali
 - Tecniche cromatografiche (HPLC)
 - Tecniche elettroforetiche
 - Frazionamento «field flow»
 - Ultracentrifugazione
 - Microscopia elettronica
 - Tecniche a raggi X
 - Spettrometria di massa

Test analitici ed attributi qualitativi

Method	Size	Charge	1° struct.	2°/3° struct.	Purity	Potency
<u>HPLC</u>						
Size exclusion	+++	-	-	++	++	-
Ion exchange	-	++++	+++	-	+++	-
Reverse phase	+++	+/-	+++	++	+++	-
<u>Electrophoresis</u>						
SDS-Page	+++	-	+++	-	+++	-
IEF	-	+++	+	++	+++	+
W-Blot	+++	-	++	+++	+++	-
<u>Assays</u>						
Immunoassays	-	-	+/-	+/-	-	++
Receptor binding	-	-	++	+++	-	++
In vivo assay	-	-	+++	++++	+/-	+++++

Profilo di qualità: cosa conosciamo dell'iceberg?

TEST DI RILASCIO
(SPECIFICHE)



OCCORRE UNA
RILEVANTE
STRATEGIA DI
CONTROLLO AD
OGNI PASSAGGIO

Il vero problema: l'immunogenicità

- Il sistema immunitario riconosce variazioni che sfuggono ai metodi analitici
- Tutte le proteine terapeutiche sono potenzialmente immunogeniche
- Predire la potenziale immunogenicità dai dati analitici non è appropriato

Il vero problema: l'immunogenicità

- L'immunogenicità dei farmaci biologici può avere serie conseguenze
 - Ab non-neutralizzanti → nessun effetto su efficacia clinica
 - Ab neutralizzanti → inibizione (fino a perdita completa) dell'effetto terapeutico
- Fattori di rischio per l'immunogenicità:
- Natura della sostanza attiva
- Precedente esposizione (effetto classe)
- Popolazione target
- Modalità/via di somministrazione
- Impurità prodotto- e processo-correlate: preparazioni “più pure” di proteine sono a minor rischio di reazioni immuni
 - Importante considerare la presenza di altre sostanze che possono svolgere un ruolo adiuvante
 - Minor immunogenicità quanto maggiore l'omologia con le proteine umane

Medicinali biologici: procedura di registrazione e contenuto del dossier

- **Procedura centralizzata**
- **Linee guida e concept papers**
 - Generali
 - Modulo specifici (aspetti peculiari della dimostrazione della biosimilarità in ambito quality, non clinico e clinico)
 - Specifici per prodotto
 - Specifici per problematica (es immunogenicità)
- Utilizzo del concetto di **esercizio di comparabilità**

Medicinali biologici: procedura di registrazione centralizzata (1)

- Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council lays down a **centralised Community procedure** for the authorisation of medicinal products, for which there is
 - a **single application**,
 - a **single evaluation**
 - and a **single authorisation**allowing direct access to the single market of the Community.
- A marketing authorisation granted under the centralised procedure is **valid for the entire Community market**, which means the medicinal product, may be put on the market in **all member states**.

http://www.emea.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/q_and_a/q_and_a_detail_000021.jsp&mid=WC0b01ac0580022711

Medicinali biologici: procedura di registrazione centralizzata (2)

Mandatory scope (Article 3(1)):

Applicants are **obliged to use the centralised procedure** for:

- **Medicinal products** developed by means of one of the following **biotechnological processes**:
 - **recombinant DNA** technology;
 - **controlled expression of genes** coding for biologically active proteins in prokaryotes and eukaryotes including transformed mammalian cells;
 - **hybridoma and monoclonal antibody** methods;
- **Similar biological ("biosimilar") medicinal products** which are developed by **one of the above biotechnological processes** also fall under the mandatory scope of the centralised procedure.

http://www.emea.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/q_and_a/q_and_a_detail_000021.jsp&mid=WC0b01ac0580022711

Medicinali biologici: procedura di registrazione centralizzata (3)

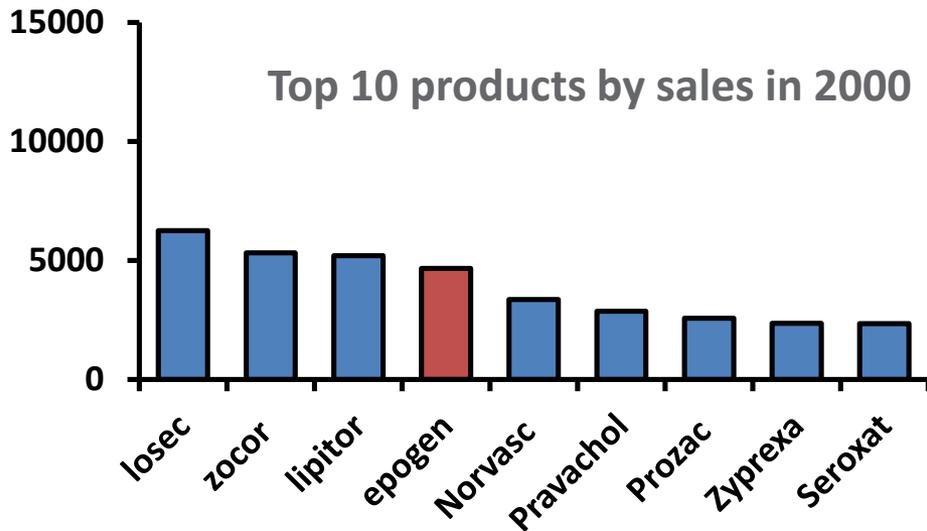
- **Advanced therapy medicinal product** as defined in Article 2 of Regulation (EC) No 1394/2007
 - **Gene therapy** medicinal products
 - **Somatic cell therapy** medicinal products
 - **Tissue engineered products**

Medicinali biologici: procedura di registrazione centralizzata (4)

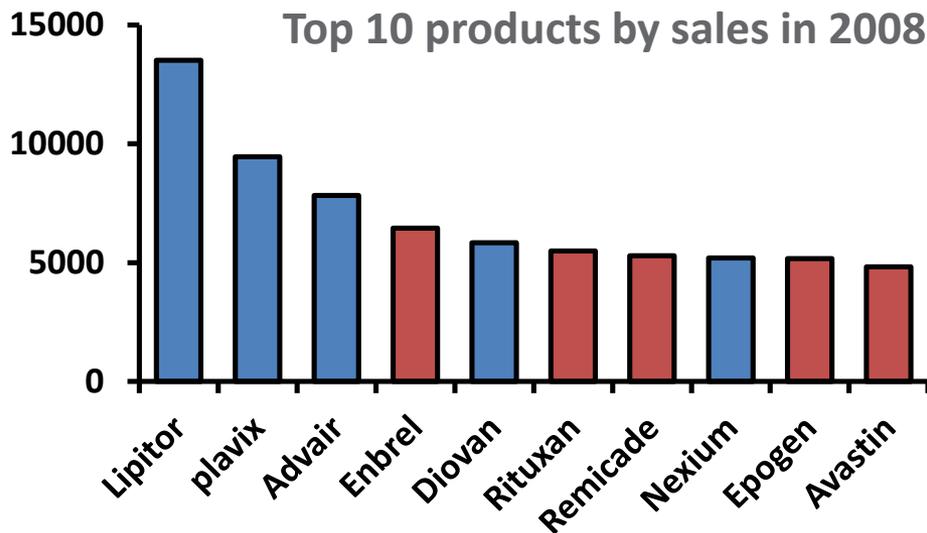
- Medicinal products for human use containing a **new active substance** for which the therapeutic indication is the treatment of any of the **following diseases**:
 - Acquired immune deficiency syndrome;
 - Cancer;
 - Neurodegenerative disorder;
 - Diabetes;
 - Auto-immune diseases and other auto-immune dysfunctions;
 - Viral diseases
- Medicinal products that are designated as **orphan medicinal products** pursuant to Regulation (EC) No 141/2000.

Un mercato in continua espansione

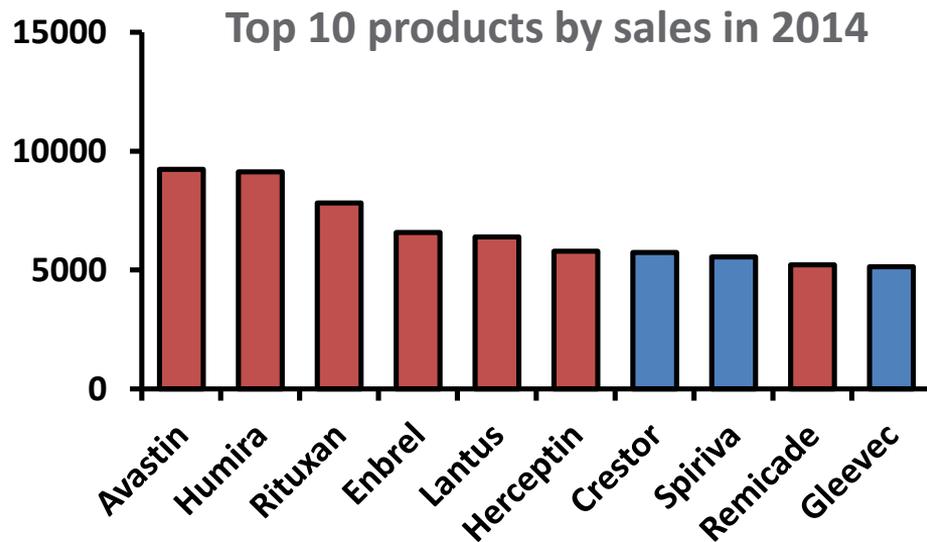
Top 10 products by sales in 2000



Top 10 products by sales in 2008



Top 10 products by sales in 2014



In conclusione

- Complessità di struttura
→ impatta sul profilo di efficacia e sicurezza
- Complessità di processo
→ impatta sul profilo di sicurezza e consistenza
- Complessità di analisi
→ difficoltà in monitoraggio e quality control del prodotto finale
→ potenziale immunogenico

GRAZIE!