

Biokérek minőségügyi kérdései - a bioanalitika szükségessége

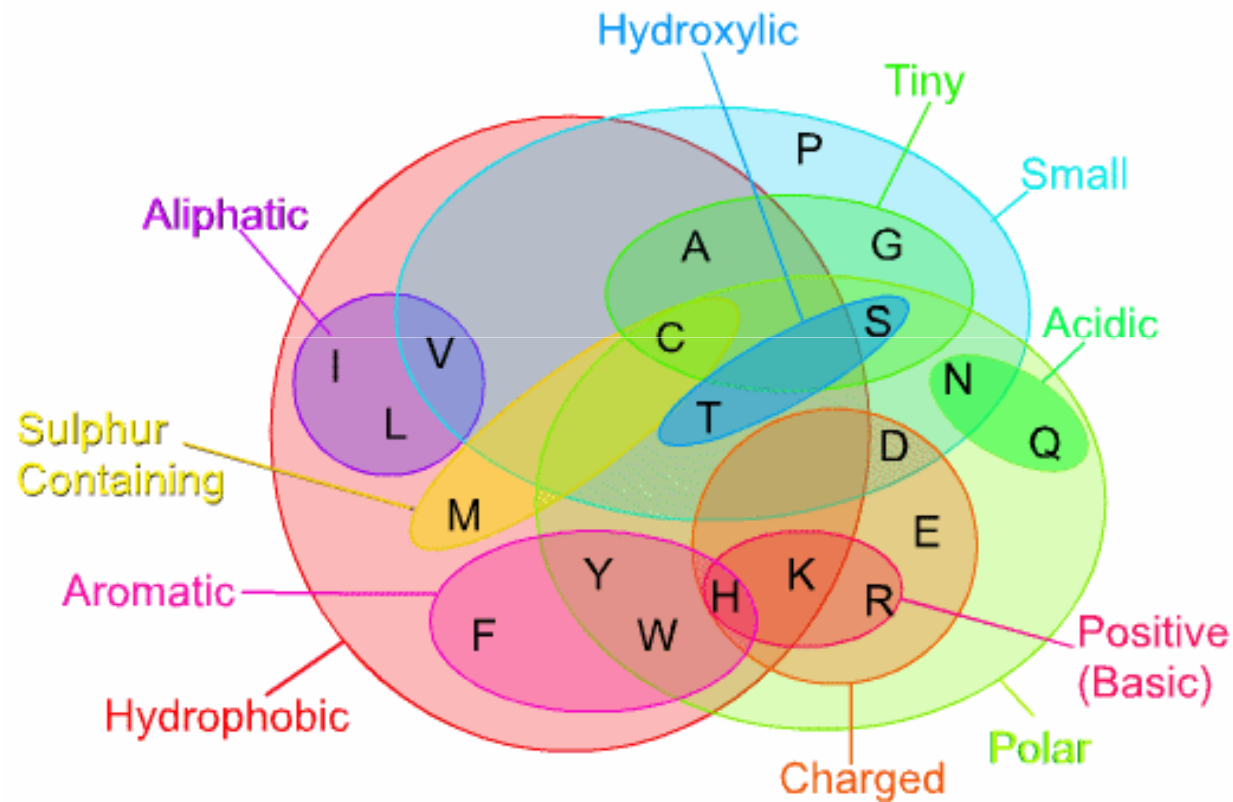
2011



Biotermekek minőségügyi kérdései bioanalitika szükségessége

- Emlékeztető
 - Alapfogalmak
 - Fehérjék szerkezete
 - Szerkezet hatás összefüggés
- A hasonlóság definíciója
 - Kismolekulák esetén
 - Minőségi előírat
 - háttérinformációk
 - Biogenerikumok esetén
 - Minőségi előírat
 - Háttérinformációk
 - Összehasonlíthatósági tanulmány-Comparability studies

Protein Characteristics: amino acid characteristics



Amino Acids

- A** alanine (ala)
- R** arginine (arg)
- N** asparagine (asn)
- D** aspartic acid (asp)
- C** cysteine (cys)
- Q** glutamine (gln)
- E** glutamic acid (glu)
- G** glycine (gly)
- H** histidine (his)
- I** isoleucine (ile)
- L** leucine (leu)
- K** lysine (lys)
- M** methionine (met)
- F** phenylalanine (phe)
- P** proline (pro)
- S** serine (ser)
- T** threonine (thr)
- W** tryptophan (trp)
- Y** tyrosine (tyr)

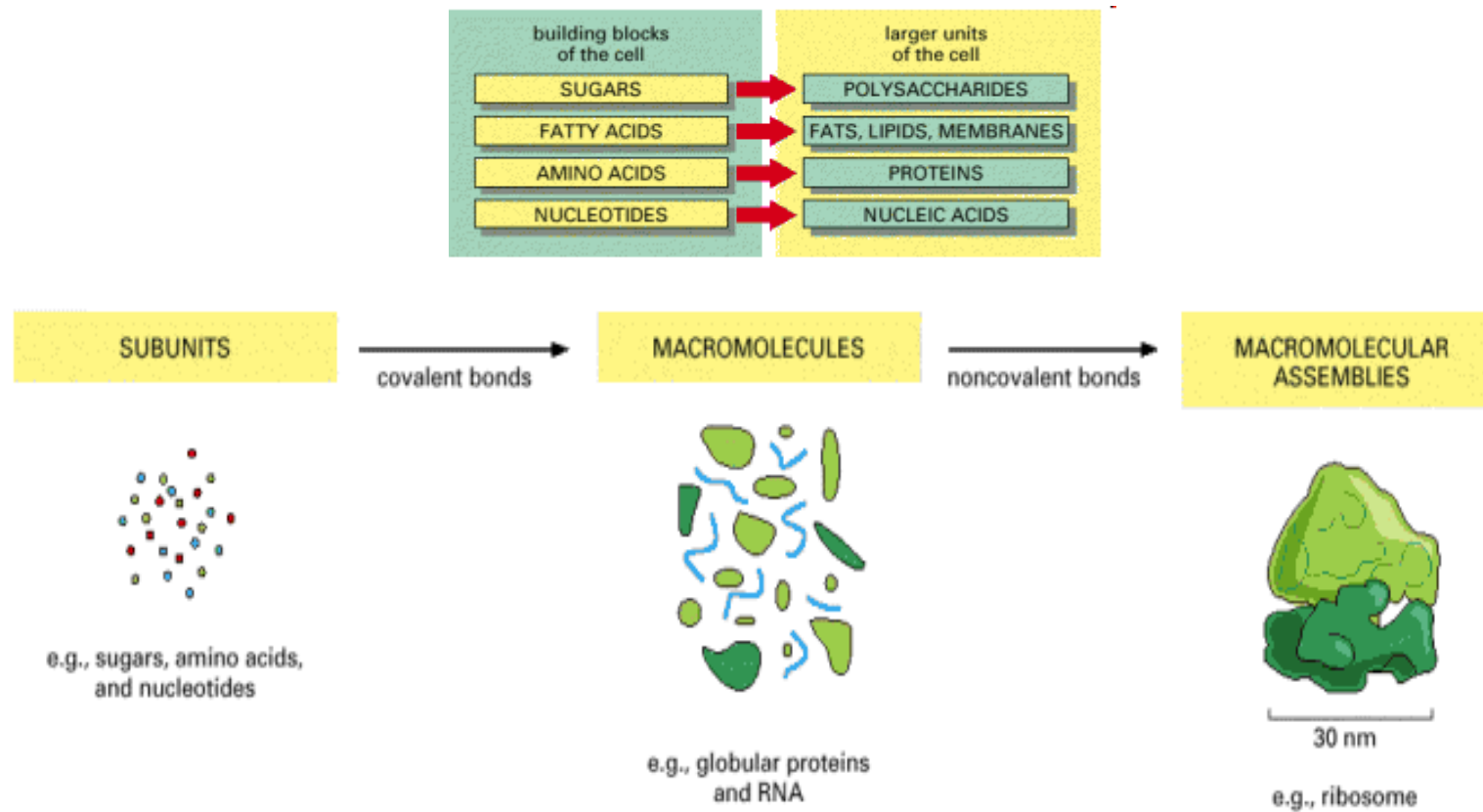
<http://www.dreamingintechcolor.com/InfoAndIdeas/AminoAcids.gif>

Protein Characteristics: amino acid characteristics

'Volume' classes		'Hydropathy' classes						
	in Å ³	Hydrophobic		Neutral	Hydrophilic			
Very large	189-228	F	W	Y				
Large	162-174	I L	M		H	K R		
Medium	138-154	V					E Q	
Small	108-117		C	P	T		D N	
Very small	60-90	A		G	S			
		Aliphatic		Sulfur	Hydroxyl	Basic	Acidic	Amide
		Nonpolar			Uncharged	Charged	Uncharged	Polar

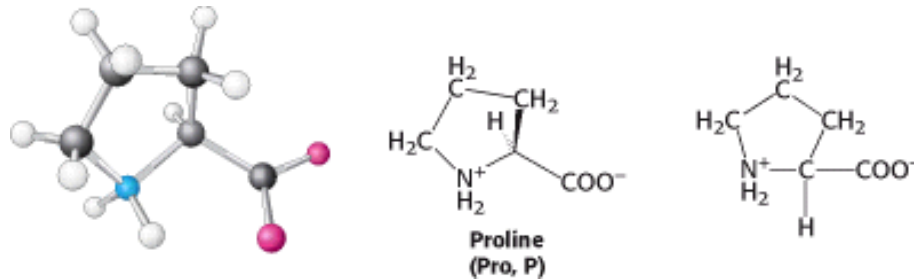
Pommié, C. et al., J. Mol. Recognit., 17, 17-32 (2004).

Chemistry of molecular assembly of macromolecules



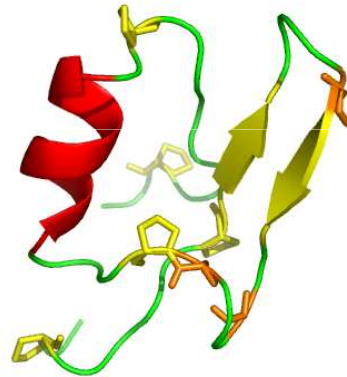
What basic chemistry is required for preparation of the building blocks and the macromolecules

Protein Characteristics:, proline

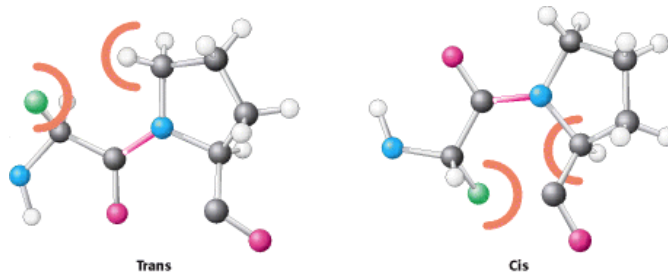


Proline is not an amino but imino acid

Non-polar, cyclic, resembles aliphatic AA

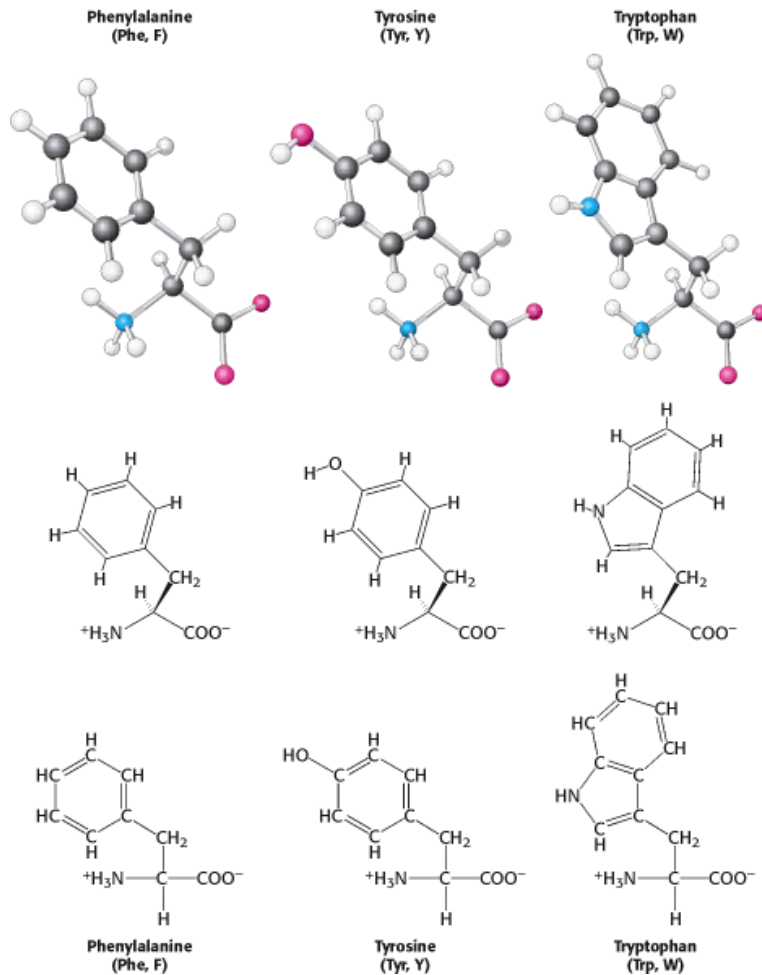


Found at the end of helices and in turns



Both cis and trans are populated and nearly isoenergetic, isomerization plays a role in protein folding

Protein Characteristics: amino acids: aromatic



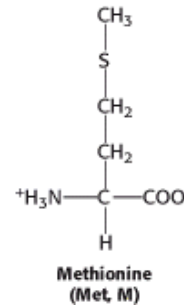
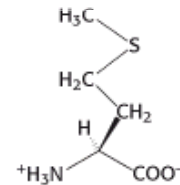
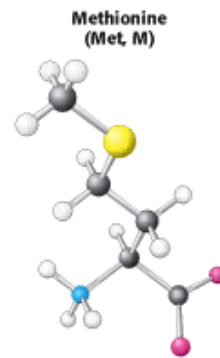
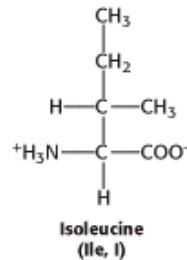
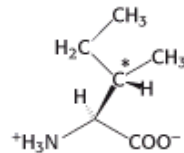
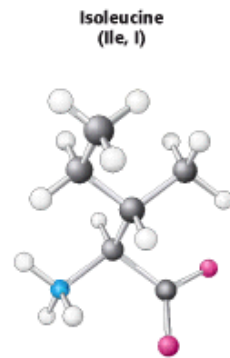
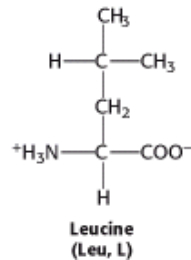
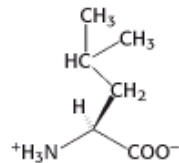
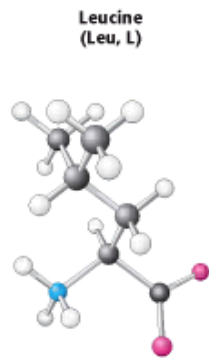
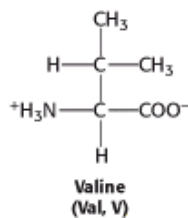
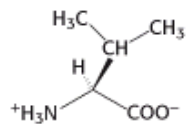
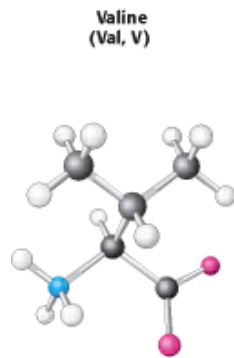
All aromatic AA are:

Non-polar

tyrosine and tryptophan have hydrophilic properties due to the presence of respectively their OH and NH groups, therefore these AA are more frequently found on the surface

More frequently found at the interior where it is part of the hydrophobic core where pi-stacking between aromatic rings is strongly stabilizing the structure

Protein Characteristics: amino acids: hydrophobic



Valine, leucine, Isoleucine

Non-polar, aliphatic branched hydrocarbon AA

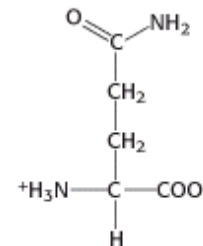
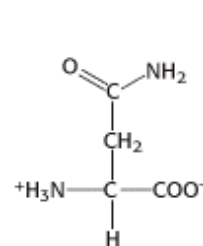
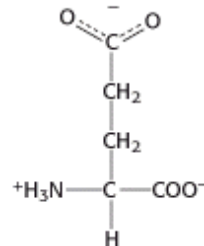
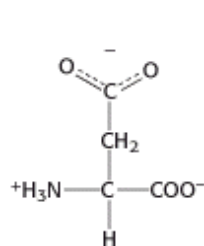
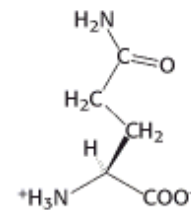
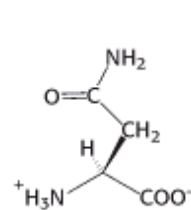
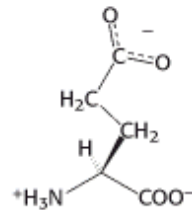
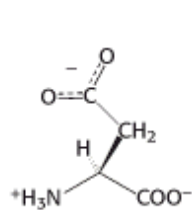
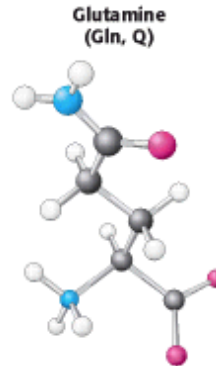
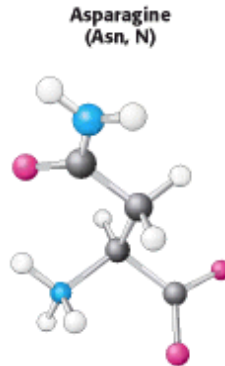
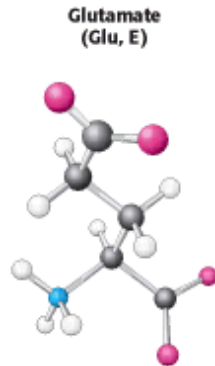
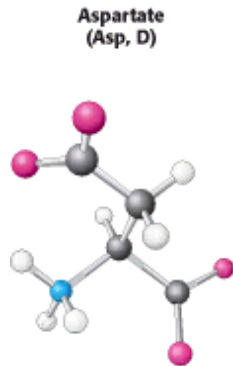
Mostly found in the hydrophobic interior of a protein

Methionine:

Sulphur containing, sulphur not highly nucleophilic: generally not part of active center, in contrast with cysteine

Sulphur sensitive to oxidation

Protein Characteristics: amino acids: polar



**Aspartate
(Asp, D)**

**Glutamate
(Glu, E)**

**Asparagine
(Asn, N)**

**Glutamine
(Gln, Q)**

Aspartic acid, glutamic acid

Polar, negatively charges

in active centers

Solubility and charge

Can form salt-bridge

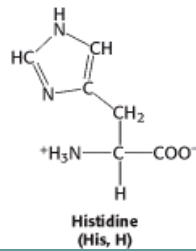
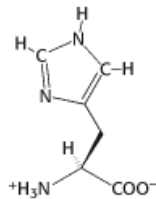
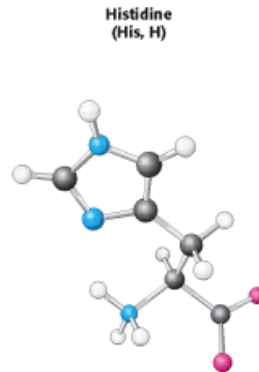
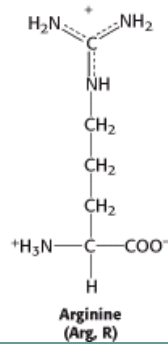
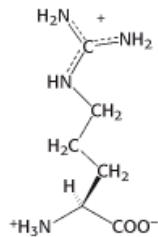
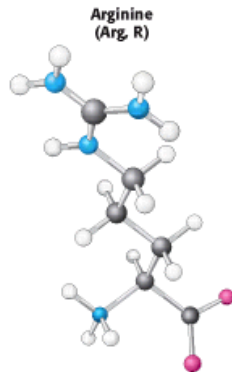
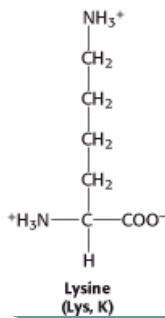
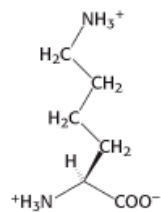
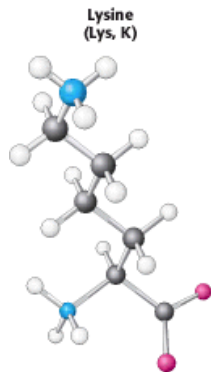
Asparagine, Glutamine

Polar, non-charged

Can accept (C=O) and donate hydrogen bonds (NH₂)

Found both interior and exterior of proteins

Protein Characteristics: amino acids: positively charged



Lysine, Arginine

Polar, positively charged

charged head groups found on the surface
aliphatic side chain is generally within the hydrophobic core of the protein

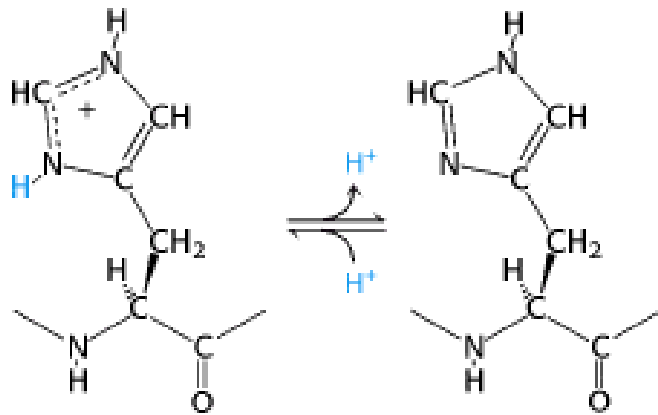
Lysyl group:

in active centers: lowering the pka through the neighbouring residues: ϵ -amino group

becomes nucleophilic

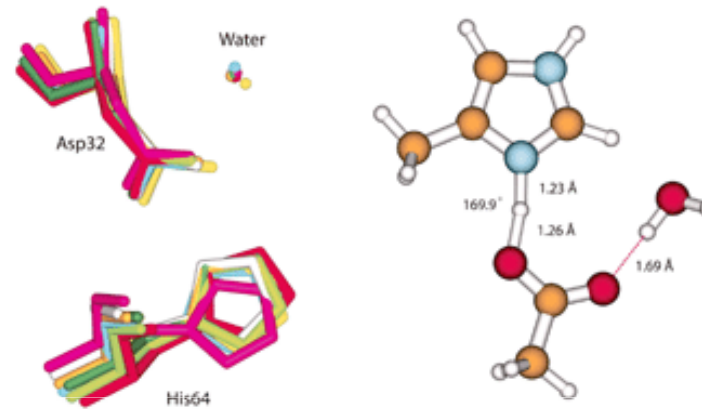
Arginine guanidino group can bind phosphate anions, frequently found in active sites of phosphorylated substrates

Protein Characteristics: amino acids: positively charged



Histidine

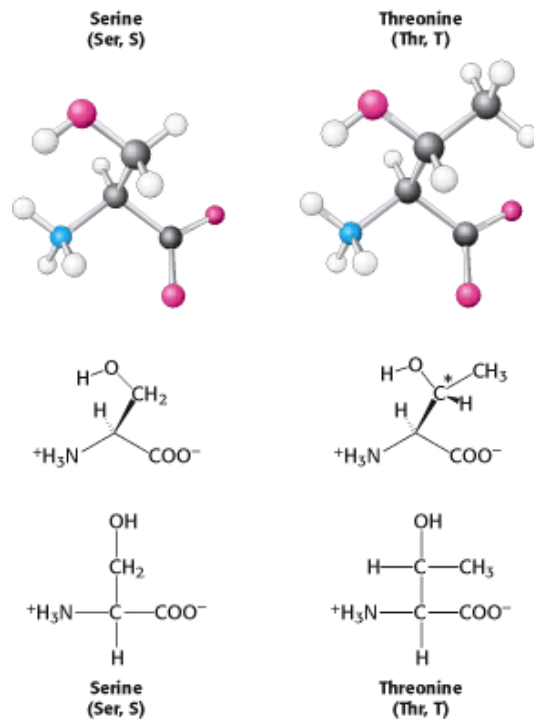
Imidazole group pka of 6,
deprotonated: imidazole nucleophilic,
protonated: imidazole is an acid



in enzymatic reaction, :
low-barrier (or short-strong) hydrogen bond in
catalysis

and can stabilize the fold of a protein:
charge, hydrophobic /aromatic, metal
binding

Protein Characteristics: amino acids: hydroxyl, cysteine

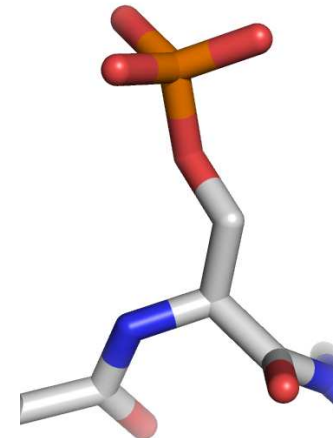


Serine, Threonine

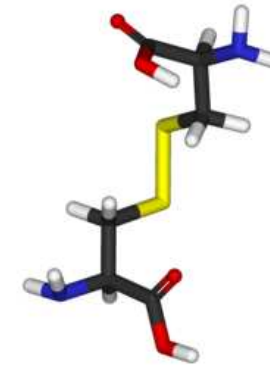
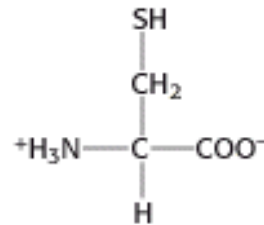
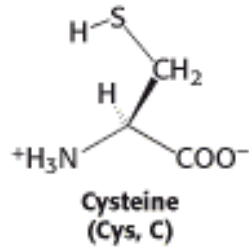
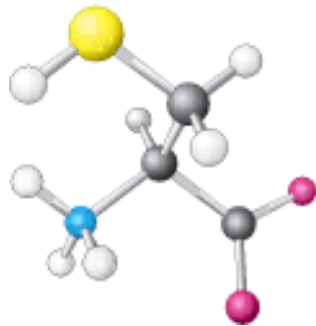
Polar uncharged, hydroxyl

Hydrophilic due to the presence of an hydroxyl group that can hydrogen bond

Can be phosphorylated on OH



Protein Characteristics: amino acids: cysteine



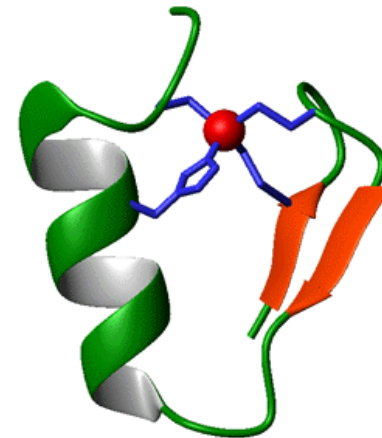
Cysteine

Polar uncharged

Contains thiol, chemical resemblance with serine (OH vs SH), functionally distinct, poor hydrogen bonding, more reactive nucleophilic reactions

Disulfide bond formation stabilize extracellular proteins

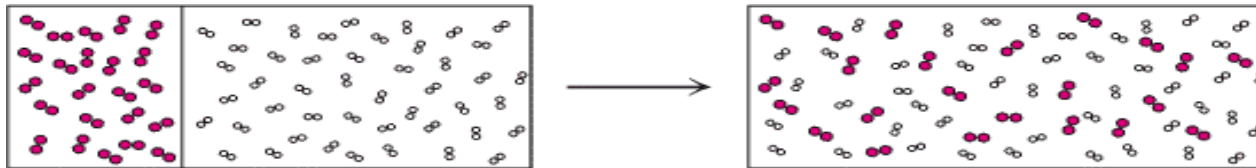
Metal binding: zinc fingers: tetrahedral orientation



Protein Characteristics: thermodynamics

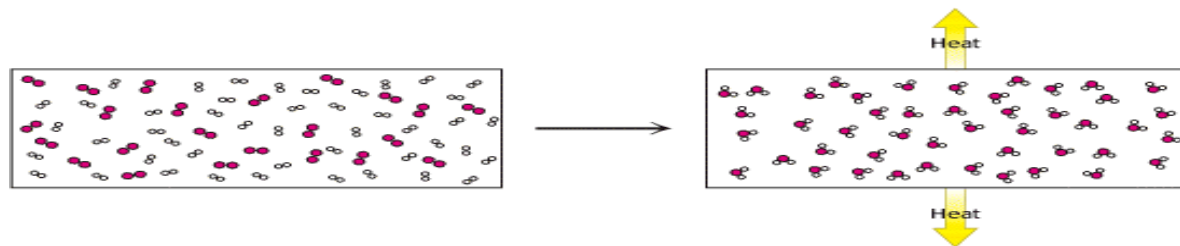
1st Law of Thermodynamics: total energy of a system and its surroundings is constant

2nd Law of Thermodynamics: the total entropy of a system and its surroundings always increases for a spontaneous process.



Contradict with biological systems = decrease in entropy

formation of such ordered structures only if the entropy of other parts of the universe is increased by an equal or greater amount

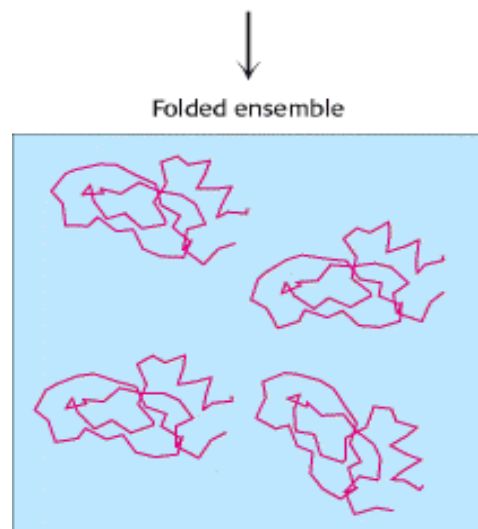


Protein Folding Can Be Understood in Terms of Free-Energy Changes



Entropy protein high

How is this possible:
*free-energy change
must be negative for
a reaction to be
spontaneous*

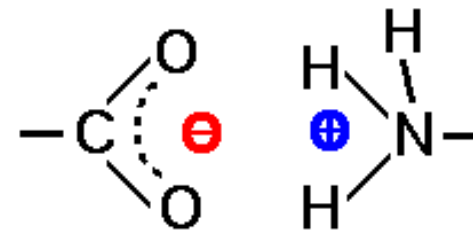


Entropy protein low

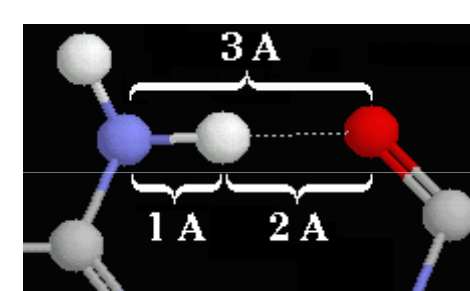
H₂O: non-polar residues can not interact with water: through folding these non-polar residues are excluded from the water thereby the entropy of the water is increased

Reversible interactions of biomolecules are mediated by three kinds of non covalent bonds

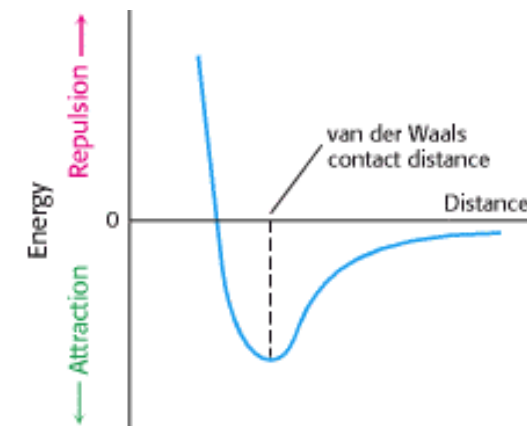
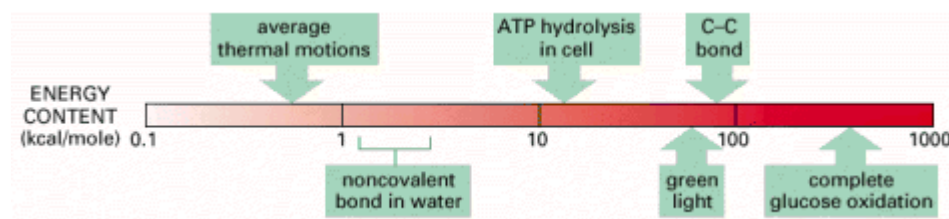
electrostatic interactions



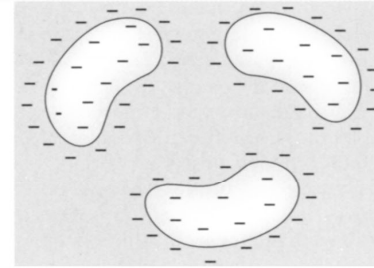
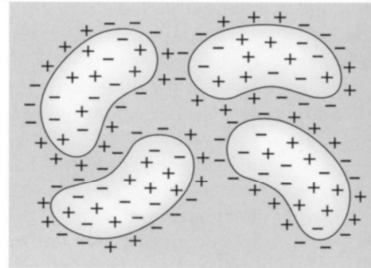
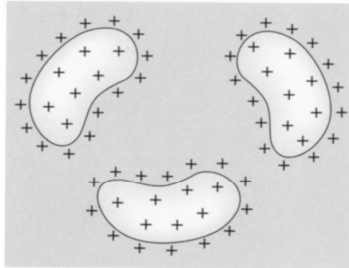
hydrogen bonds



Van der Waals interactions



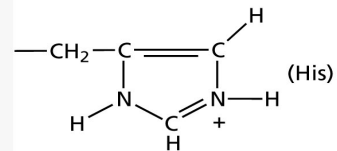
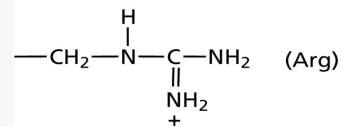
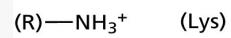
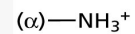
Why Protein stability influenced by pH



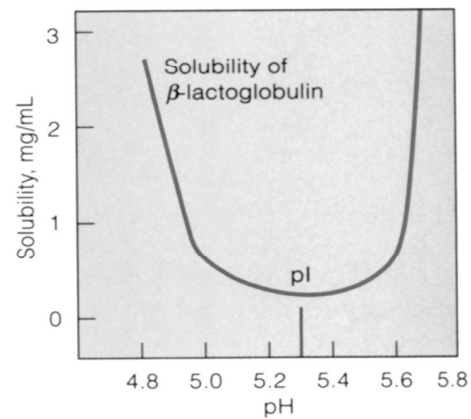
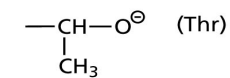
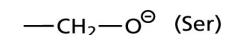
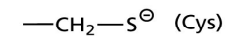
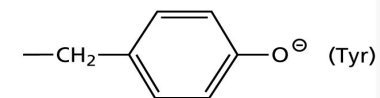
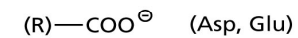
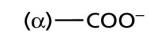
—————→

increase in pH

charged groups



charged groups



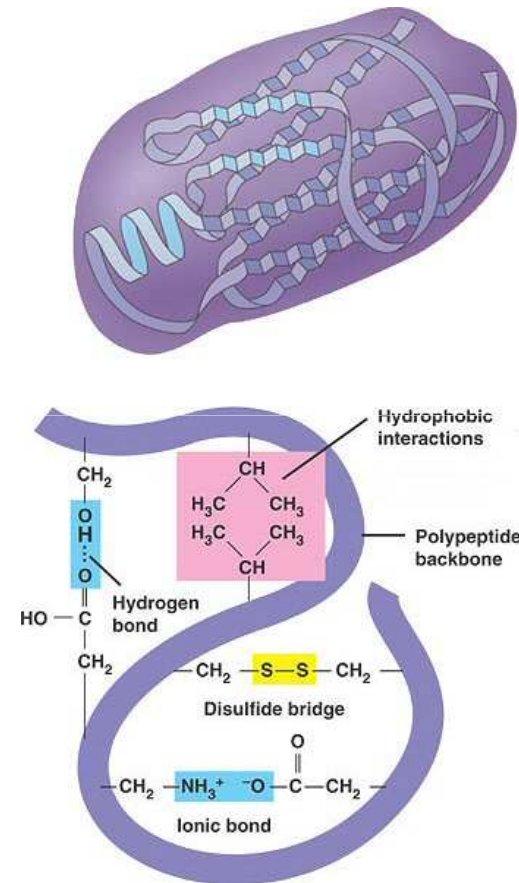
Protein characteristics summary

how protein structure and stability is influenced by

- Composition: amino acid, pH dependence
- Entropy, enthalpy
- Water
- Interactions
- Structure: primary, secondary, tertiary, quaternary

Characteristics of proteins explained on the basis of the structure and interactions that stabilize the structure:

1. Temperature
2. pH
3. Reductant
4. Detergents
6. Organic solvent
2. Salt



Meghatározások

Biotechnológia, Bioszimiláris

Bioszimiláris- nincs pontos meghatározás

IDENTICAL=Azonos

- A termék tulajdonságai teljesen azonosak az originátoréval
(Komplex anyagok esetén ezt nehéz igazolni)

SIMILAR=hasonló

- A termék tulajdonságai megfelelően hasonlóak az originátoréhoz ahhoz, hogy ugyanazt a hatást érjük el ugyanolyan biztonság mellett

Feltételezi, hogy a rendelkezésre álló eszközökkel ki tudjuk mutatni az eltérést

Megfelelően Hasonló

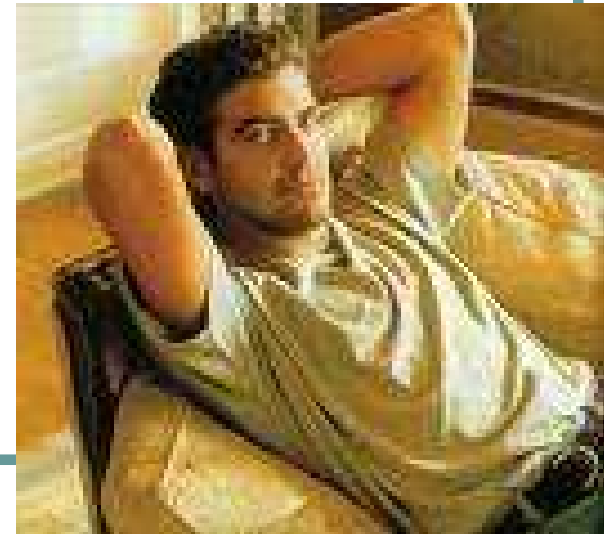
Rhesus monkey genome reveals DNA similarities with chimps and humans

Sequence of orangutan and marmoset also completed

By Caroline Arbanas

April 11, 2007 -- Scientists have decoded the genome of the rhesus macaque monkey and compared it with the genomes of humans and their closest living relatives - the chimps - revealing that the three primate species share about **93** percent of the same DNA.

Megfelelően hasonló?



Definíció híján ...teljesíthető (?) követelményrendszer

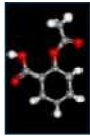
- Megfelelően hasonló legyen az originátoréhoz
- Ugyanaz az indikációja legyen
- Ugyanaz a felhasználás/adagolás módja, ugyanaz az erősség és dózis
- GMP körülmények között gyártsák
- Mi az a különbség, ami számít?
- Mi a helyzet a többszörös indikációval?
- Ha a betegnek a „prefilled syringe” megfelelőbb lenne?
- Teljesíthető

Meghatározások Comparability (összehasonlíthatóság)

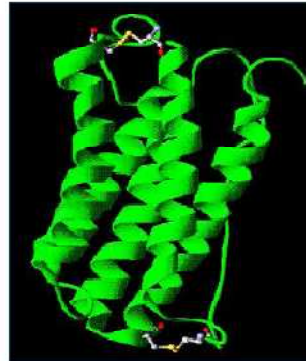
- Mi is ez?
- Mindenki csinálja Nem mindenki csinálja
 - Mikor? Bioszimiláris
 - Technológia változtatásnál
 - Analitika változásánál
 - Formuláció változásánál ...stb.
- Mit jelent? (ICH Q5E)

“The demonstration of comparability does not mean that the quality attributes of the pre-change and post-change products are identical, but that they are highly similar and that the existing knowledge is sufficiently predictive to ensure that any differences in quality attributes have no adverse impact upon the safety or efficacy of the drug product.”

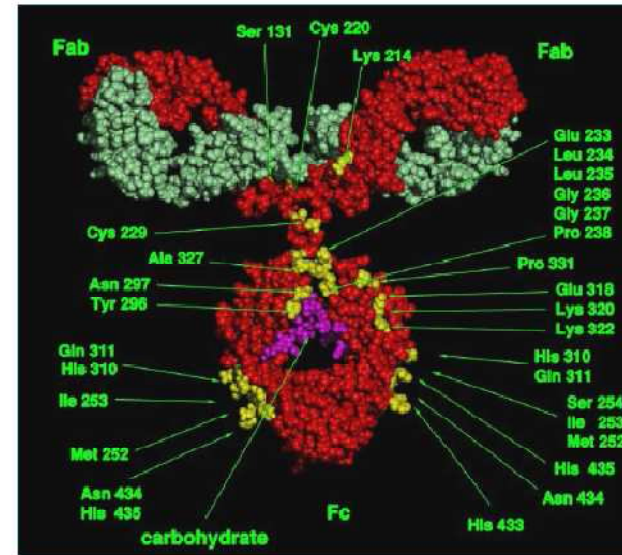
Összehasonlítás: a méret számít



Aspirin
Molecular weight
= 180 Daltons
0 amino acids



Interferon-alpha
Molecular weight
= 19,625 Daltons
~165 amino acids



Antibody (IgG)
Molecular weight
= 150,000 Daltons
~1,300 amino acids

Proteins are Different: Complexity and Molecular Size

The molecular weights (in Daltons) of some popular drug substances

Chemical Products

Glucophage®	166
Vioxx®	314
Prozac®	346
Zantac®	351
Paxil®	375
Zocor®	419
Augmentin®	420
Crixivan®	712
Taxol®	



Biotechnology Products

Neupogen®	18,800
Roferon-A®	19,625
Humatrope®	22,125
Avonex®	22,500
NeoRecormon®	30,400
Pulmozyme®	37,000
Enbrel®	75,000
Zenapax®	144,000
Rituxan®/MabThera®	145,000
Factor VIII	264,000

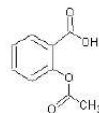


WHO Biotherapeutics meeting
April 19-20, 2007

Összehasonlítás: szerkezet - hatás

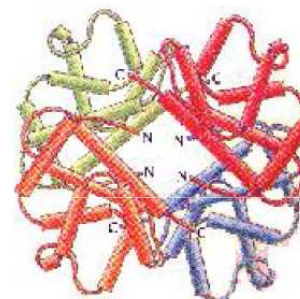
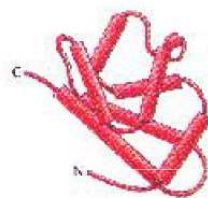
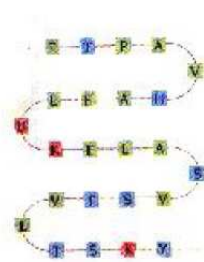
Biopharmaceuticals are structurally diverse

Chemical pharmaceutical
- Simple structure of elements



Aspirin = $C_9H_8O_4$

Biopharmaceutical
- Multiple levels of structural complexity



Primary

Amino acid sequence

Secondary

Alpha, beta sheets

Tertiary

Folding

Quaternary

Polypeptide arrangement

Hagyományos gyógyszermolekulák – a szerkezet hatás mechanizmus jól definiálható.

Terápiás fehérjék – komplex hatás egyes szerkezeti változások hatása nem jósolható (hatásosság, half-life, immunogenicitás, biztonságosság)

Összehasonlítás: Minősegbiztosítás- Engedélyeztetés



Complexity Metrics /Lot	Small Molecule	Protein
Number of Batch Records	< 10	> 250
Product Quality Tests	< 100	> 2,000
Critical Process Steps	< 100	> 5,000
Process Data Entries	< 4,000	> 60,000

R. Gamick, Genentech

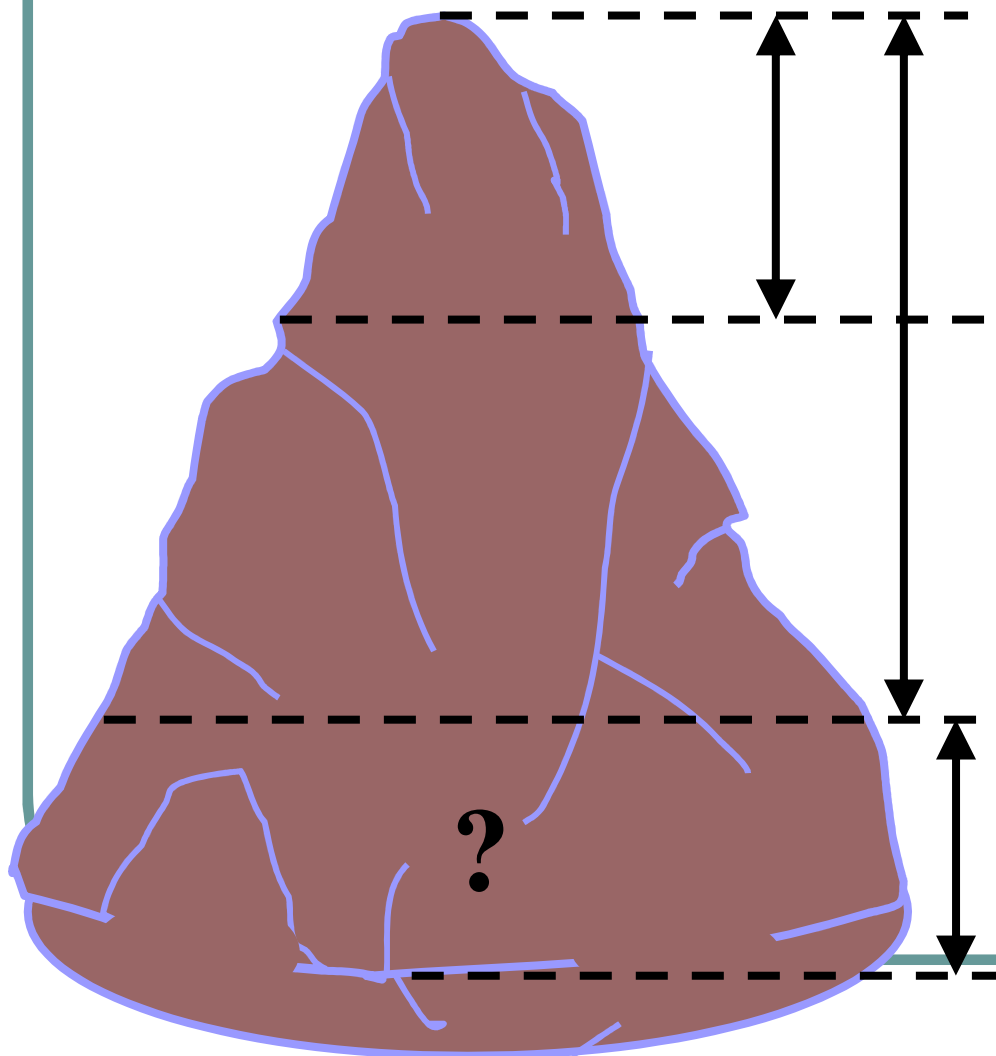
kismolekulák

Terápiás fehérjék

Sarzslapok

CMC része a dossziénak

A jéghegyből mennyit látunk?



- Felszabadítási tesztek
- Karakterizálás
- Technológia

Felszabadítási vizsgálatok

Related to FDP Batch: 9489/641523
 Amgen Breda

#1020555

Certificate of Analysis

Drug Product, Filgrastim with Sorbitol 0.96 mg/mL, 0.5 mL Deliverable Syringe
 480 µg/dose, Material 01125-EU DP Lot No 0010047147

Manufacturing date: Jan 2010
 Expiry date: Jul 2012
 Specification: PRDS-001038v9.0

Parameter	Analytical method	Specification	Result
Protein concentration	PhEur / MET-001312 (A0120)	0.86 - 1.06 mg/mL	0.95 mg/mL
Bioassay	MET-001288 (A01170)	Estimated potency = 80-125% of labeled potency	Estimated Potency = 110%
Western Blot - anti-product (Testing for identity)	MET-000611 / MET-000621 (A0229 / A0233)	Corresponds	Positive Identity
GCSF SE-HPLC (Testing for aggregates)	MET-000688 (A0316)	No peaks > 0.5% with retention times shorter than Monomer peak at approx. 10 minutes	No peaks > 0.5% with retention times shorter than monomer peak at approx. 10 minutes
pH	PhEur / MET-001215 (A0105)	3.8-4.2	3.9
Appearance ⁽⁴⁾	PhEur / MET-000286 (A0221)	Clear liquid, practically free from particles	Clear liquid, practically free from particles
Color		⁽⁴⁾ Evaluation of the presence of particles is determined in-process during the manufacturing operation and the result used to release the product into the EU. Colorless	Colorless
Sterility	PhEur / USP	Complies according to PhEur and USP	Pass
Bacterial Endotoxins	PhEur / MET-000242 (A0126)	Maximum 2.5 EU/mg	<0.068 EU/mg
Extractable Volume	PhEur / MET-000578 (A0222)	Minimum labeled claim	0.5 mL
Osmolality	PhEur	277-319 mOsm/kg	303 mOsm/KG
Polysorbate - 80	MET-000737 (A0404)	0.002-0.008% (w/v)	0.0041 % (W/V)
GCSF RP-HPLC (Testing for purity)	MET-000687 (A0374)	Main product peak ≥ 95% of total integrated area Reduced form ≤ 1% of total integrated area	99 % <1%
Subvisible Particles	PhEur / MET-001023 (A0826)	≤ 6000 particles per container ≥ 10 µm and ≤ 500 particles per container ≥ 25 µm	237 Particles 2 Particles

Created by

Name: Abdel Dherfoufi, QA Specialist Signature: [Signature] Date: 31 mar 2010

Approved By

Name: Joris de Ceuster, QP/Sr Mgr QA Signature: [Signature] Date: 31 MAR 2010

Amgen Europe B.V. Middelweg 7761 P.O. Box 1345, 4800 DH Breda, The Netherlands. Tel: 31 78 573 20 00 Fax: 31 78 573 20 01 Form-016480v2.0

PALKONYI DR. TIBEL ZSUZSANNA
 QUALIFIED PERSON (QP) HPI/ZH
 HUNGARY

[Signature]

Gyártásból eredő szennyezések, variánsok, termék eredetű rokon anyagok, bomlástermékek

Szennyezés Analitikai módszer

Szennyezés	Analitikai módszer
Protein-szerű szennyezések (gazdasejt proteinek)	SDS-PAGE, HPLC, HPCE, immunoassays (ELISA,etc)
Medium összetevők (insulin, transferrin, IgG)	SDS-PAGE, HPLC, HPCE, immunoassays (ELISA,etc)
Kémiai összetevők (antibiotikumok, indukáló ágensek)	HPLC, UV spektroszkópia
Endotoxinok	Nyúl pirogén teszt, Limulus amoebocyte lysate (LAL)
DNS	DNA dot-blot hybridisation, Polymerase Chain Reaction (PCR)
Mikrobiológiai szennyezés	Sterilitás vizsgálat
Vírus	Vírusérzékenység mérés
Mikoplazma	CFR módszer
Leachables (Protein A, gyanta, nehézfém)	HPLC, ICP, AAA etc

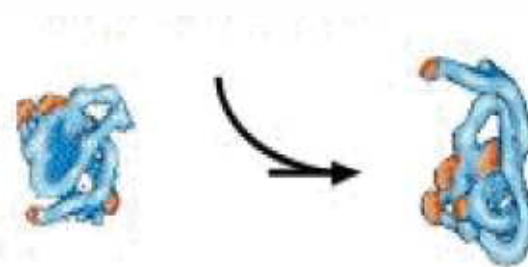
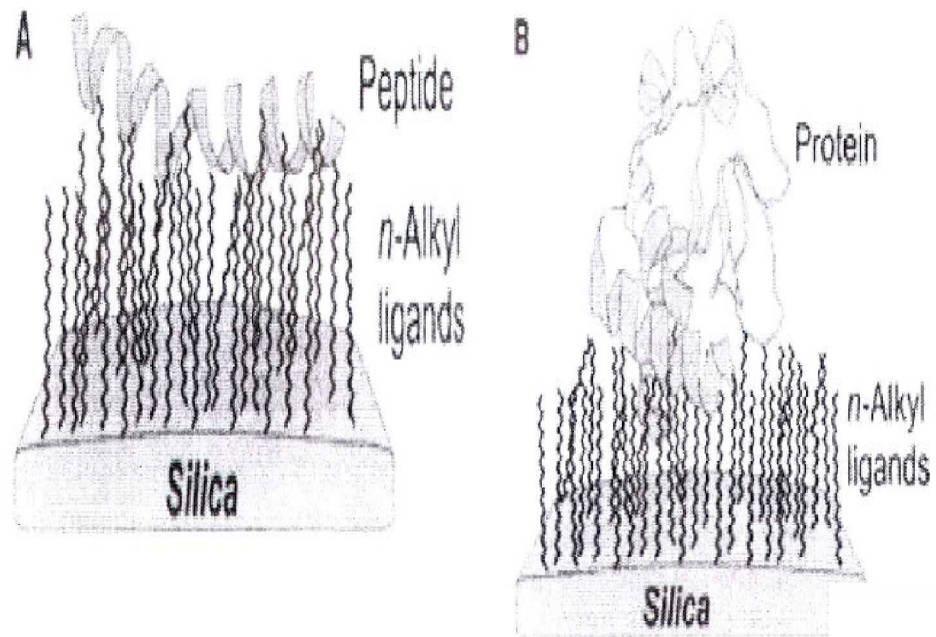
Termék eredetű szennyezések, variánsok, rokon anyagok, gyártásból eredő bomlástermékek

Proteolitikus bomlástermékek	Izoelektromos fókuszálás (IEF), HPLC, HPCE, SDS-PAGE, N terminális szekvenálás
Mutánsok és egyéb maradékok jelenléte	Tripszines vagy más enzimes bontás (gyakran MALDI/TOFL-val együtt)
Deamidált/oxidált formák	IEF, HPCE, HPLC (gyakran tömegspektrometriával kombinálva)
Nem megfelelően glikolizált/foszforilált formák	affinitás HPLC, IEF (gyakran tömegspektrometriával kombinálva)
Dimerek, aggregátumok	SEC, GPC, SDS-Page, HPCE

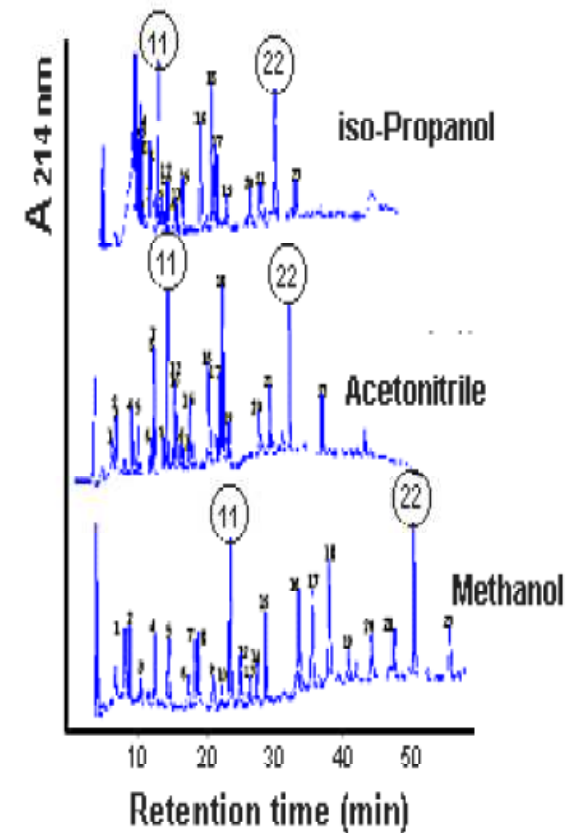
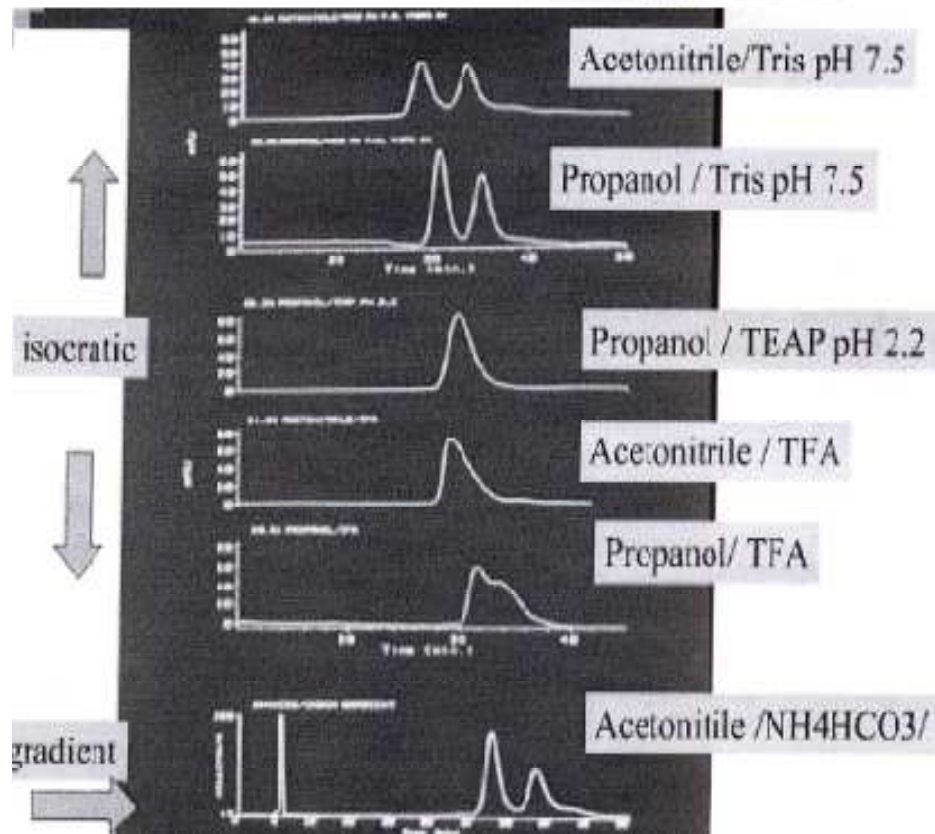
Fehérjék analízise-1



Fehérjék analízise-2



Fehérjék analízise-3

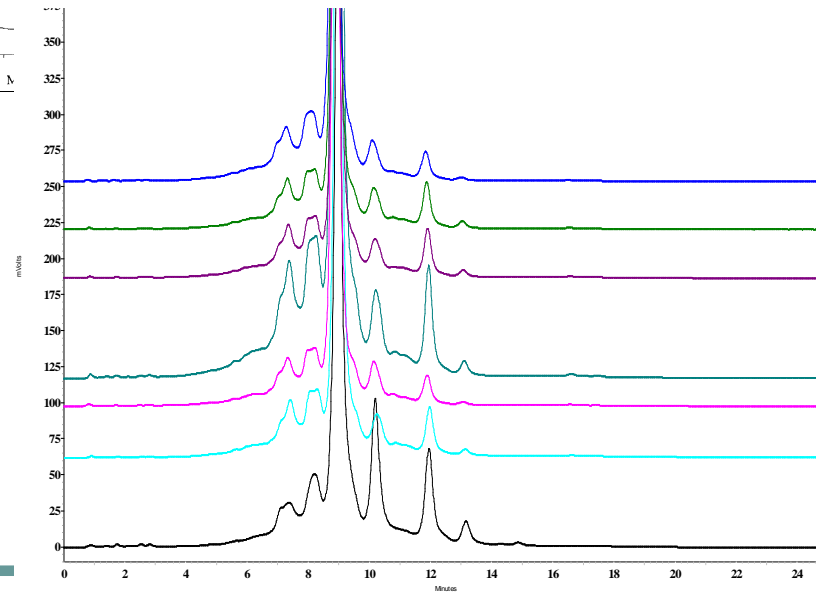
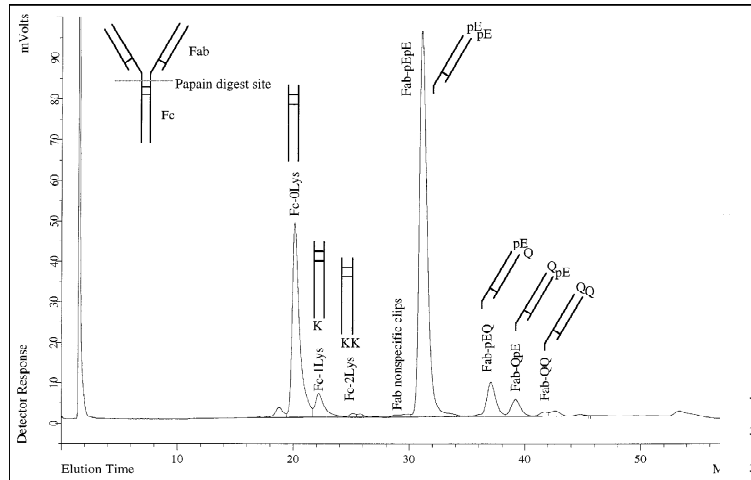


Ref. Aguilar, M-I. and Hearn, M. Meth. Enzymol. vol.270:3-26; 1995

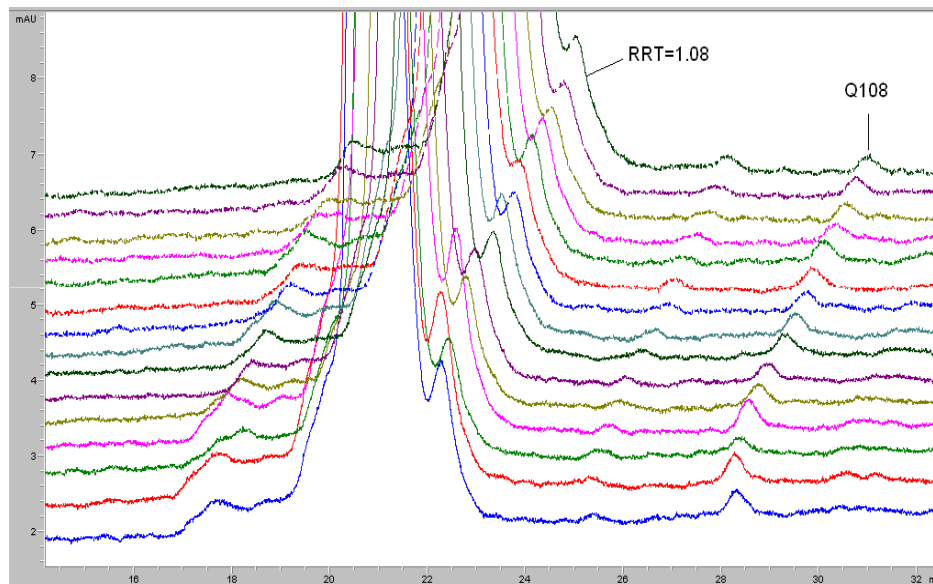
Originátor készítmény megismerése-1

- **Irodalmazás**
 - Cikkek
 - Szabadalmak
 - Előadásanyagok
- **Mérések, mérések és mérések**

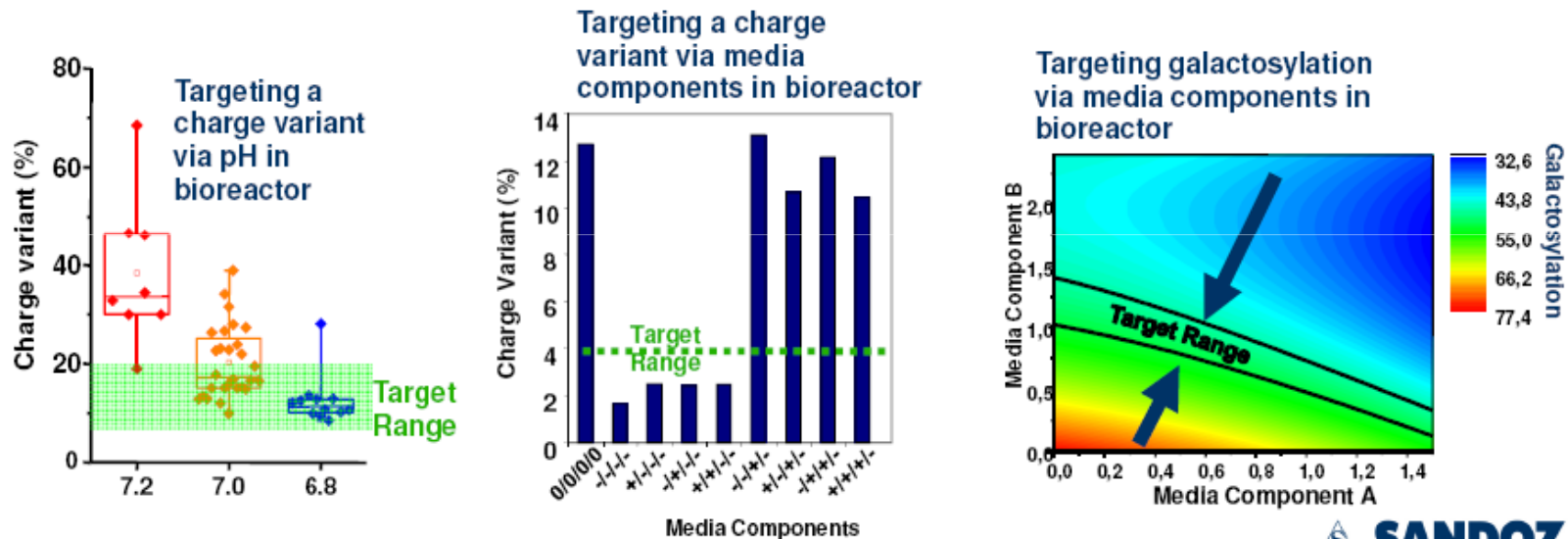
Originátor készítmény megismerése – folyt.



Originátor készítmény megismerése – folyt.

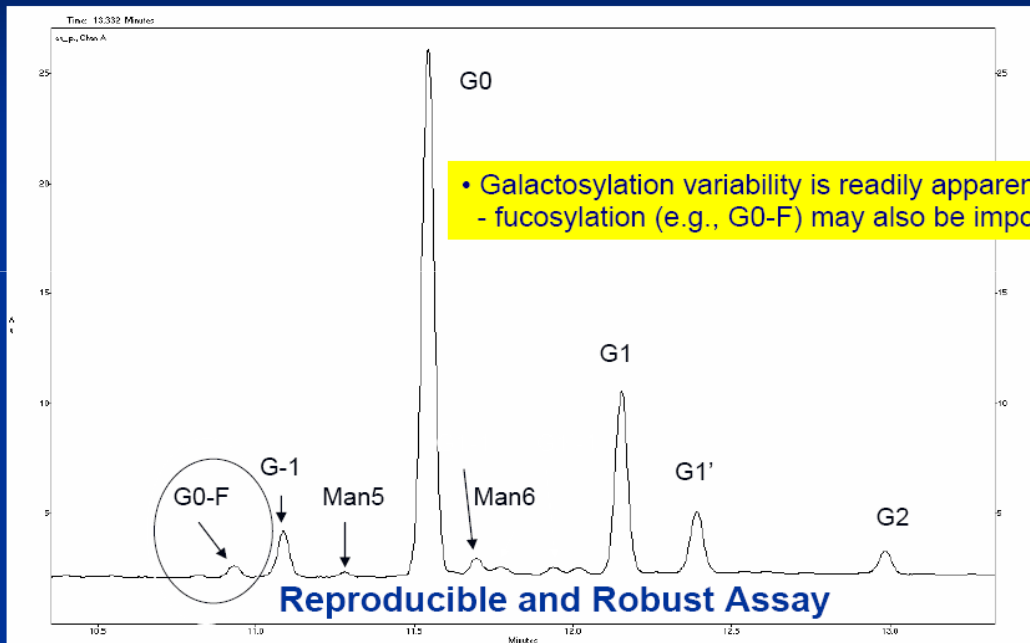


Originátor készítmény megismerés



Originátor készítmény megismerése-2

CE Analysis of Neutral N-Linked Oligosaccharides from a Recombinant Antibody

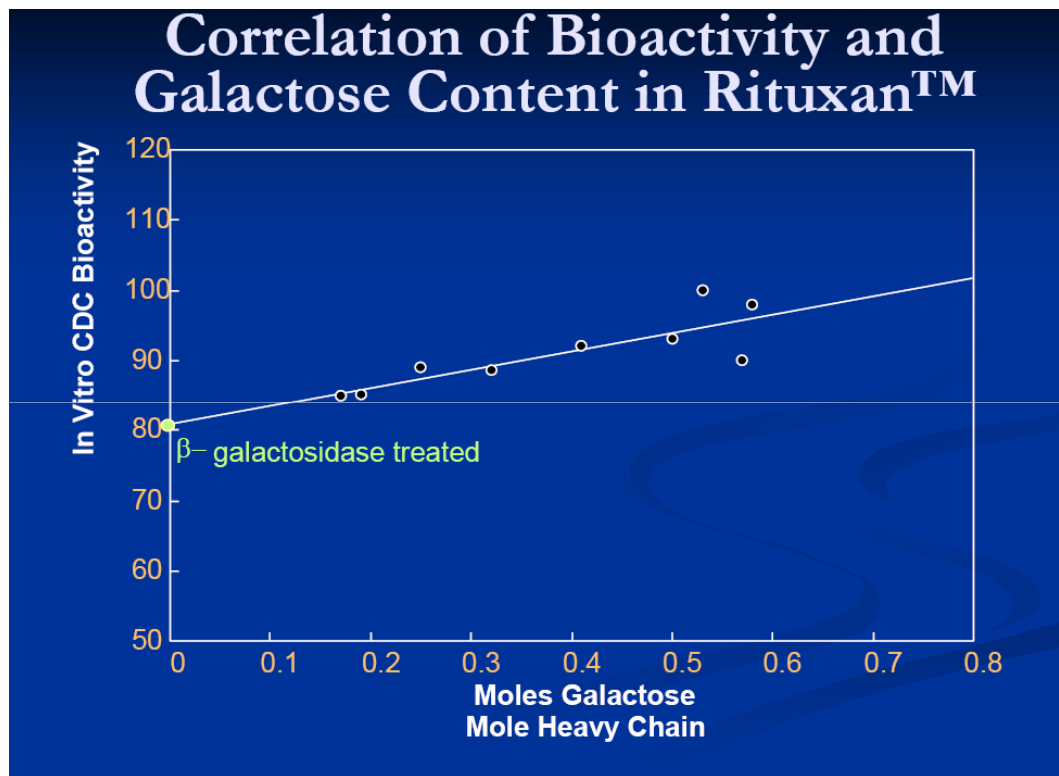


- Galactosylation variability is readily apparent
- fucosylation (e.g., G0-F) may also be important

Reproducible and Robust Assay

Rob Garnick
Sr. VP, Regulatory, Quality & Compliance
Genentech

Originátor készítmény megismerése-2 folyt.

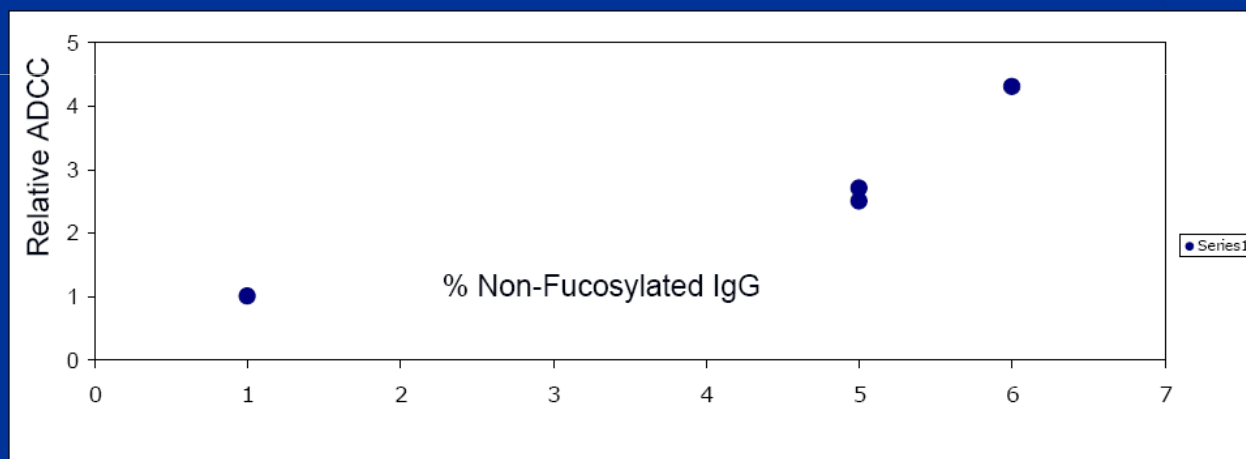


Rob Garnick
Sr. VP, Regulatory, Quality & Compliance
Genentech

Originátor készítmény megismerése-2 folyt.

When You Think You Know Everything...

- Non-fucosylated Fc glycans : ADCC correlation unknown 5 years ago
- very small differences may have significant *in vitro* effects:



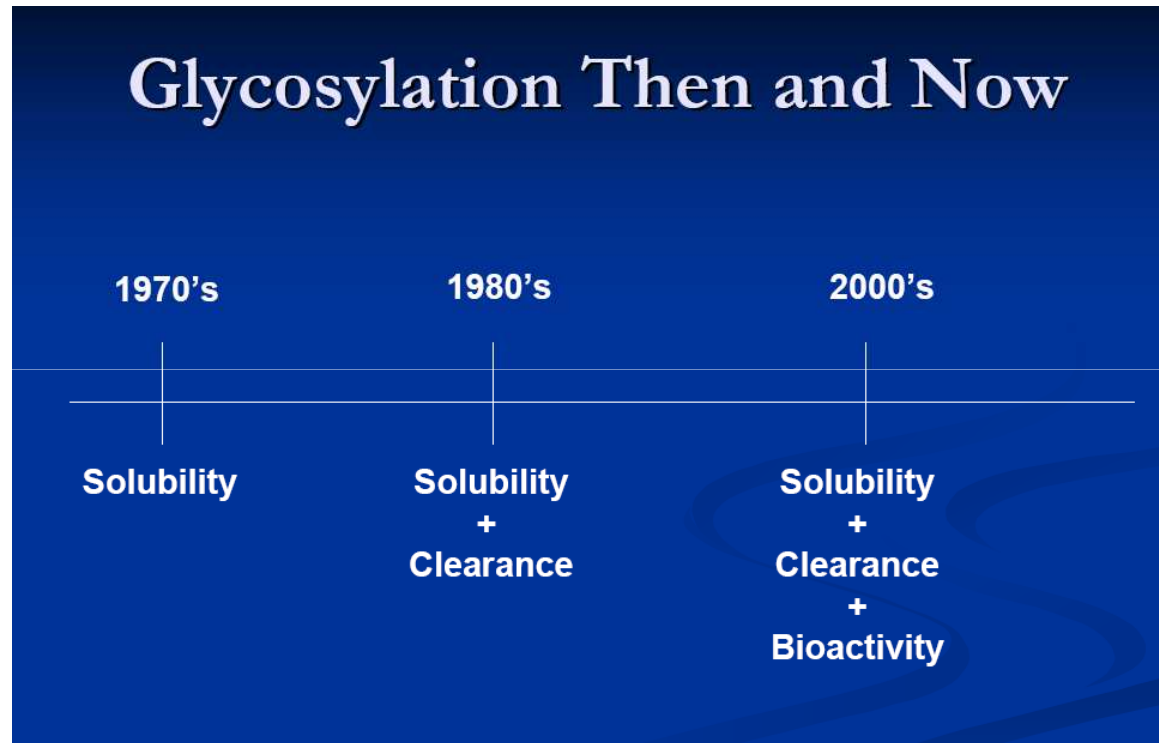
20

Rob Garnick
Sr. VP, Regulatory, Quality & Compliance
Genentech

Ignoti nulla cupido.

(Amit nem ismerünk, az után nem vágyunk)

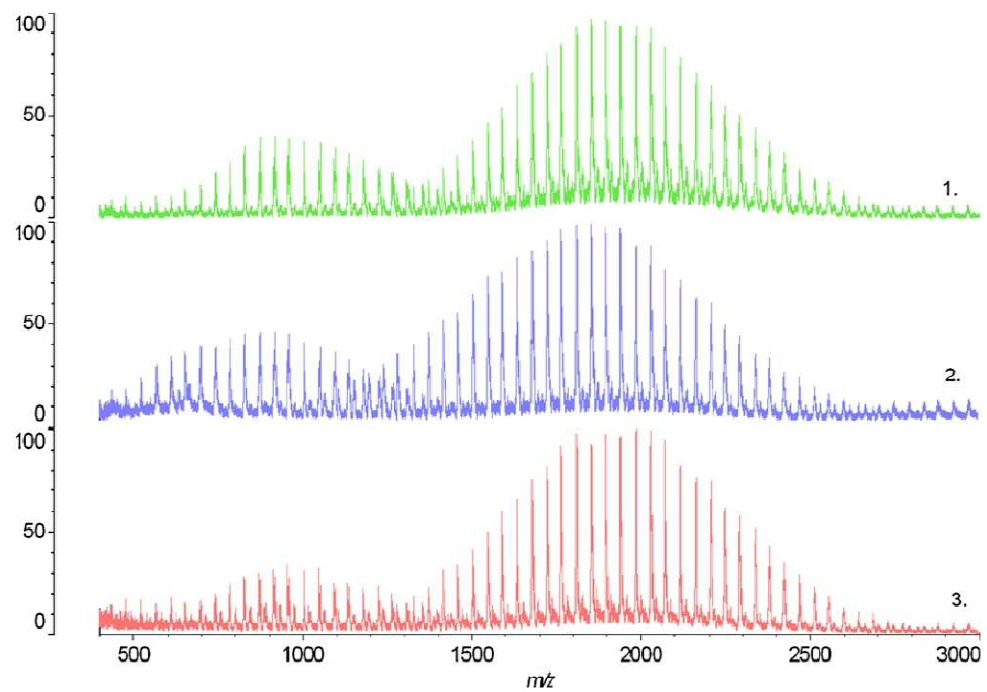
Glycosylation Then and Now



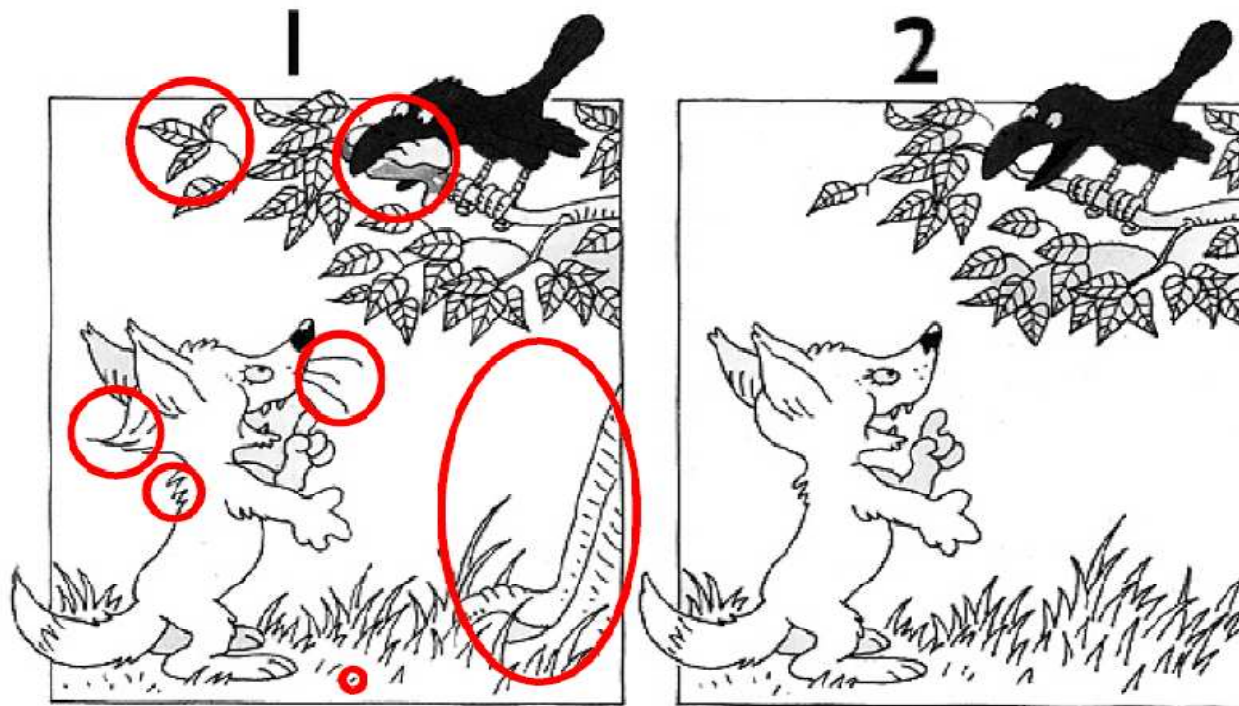
A ma piacon levő 13 legsikeresebb terápiás fehérje közül 11

2000 előtt lépett piacra!

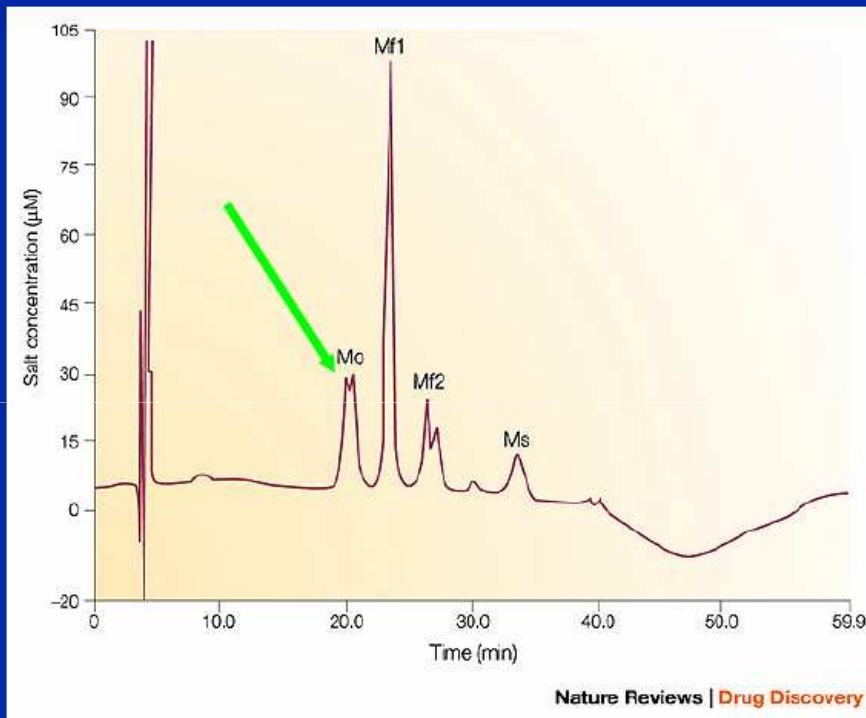
Originátor készítmény megismerése 3 (segédanyag beszállító kiválasztása) Tween-80 szarzsok összehasonlítása (MALDI-TOF)



Milyen különbség releváns?



Példák a nagyvilágból-1



RP-HPLC profile of a highly immunogenic batch of interferon (IFN)-alfa2A

Mo is an oxidized form, which enhances immunogenicity and contributes to aggregate formation,
From Schellekens, Nature Reviews, 1, 2002, 457

Példák a nagyvilágból-2

- **Container closure system: prefilled syringe**
 - Tungsten filaments used to perforate syringe barrel
- **Source: release of tungsten oxide from the syringe into the product**
- **Impact: protein oxidation followed by aggregation**
- **Resolution: switch to platinum instead of tungsten filaments to perforate syringe barrels**

Ingrid Markovic, Ph.D
Biologist

U.S. Food and Drug Administration
Center for Drug Evaluation and Research
Office of Biotechnology Products
Division of Therapeutic Proteins

REMICADE®

Összehasonlíthatósági eljárás (1)

Infliximab termék - Anti-TNF α mAb

- Az engedélyt 1998 augusztusában kapták
- Folyamatos perfúziós technológia
- A gyártási és tisztítási folyamat specifikus lépéseket tartalmaz a vírus eliminációra
- A bulk gyártása Leidenben, Hollandiában van

REMICADE®

Összehasonlíthatósági eljárás (1)

A leideni bővítés

A meglévő leideni gyártóbázis bővítése érintené:

- Puffer készítést
- Eszköz előkészítést és tárolást
- Downstream processt

A leideni engedélyezett gyártóbázison végrehajtandó változások:

- Zárt rendszerek bevezetése, amelyek következtében a termelési folyamatokat kevésbé részletesen kellene ellenőrizni
- Az aszeptikus technológia és a fix összeköttetésű termék szállító sorok miatt kevesebb tisztítási kiépítés szükséges
- Megnövekedett CIP és SIP ciklus használat
- Megnövelt automatizálás
- Egy vírusszűrési lépés bevezetése

REMICADE ®

Összehasonlíthatósági eljárás (1)

A protokoll

- Október, 1998 – Összehasonlítási protokoll benyújtva
 - In process teszt egy sarzsra
 - Release teszt egy sarzsra
 - Az eredmények összevetése több meglévő sarzs eredményével
 - Biológiai aktivitás és tisztaság vizsgálatok összehasonlítása

REMICADE ®

Összehasonlíthatósági eljárás (1)

A hatósággal való konzultáció:

- **Február, 1999 – Hivatali megjegyzések a protokollhoz megérkeztek**
- A stabilitási tesztelés tervei tisztázandók
- Listázni kell azokat a tanulmányokat amelyek rendelkezésre fognak állni az inspekció alatt
- A változások várható hatása a többi - a gyártóbázison előállított- termékre tisztázandó
- Egészítsék ki a beadványt, az összes folyamatot érintő deviációs jelentéssel
- A változások hatását három-három sarzson kell igazolni (a tervezett egy helyett)

Összehasonlíthatósági eljárás (1)

A hatósággal való konzultáció:

- **Június, 2000** – A megjegyzésekre való válaszok benyújtva azzal a javaslattal, hogy a változtatásokat 2 fázisban hajtják végre
 - I Fázis: puffer és eszköz előkészítési területek átalakítása (small scale)
 - II Fázis: az összes fennmaradó terület beleértve a downstream process részt is
- **Február, 2001** – CBE 30 benyújtva a Fázis I – re
- **Július, 2002** – CBE 30 benyújtva a Fázis II – re
- **Október, 2002** – CBE 30 Fázis I – re elfogadva
- **Január, 2003** – CBE 30 Fázis II – re elfogadva

REMICADE ®

Összehasonlíthatósági eljárás (2)

Gyártás Malvern-ban

- Általános változások az engedélyezett leideni gyártóbázishoz képest
 - Zárt rendszerek bevezetése, amelyek következtében a termelési folyamatokat kevésbé részletesen ellenőrzik
 - Az aszeptikus technológia és a fix összeköttetésű termék szállító sorok miatt kevesebb tisztítási kiépítés
 - Megnövekedett CIP és SIP ciklus használat
 - Megnövelt automatizálás

Specifikus folyamat változások

- Az oltó és a gyártási sejt kultúra méretnövelése
- Változás a sejt elválasztó berendezésben amelyet a gyártási sejt kultúrában használnak
- Változás a „harvest” felülúszó folyadék tárolási utasításában
- Változás a kromatográfiás oszlop ágy magasságában két tisztítási lépésben
- A downstream folyamatok méretnövelése
- Egy vírus szűrés bevezetése

REMICADE ®

Összehasonlíthatósági eljárás (2)

Hatósággal való konzultáció:

- **Január, 1998** – Találkozó a Centocor és az FDA között, a Malvern-i gyártási és iktatási stratégia bemutatása
- **Október, 1999** – Találkozó a Centocor és az FDA között, a Malvern-i gyártóbázis engedélyezésének felgyorsítása és előremozdítása céljából
 - Kérdés: az összehasonlíthatósági protokoll elfogadható?
 - Válasz: a gyártóbázison végbemenő változás túl nagymértékű egy összehasonlíthatósági protokollhoz.
 - De, információ amely alátámaszt egy összehasonlíthatósági tervet csatolandó a beadott törzskönyvi dokumentációhoz (IND)
- **Május, 2000** – Összehasonlíthatósági terv benyújtva

Malvern-i Összehasonlíthatósági terv

- IPC mérés a folyamat minden lépésnél
- Sejt kultúrák
 - Életképesség a felengedésnél az elő-kultúrákban
 - Több generáció összehasonlítása az elő-kultúrákban és gyártási sejt kultúrákban
 - Specifikus termelékenység vizsgálata a gyártási sejt kultúrákban
 - Termék minőség az egész gyártási sejt kultúra folyamaton keresztül
- „Harvest” tárolás változás
 - Igazolni, hogy a termék minőségét a tárolás változása nem befolyásolja
- Virális és DNA eliminációs tanulmányok azon kromatográfiai folyamat lépésekre ahol az oszlopágy magasságában változás történt
- A szennyezések eliminálásának igazolása tisztítási folyamat során

REMICADE ®

Összehasonlíthatósági eljárás (2)

- Három sarzs Malvern-i előállítású gyógyszer alapanyag (API) összehasonlítva három BLA (Biologics Licence Application) sarzzsal és három olyan sarzzsal amely az engedélyezett (leiden-i) gyártóbázison lett nemrég (változtatások után) előállítva
 - Release tesztek
 - Összehasonlító szennyezésprofil és bioaktivitás
 - Tryptic map
 - CD elemzés
 - Ultracentrifugás összehasonlítás
 - Oligosaccharide profil
 - MS elemzés

REMICADE®

Összehasonlíthatósági eljárás (2)

Malvern-i Összehasonlíthatósági terv- **Stabilitási vizsgálatok**

- protein A-val tisztított termék előállítva
- Intermediate holding-time vizsgálatok
- Egy sarzs gyógyszer alapanyag
- Három sarzs termék előállítva három különböző sarzs gyógyszer anyagból

Összehasonlíthatósági eljárás (2)

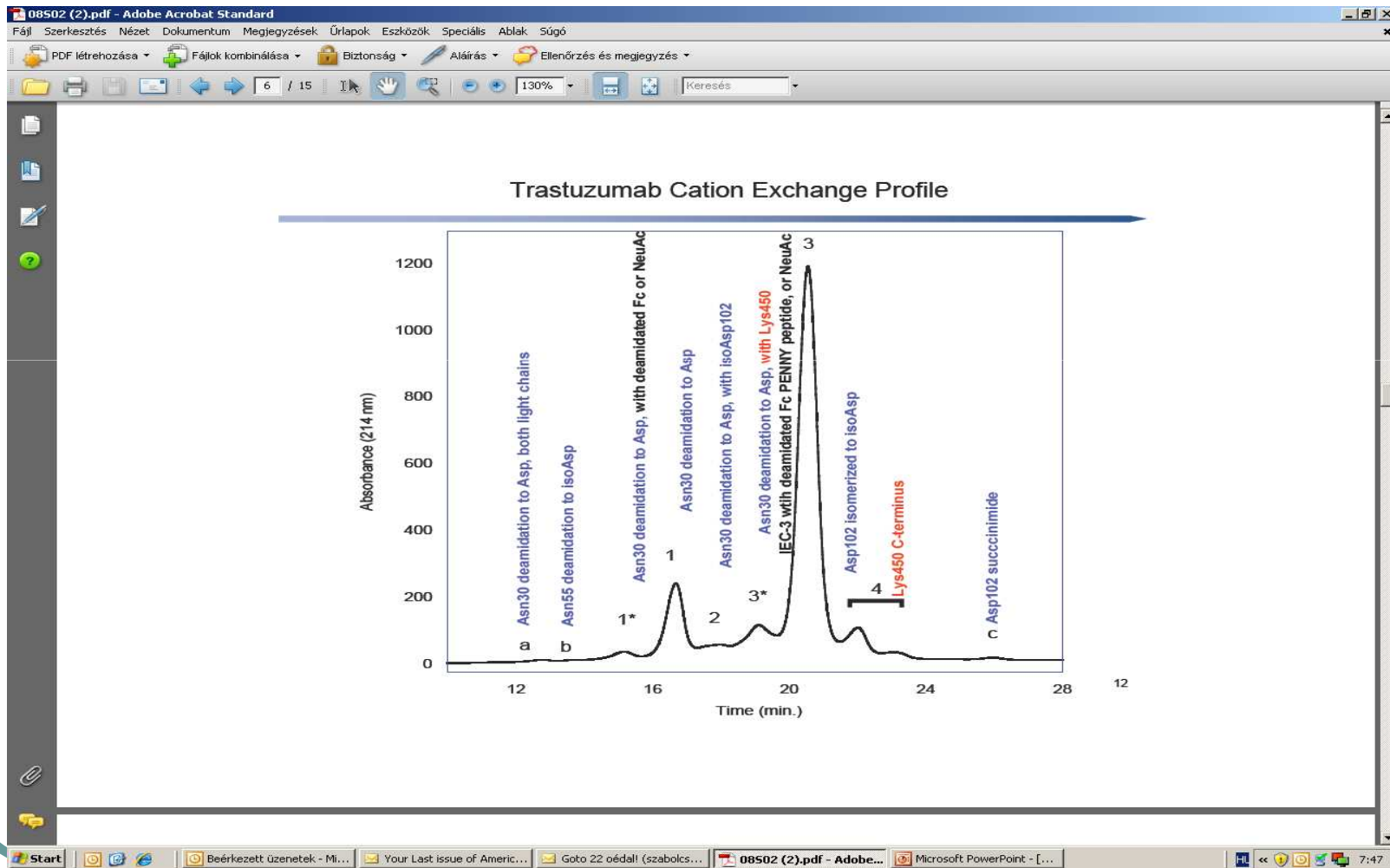
- **Július, 2000** - Hivatali megjegyzések a összehasonlíthatósági tervhez megérkeztek:
 - A technológia transzferrel kapcsolatos validálások listáját adják be
 - A kritikus lépések és a felszabadítási analitikai eljárásokat rekvalifikálják (terveket beadni)
 - Nyújtsák be a „bioburden” és a LAL tesztek eredményét minden köztterméknél és a protein A -val tisztított termék stabilitásánál
 - Összehasonlító ábrákat/adatokat kérnek beadni az
 - IEF gélekről
 - AUC görbéről
 - Tryptic peptid térképekről
 - SDS-PAGE gélekről
 - CD spektrumokról
 - SEC-HPLC kromatogramokról

REMICADE®

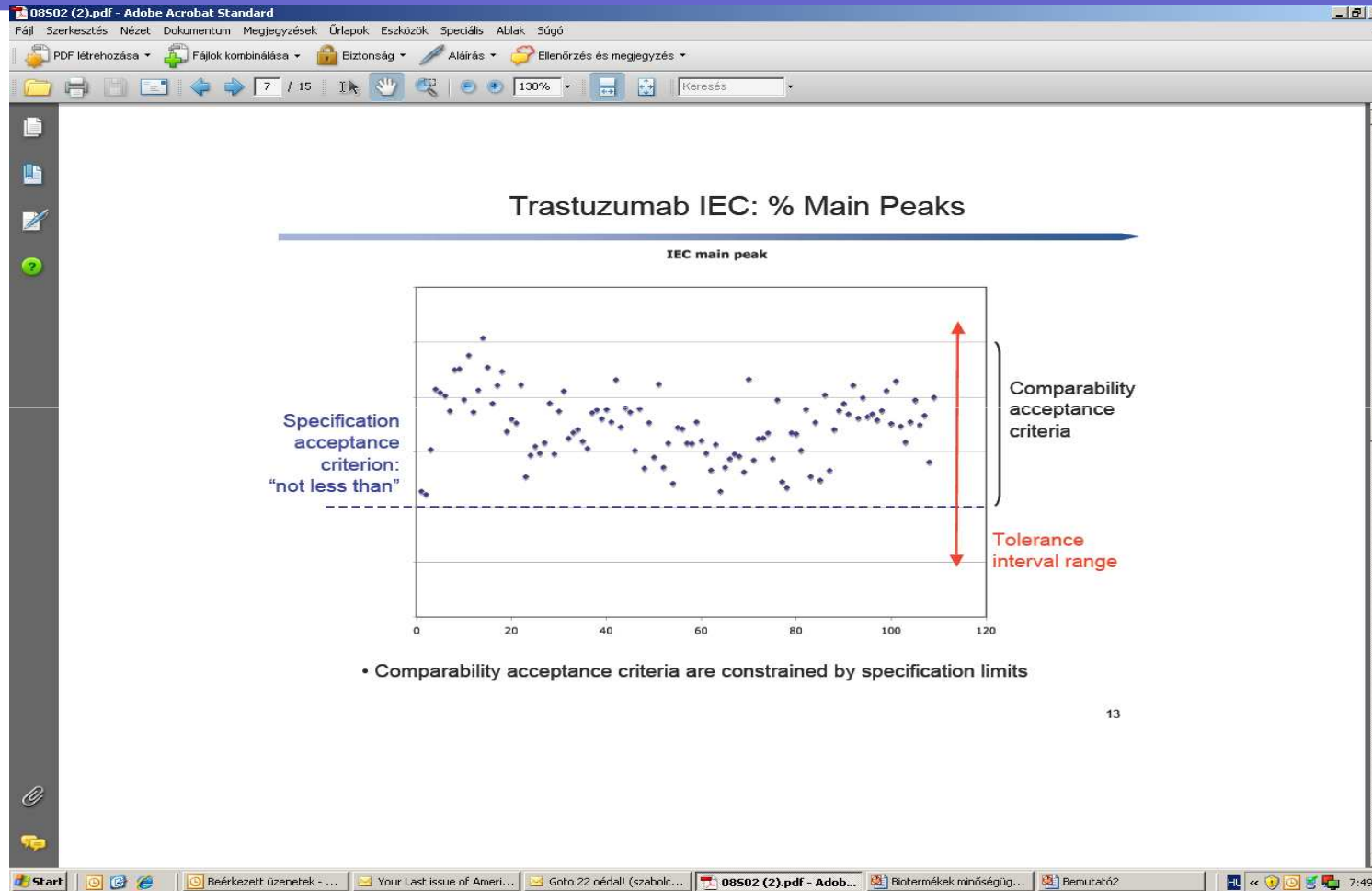
Összehasonlíthatósági eljárás (2)

- **December, 2001** – Az Összehasonlíthatósági terven alapuló előzetes jóváhagyási kérelem benyújtva
- **Március, 2002** – Előzetes jóváhagyási inspekció
- **Április, 2002** – A Malvern-i gyártóbázis engedélyezése

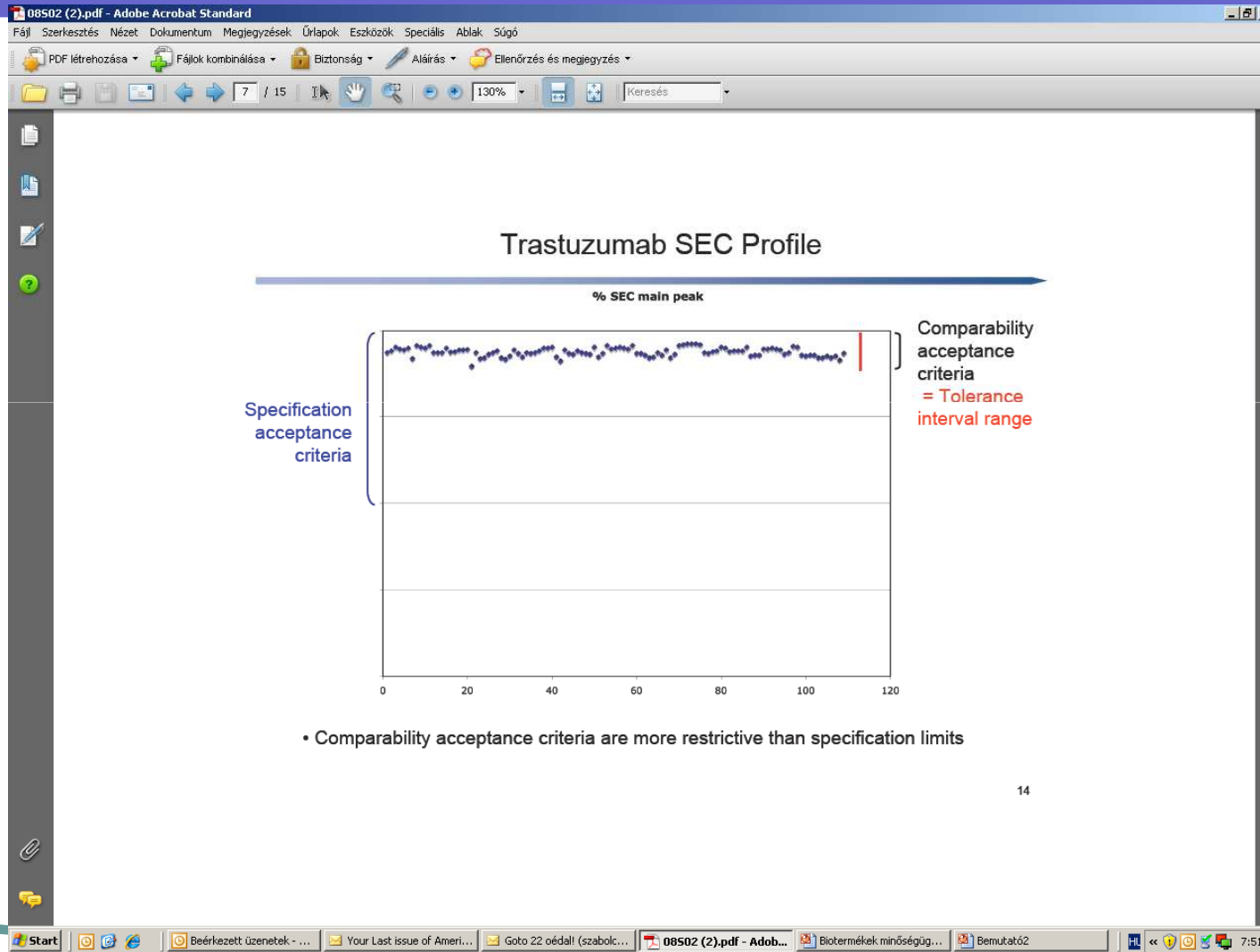
Comparability exercise-Genentec (1)



Comparability exercise-Genentec (2)



Comparability exercise-Genentec (3)



Comparability exercise-Genentec (4)

Acceptance Criteria

- Lot release test data: licensed process(es) vs. new process or site
 - use 95/99 tolerance intervals for quantitative tests
 - cannot exceed specification limits
 - **all test results** must meet these acceptance criteria
- Extended characterization studies
 - may include testing of every 4th or 5th lot
 - **mean values** for post-change lots must meet these acceptance criteria
- Stability with accelerated (“stressed”) conditions, usually 30° – 40°C
 - temperature and duration depend on known rates and routes of degradation
 - quantitative tests: degradation slope ratio of 0.80 to 1.25
- Profile comparisons
 - e.g., IEC, SEC, peptide maps, CE, glycans
 - how to define “comparable”?

15

Comparability excercise-Genentec (5)

08502 (2).pdf - Adobe Acrobat Standard

Fájl Szerkesztés Nézet Dokumentum Megjegyzések Úrlapok Eszközök Speciális Ablak Súgó

PDF létrehozása Fájlok kombinálása Biztonság Aláírás Ellenőrzés és megjegyzés

9 / 15 130% Keresés

Internal vs. External Comparability

- Only the innovator has access to historical samples and data sets
 - biosimilar companies are limited to commercial drug product samples

Comparability Test Component	Innovator	Biosimilar
Historical samples and reference(s)	Yes	Limited to current commercial lots
Historical lot release data	Yes	No
Stability controls	Yes	Uncertain starting points
Post-translational modification comparison	Yes	Yes
Process-related impurities	Head-to-head (same host cell)	Probably (depends on host cell differences)
Repurification from drug product	No	Depends on excipients

- Our comparability approach can not be followed by Biosimilar manufacturers

18

Start Beérkezett üzenetek - ... Your Last issue of Ameri... Goto 22 oedall (szabol... 08502 (2).pdf - Adob... Biotermékek minőségüg... Bemutatóz 7:56

Comparability excercise-Genentec (6)

08502 (2).pdf - Adobe Acrobat Standard


Fájl Szerkesztés Nézet Dokumentum Megjegyzések Úrlapok Eszközök Speciális Ablak Súgó

PDF létrehozása Fájlok kombinálása Biztonság Aláírás Ellenőrzés és megjegyzés

10 / 15 130% Keresés

Rituximab "Biosimilar"
Reditux; produced and licensed in India by Dr. Reddy's Laboratories

The world's first bio-similar antibody from India.



DR. REDDY'S

Bill Bennett
Thomas Schreitmüller

19

Start Beérkezett üzenetek - ... Your Last issue of Ameri... Goto 22 oédall (szabolc... 08502 (2).pdf - Adob... Biotermékek minőségüg... Bemutató2 7:57

Comparability exercise-Genentec (7)

08502 (2).pdf - Adobe Acrobat Standard

Fájl Szerkesztés Nézet Dokumentum Megjegyzések Űrlapok Eszközök Speciális Ablak Súgó

PDF létrehozása Fájlok kombinálása Biztonság Aláírás Ellenőrzés és megjegyzés

10 / 15 130% Keresés

Reditux Promotional Literature

Reditux™

Rituximab Injection 100mg / 500mg
The world's first bio-similar antibody from India

Secondary and Tertiary structural conformation using Far UV CD Spectroscopy and Fluorescence Spectroscopy show comparability between REDITUX™ and RMP.

Molecular conformation through Tryptophan Fluorescence (Tertiary Structural attribute)

Molecular conformation through Far UV CD Spectra (Secondary Structural attribute)

20

Start Beérkezett üzenetek - ... Your Last issue of Ameri... Goto 22 oédal | (szabol... 08502 (2).pdf - Adob... Biotermekek minőségüg... Bemutató

7:58

Comparability exercise-Genentec (8)

08502 (2).pdf - Adobe Acrobat Standard

Fájl Szerkesztés Nézet Dokumentum Megjegyzések Úrlapok Eszközök Speciális Ablak Súgó

PDF létrehozása Fájlok kombinálása Biztonság Aláírás Ellenőrzés és megjegyzés

11 / 15 130% Keresés

Cation Exchange Chromatography: Rituxan and Reditux

- This is not a release test
- part of "extended characterization"
- Definitely not comparable

AUFS @ 280 nm

Time (minutes)

Rituxan

Reditux

acidic forms

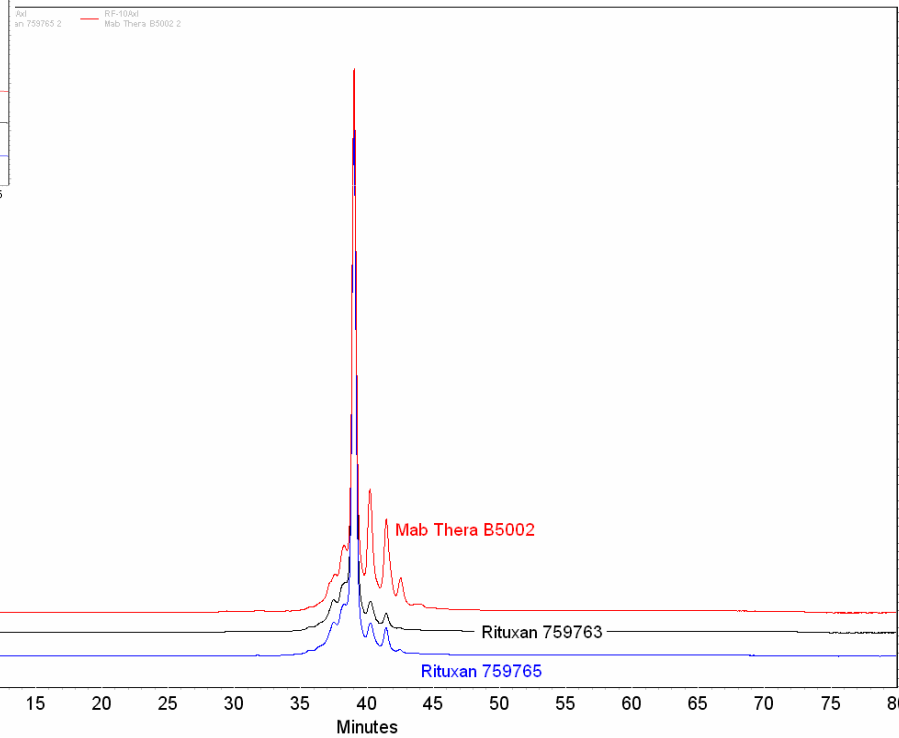
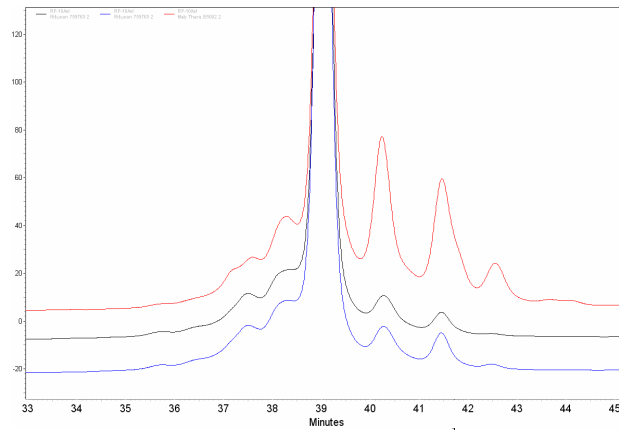
basic forms

Matt Field
Susan Garnick

22

Start Beérkezett üzenetek - ... Your Last issue of Ameri... Goto 22 oedall (szabolc... 08502 (2).pdf - Adob... Biotermékek minőségüg... Bemutató2 7:59

Comparability exercise-Genentec (9) vs Richter



Fekete Szabolcs

Comparability exercise-Genentec (11)

The image shows a screenshot of the Adobe Acrobat Standard interface. The main content area displays a slide with the following text:

Incidence of Sequence Variants Due to Mutations

- Recent history of cell line development at Genentech:
 - 75 cell lines
 - 10 confirmed mutations
 - = 13% incidence
- Confirmed mutations in Phase I vs. amplified Phase III lines
 - phase I cell lines: 9.5%
 - phase III (amplified) cell lines: 21%
- Mitigating this risk requires multiple methods to identify sequence variants
 - nucleic acid techniques
 - peptide mapping with UV detection
 - peptide mapping with mass detection, e.g., MASCOT software

Amy Shen et al.
Vish Katta et al.

24

The screenshot also shows the Adobe Acrobat Standard menu bar (Fájl, Szerkesztés, Nézet, Dokumentum, Megjegyzések, Úrlapok, Eszközök, Speciális, Ablak, Súgó), a toolbar with various navigation and editing tools, and a Windows taskbar at the bottom with several open applications.

Genentec tapasztalatai (2008-FABIAN)

Reed Harris

The image shows a screenshot of a PDF presentation slide displayed in Adobe Acrobat Standard. The slide title is "Experience Leads to Humility" and the subtitle is "Examples of unexpected structural heterogeneity (and effects) abound". The slide content is as follows:

- *E. coli* expression
 - mistranslation: Lys at Arg positions (use of AGA codon)
 - misincorporation: norleucine at methionine positions
- O-fucose at Thr61 in tPA (Activase)
 - licensed in 1987; O-fucosyl-Thr discovered in 1990
 - Thr(Fuc) present on tPA from CHO, BHK/293, Bowes melanoma cell lines
- Afucosylation of Fc glycans enhances *in vitro* ADCC for anti-CD20 antibodies
 - original studies in Genentech's Research Dept. (Shields *et al.*) and elsewhere
 - led R&D staff to examine multiple batches for afucosylation consistency
- Every MAb presents unique challenges:
 - trastuzumab: Asn deamidation, Asp isomerization
 - omalizumab: unpaired cysteines, Asp isomerization
 - bevacizumab: dissociable aggregates
 - ranibizumab: Trp oxidation

The slide number "27" is visible in the bottom right corner of the slide content. The Adobe Acrobat interface includes a menu bar (Fájl, Szerkesztés, Nézet, Dokumentum, Megjegyzések, Űrlapok, Eszközök, Speciális, Ablak, Súgó), a toolbar with various navigation and editing tools, and a taskbar at the bottom showing the Windows Start button and several open applications including "08502 (2).p...", "Biotermékek...", "Bemutató2", "Holnapi előad...", "Katinak jav.ppt", and "Protein Purific...". The system clock shows 8:37.

Hogyan kezdődött?

The Birth of Biotech

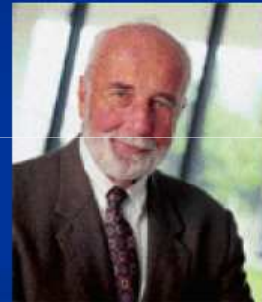
■ The Pioneers



Stanley Cohen
Stanford University



Bob Swanson &
Herb Boyer
Genentech



George Rathmann
Amgen CEO...

The Goal:

To develop unique microorganisms that are capable of producing products that will significantly better mankind.

Rob Garnick

Sr. VP, Regulatory, Quality & Compliance
Genentech