

# Výroba biologických léčivých přípravků: proces, hodnocení, divergence a průkaz konzistence kvality přípravku Humira

Doc. PharmDr. Mgr. David Vetchý, Ph.D. | Ústav technologie léků,  
Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

## Souhrn

Vetchý O. Výroba biologických léčivých přípravků: proces, hodnocení, divergence a průkaz konzistence kvality přípravku Humira. *Farmakoterapie* 2016; 12(6):??-??

U biologických léčivých přípravků je obtížné zjistit přesnou strukturu monoklonálních protilátek, které jsou jakožto produkt živých organismů přirozeně proměnlivé. Pro převážnou většinu biologických léků je k dispozici velmi málo poznatků týkajících se kvality výroby, ojediněle dostupné údaje přitom svědčí o poměrně široké variabilitě. Nedávno publikovaná studie hodnotící sérii kvalitativních vlastností Humiry svědčí o konzistentním a přísně kontrolovaném výrobním profilu v průběhu více než deseti let výroby.

## Klíčová slova

biologické léčivé přípravky, výrobní technologie, Humira

## Summary

Vetchý O. Production of biological medicinal products: the process, evaluation, divergence and consistency proof for Humira. *Farmakoterapie* 2016;12(6):??-??

Biological medicinal products (biologics) make it difficult to find out about the exact structure of monoclonal antibodies that are products of living organisms and therefore naturally variable. Rather limited knowledge is available for the vast majority of biologics regarding the quality of their production, though sporadically available data indicate a rather broad range of variability. A recently published study that evaluated a series of qualitative properties of Humira revealed a consistent and rigorously controlled manufacturing profile over more than a decade of production.

## Key words

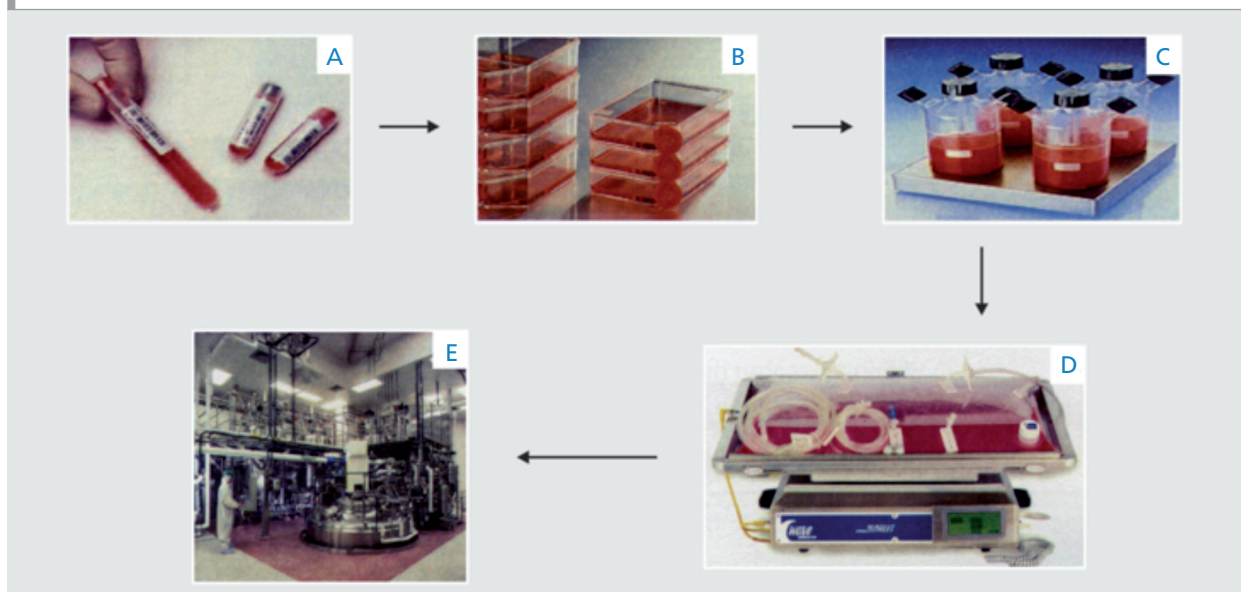
biological medicinal products, production technology, Humira

## Proces výroby biologických léčivých přípravků

Proces výroby biologických léčivých přípravků (BLP) začíná vyjmutím zamražené buněčné kultury, původně vyvinuté pro produkci dané biologické léčivé látky (BLL), z buněčné banky. Jedná se o stejnou buněčnou kulturu, která produkovala BLL pro klinické hodnocení požadované pro registrační řízení. Jen díky tomuto přístupu je možné v konečné fázi získat z biologického materiálu produkt, který má žádané kvalitativní parametry. Uvádí se, že farmaceutické firmy mívají zamražených tolik původních kultur, aby jejich množství vystačilo přibližně na padesát let výroby.<sup>1</sup> Z bezpečnostních důvodů jsou tyto původní kultury uskladněné alespoň na dvou místech v různých částech světa. Předpokládá se, že za padesát let již budou vyvinuty nové, účinnější a bezpečnější BLP, a zmražené množství je tedy dostatečné. Vlastní výrobní proces lze rozdělit na dvě fáze. V první fázi dochází k množení kultury, zvětšování jejího objemu a produkci BLL, tzv. upstream. Druhá fáze, tzv. downstream, pak spočívá v oddělení, čištění a koncentrování BLL až do konečné podoby BLP. Protože většina BLP je určena k parenterální aplikaci a jedinou možnou sterilizační metodou je aseptická filtrace, pracuje se se sterilním materiálem a v místnostech s nejvyšší třídou čistoty.

## Upstream – množení původní kultury, zvětšování jejího objemu a produkce BLL

K výrobě jedné šarže BLP je většinou potřeba rozmrazit dvě ampule původní buněčné kultury (obrázek 1A). Během roku se tak pro výrobu spotřebuje několik desítek těchto ampulí s původní buněčnou kulturou.<sup>1</sup> Původní buněčná kultura se nejdříve kultivuje v miskách (obrázek 1B), dokud se nevytvoří souvislá vrstva buněk. Následně se těmito buňkami naočkují baňky umístěné na třepacím zařízení, kde se dále zmnoží a objem buněčné kultury se zvětší (obrázek 1C). Namnoženou kulturou se poté naočkuje

obrázek 1 **Upstream** (Bližší vysvětlení v textu)

malý, pěti- až desetilitrový bioreaktor (obrázek 1D). Zde se buněčná kultura množí, dříve než je převedena do konečného velkého výrobního bioreaktoru (obrázek 1E). Ve výrobním bioreaktoru dochází k nárůstu buněk do maximální hustoty s maximální produkcí BLL.

### Downstream – oddělení, čištění a koncentrování BLL

Po dosažení maximální koncentrace BLL následuje její primární zachycení. Od BLL, která je rozpuštěná ve vodném médiu, se centrifugací a filtrací oddělují nerozpuštěné částice, jako je např. buněčná kultura. Poté se médium čistí a BLL se koncentruje. Pro odstranění zbytků aminokyselin, anorganických solí, vitaminů, glukózy a dalších organických látek, doplňků pro růst buněk, jako je hovězí sérum a proteiny, celých buněk, jejich částí i buněčných proteinů, nukleových kyselin, tuků, endotoxinů, virů a dalších látek z média se používá řada chromatografických a filtračních technik. Proces čištění a koncentrování BLL musí odstranit všechny znečišťující látky a zabránit vstupu znečišťujících látek. Musí zajistit, že BLL bude ve správné konformační struktuře, nebude poškozená, bude ve správném roztoku a správné koncentraci k uchovávání a podávání injekcí. K dosažení uvedeného cíle se využívá změna pH, teploty a míchání média. Většinou je snaha dosáhnout 95% čistoty BLL o koncentraci 1–10 g v jednom litru média.<sup>1</sup>

Specifickou a velice kritickou částí této fáze je provedení technologické operace k inaktivaci nebo oddělení virů. Viry mohou být přítomny v savčích kulturách, protože tyto kultury typicky vyžadují hodně živin a tím vytvářejí vhodné podmínky pro existenci virů, samotný geneticky modifikovaný organismus může skrývat endogenní retroviry, a také procedury zkoušející vstupní buňky a materiál nemusí viry odhalit vzhledem k detekčním limitům. Proto je tato část

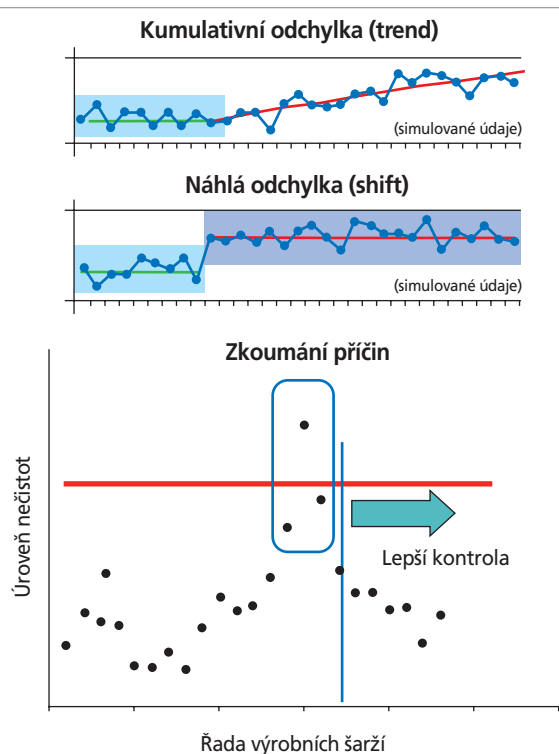
regulační institucí povinně vyžadována. Inaktivace virů se provádí snížením pH, které je však nepříznivé pro proteinovou strukturu přítomné BLL.<sup>1</sup> Postup, jak provést inaktivaci virů a zároveň významně nepoškodit přítomnou BLL, si každá farmaceutická firma drží v tajnosti.

Výrobní proces je ukončen přidáním dalších pomocných látek a stabilizátorů a plněním do konečných vialek. Pro stabilizaci je většinou vyžadována lyofilizace. Jak již bylo řečeno, BLP obecně nemůže být sterilizován ve finální lékové formě, a proto jedinou možnou cestou je aseptická filtrace.

### Hodnocení biologických léčivých přípravků

Postup hodnocení BLP je založen na tom, že v současné době není možné do detailu zjistit strukturu získaných složitých molekul typu monoklonálních protilátek podobně, jako je tomu u jednoduchých chemických molekul. Proto se analýza získané BLL provádí souborem testů založených na částečné analýze struktury BLL a na analýze jejich fyzikálně-chemických vlastností. Myšlenka analýzy vychází z toho, že použijí-li se nejcitlivější analytické přístroje pro charakterizaci BLL v rámci předepsaného souboru testů a získají-li se data, která budou ležet v povoleném rozptylu, je možné konstatovat, že BLP obsahuje očekávanou BLL. V rámci analýzy struktury se zjišťují sekvence a složení aminokyselin, koncová aminokyselinová sekvence, peptidová mapa po rozložení specifickými enzymy, posttranslační modifikace, thiolové skupiny a disulfidické můstky, struktura navázaných sacharidů a další. Analýza fyzikálně-chemických vlastností zjišťuje náboj molekuly, její velikost a molekulovou hmotnost, molární absorpční koeficient, spektrofotometrický profil (UV, NMR), analyzují se vzorky

obrázek 2 **Drift** (Bližší vysvětlení v textu)  
(Podle 2)

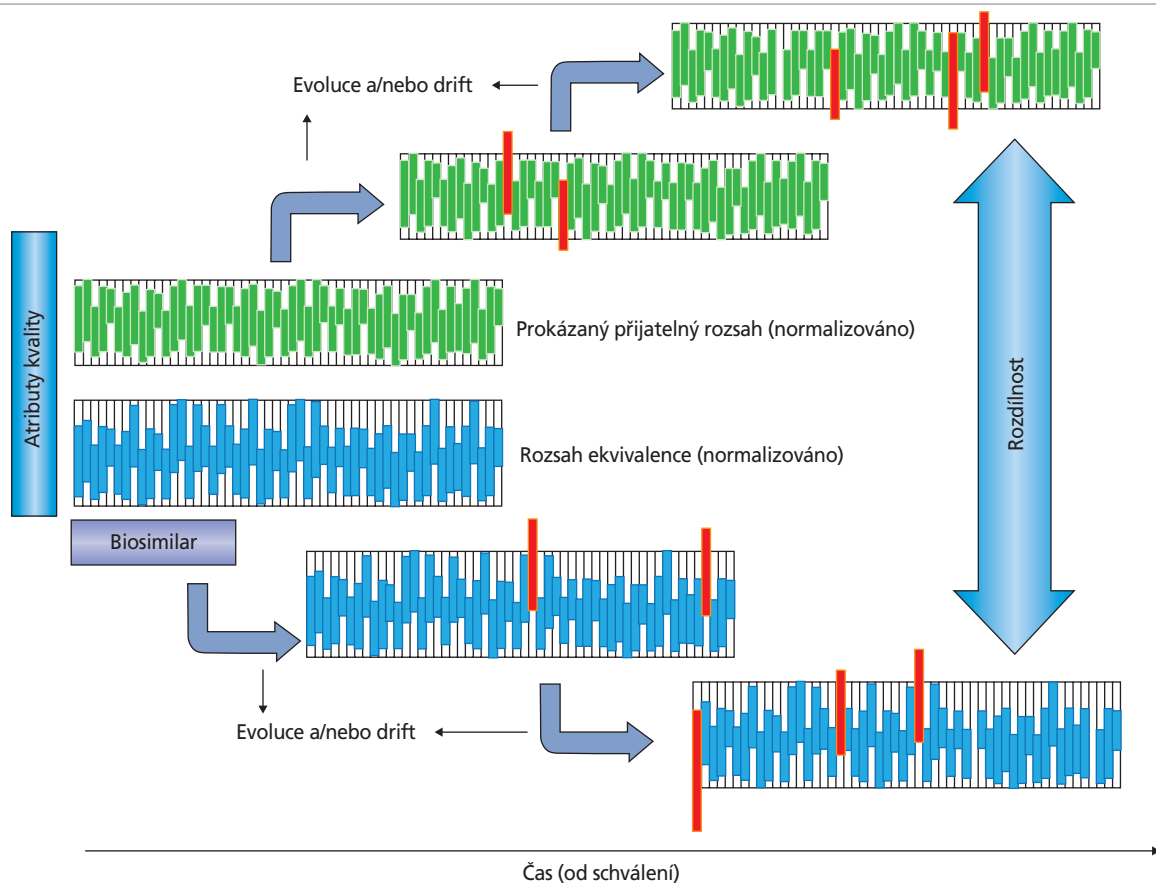


po elektroforéze a po kapalinové chromatografii. Zvláště významná je analýza izoform lišících se rozdílnými posttranslačními modifikacemi či alternativním splicingem (sestřihem).

## Divergence (rozdílnost) biologických léčivých přípravků

Po uvedení BLP na trh je výrobce často nucen provádět změny ve výrobním procesu, jako například převést výrobu na větší výrobní zařízení z kapacitních důvodů, změnit dodavatele surovin, upravit použitou technologii podle aktuálních moderních poznatků a podobně. V kombinaci s přirozenou proměnlivostí BLL jakožto produktu živého organismu dojde časem ke změně v kvalitě daného BLP.<sup>2</sup> Tato změna se projeví jako očekávaná odchylka rozptylu získaných dat po analýze vyrobeného BLP, tzv. evoluce, nebo jako neplánovaná, nevysvětlitelná odchylka, tzv. drift.<sup>3</sup> Drift může vykazovat systematický trend v jednom směru kvality, nebo náhlý posun v kvalitě BLP (obrázek 2). Příčinu odchylek v kvalitě se buď podaří zjistit a odstranit, jak je zobrazeno ve spodní části obrázku 2, kdy byla odstraněna příčina zvýšeného výskytu nečistot, nebo se příčina nezjistí. Pak je výrobce povinen podle pokynů zhodnotit, zda změna v kvalitě nemá významný vliv na bezpečnost a účinnost BLP.<sup>4</sup> Po prokázání nevýznamného vlivu na bezpečnost

obrázek 3 **Divergence** (Bližší vysvětlení v textu) (Podle 2)



a účinnost může výrobce produkovat další šarže s danou změnou v kvalitě.

I když se BLP se změnou kvality významně neliší z hlediska bezpečnosti a účinnosti od BLP bez změny kvality, původně biosimilární produkt už nemusí být k BLP se změnou kvality biosimilární, protože biosimilarita byla zkoumána v době registrace biosimilárního přípravku.<sup>2</sup> V důsledku driftu a evoluce se tak po určité době nakonec stane to, že původně biosimilární přípravky již nebudou biosimilární. Tento jev je zobrazen na obrázku 3 a nazývá se divergence (rozdílnost) biologických léčivých přípravků.<sup>2</sup>

Divergence z hlediska účinnosti způsobí rozdíl v optimálním dávkování pro konkrétního pacienta. Oba schválené přípravky budou stále účinné, zaměňování mezi nimi však může způsobit narušení dávkování. Z hlediska bezpečnosti bude jeden přípravek pro daného pacienta méně imunogenní nebo může být lépe snášen než druhý a hrozí negativní důsledky pro pacienta přechodem na hůře snášený nebo více imunogenní produkt. Velmi obtížně zhodnotitelná je pak divergence u extrapolovaných indikací vzhledem k nedostatku klinických dat.

## Průkaz konzistence kvality přípravku Humira

Vedle z jedné strany diskutované biosimilaritě původně biosimilárních přípravků je z druhé strany poukazováno

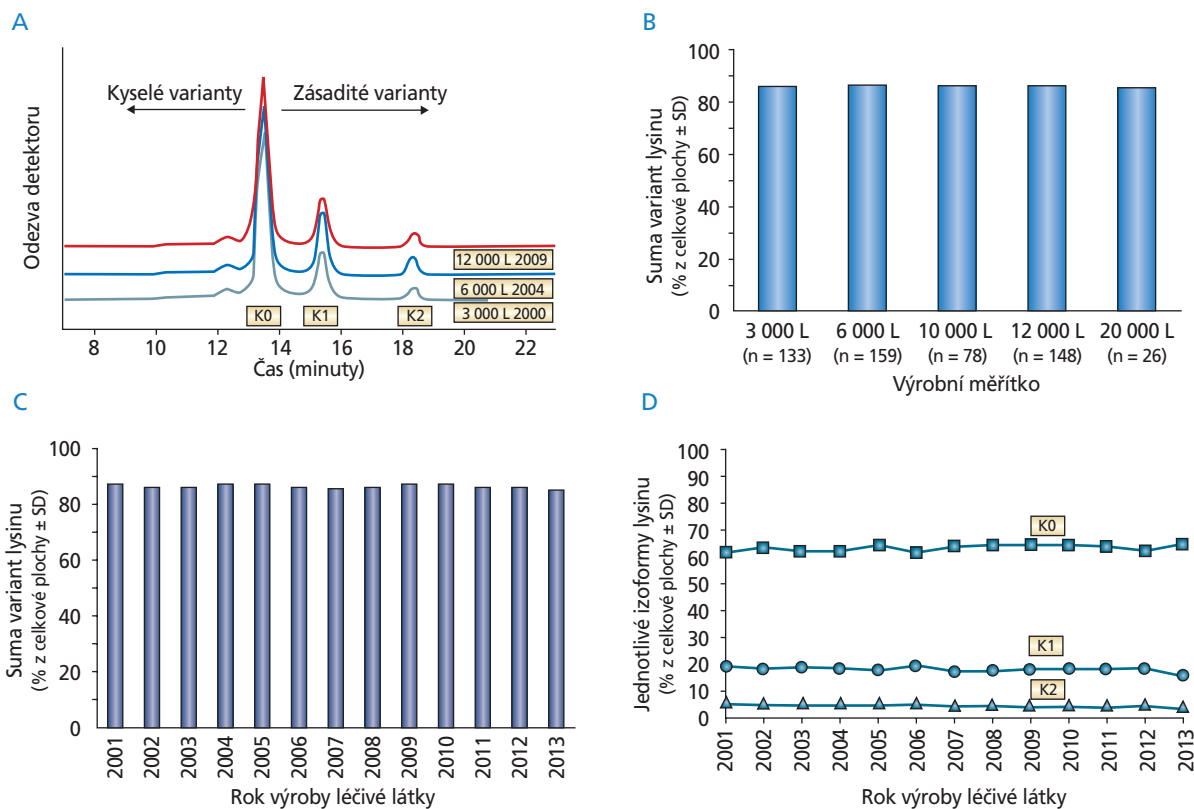
na řadu změn provedených u originálních BLP po jejich uvedení na trh a na otázku posunu v účinnosti a bezpečnosti těchto BLP po provedených změnách. Výrobci originálních BLP jsou si toho vědomi a ve vědecké literatuře se začínají objevovat studie zabývající se posouzením kvality původních BLP po provedených změnách během jejich existence na trhu, jako je tomu v publikované studii posuzující kvalitu přípravku Humira.<sup>5</sup>

Přípravek Humira s účinnou látkou adalimumabem byl v Evropské unii registrován v roce 2003. Od té doby se zvyšovala jeho spotřeba, z čehož vyplynula potřeba zvětšení objemu produkce a vzniku nových výrobních míst. S tím souvisela celá řada provedených změn ve výrobním procesu.<sup>6</sup> Zmíněná publikovaná studie<sup>5</sup> hodnotí strukturální vlastnosti, účinnost a stabilitu 544 vyrobených šarží Humiry v průběhu 12 let výroby a zvětšování objemu jeho produkce.

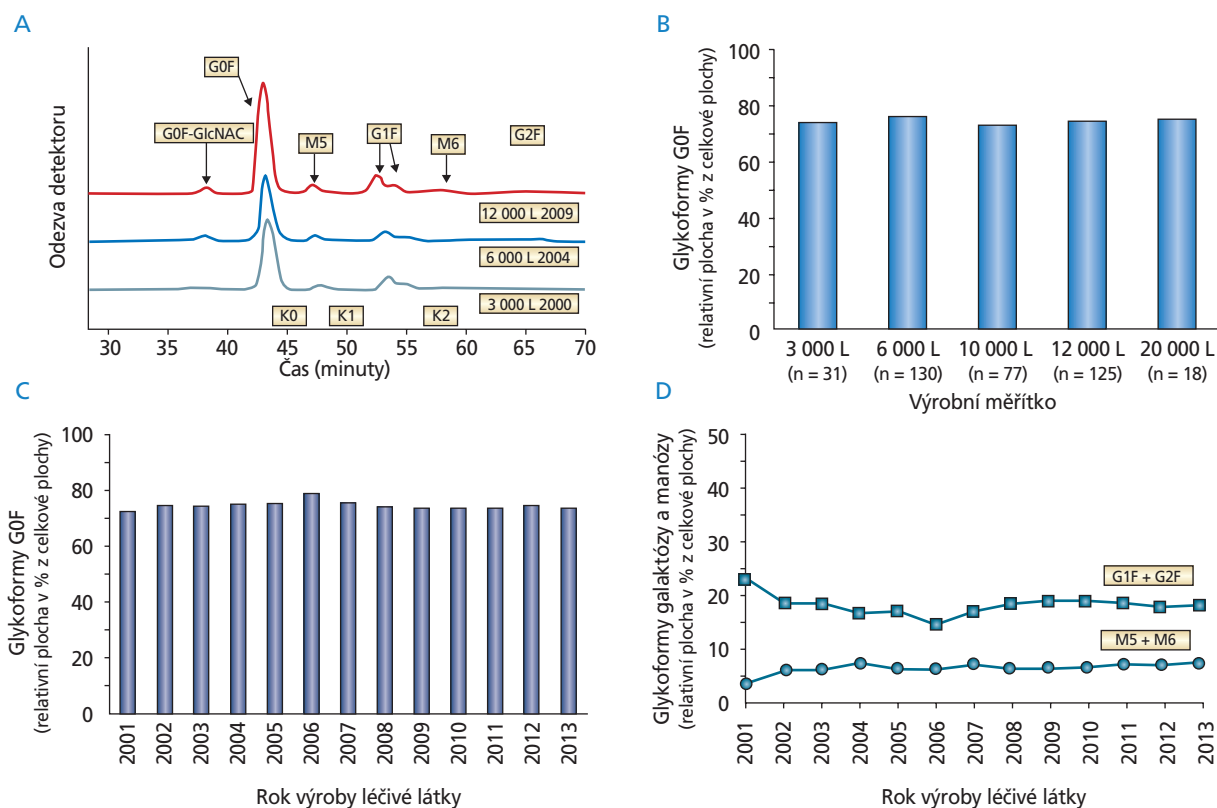
K hodnocení konzistence výrobních procesů se nejčastěji využívají elektrický náboj molekuly a glykosylace, neboť jsou citlivé na změny ve výrobním procesu. Změny náboje mohou mít dopad na vazebnou afinitu protilátky, tvorbu agregátů, plazmatický poločas nebo stabilitu během skladování.<sup>7</sup> Glykosylace má vliv na vazbu protilátky na Fc receptory, čímž ovlivňuje také její clearance, cytotoxicitu závislou na protilátkách i na komplementu a plazmatický poločas.<sup>7-10</sup>

Ve studii se homogenita šarží z hlediska elektrického náboje hodnotila slabou katexovou vysokoúčinnou kapali-

obrázek 4 Hodnocení lysinových izoformů přípravku Humira (Bližší vysvětlení v textu) (Podle 5)



obrázek 5 Hodnocení glykosylace přípravku Humira (Blíže vysvětlení v textu) (Podle 5)



novou chromatografií (WCX-HPLC), která byla schopna oddělit izoformy lysinu. Profil lysinových izoform přípravku Humira v průběhu 12 let na trhu je znázorněn na obrázku 4, kde K0–K2 znamená počet kyselých, C-terminálních izoform lysinu (obrázek 4A a 4D). Z obrázku je patrná minimální variabilita, což dokládá, že ani v souvislosti se zvyšováním objemu produkce (obrázek 4B), ani postupně během 12 let výroby adalimumabu (obrázek 4C) nedošlo z tohoto hlediska k žádným podstatným změnám.

Hodnocena byla také homogenita různých šarží přípravku Humira z hlediska druhu a výskytu jednotlivých oligosacharidů, v tomto případě pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s normální fází (NP-HPLC). Z obrázku 5A a 5D je patrné, že relativní množství agalaktosylovaných fukosylovaných oligosacharidů (GOF), fukosylovaných oligosacharidů obsahujících galaktózu (G1F, G2F) i glykanů s vysokým obsahem manózy (M5, M6) zůstalo během zvyšování objemu produkce (obrázek 5B) i v čase (obrázek 5C) konzistentní. Přítomnost glykanů s vysokým obsahem manózy v Fc oblasti monoklonálních protilátek stimuluje jejich clearance, a je proto považována za důležitý atribut kvality produktu.<sup>5</sup>

Vedle analýzy strukturálních vlastností adalimumabu byla posuzována také jeho schopnost vázat TNF.<sup>5</sup> K tomu byla využita metoda anti-TNF ELISA s rekombinantním lidským TNF. Konzistence z hlediska vazby ligandu a afinity pro solubilní TNF se promítá do funkční schopnosti protilát-

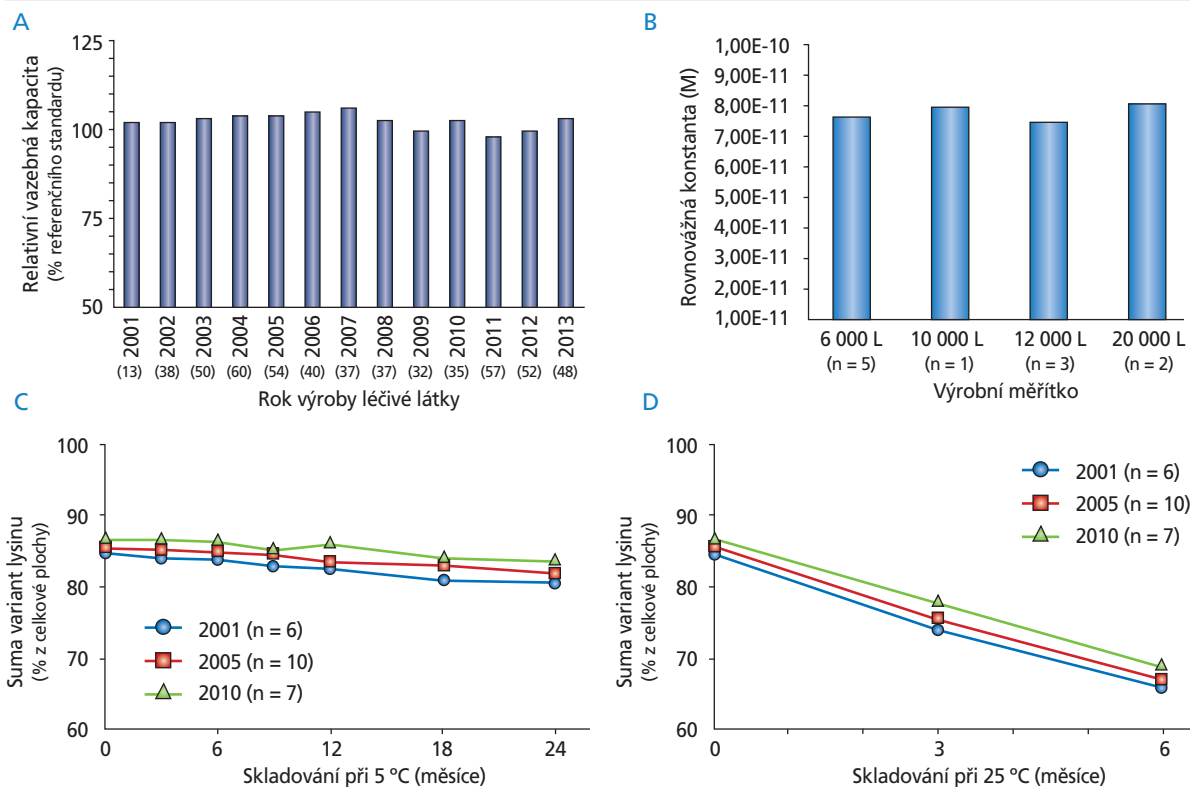
ky bránit cytotoxicitě indukované TNF. Schopnost vazby TNF se během celého sledovaného období pohybovala v rozmezí 7 % v porovnání se zavedeným referenčním standardem. Vazebná kapacita Humiry pro TNF s průměrnou disociační konstantou  $7,66 \times 10^{-11}$  M byla konzistentní v čase (obrázek 6A) i během zvyšování objemu produkce (obrázek 6B).

Zjišťována byla rovněž stabilita Humiry v podmínkách normálního skladování (při 5 °C) a v podmínkách zrychleného testování (25 °C) prostřednictvím změn množství lysinových variant. U vzorků skladovaných po dobu 24 měsíců při teplotě 5 °C byla prokázána stabilita z hlediska množství lysinových variant (obrázek 6C); při vyšší teplotě byla pozorována akcelerace změn vzniklých v souvislosti se skladováním (pokles množství lysinových variant, obrázek 6D), které přitom byly konzistentní pro všechny hodnocené vzorky.

## Závěr

V současné době není možné detailně zjistit strukturu složitých monoklonálních protilátek, které jsou jakožto produkt živých organismů přirozeně proměnlivé, což vyvolává řadu otázek týkajících se kvality a podobnosti BLP obsahujícího tyto velké molekuly. Pro převážnou většinu biologických léků je k dispozici velmi málo poznatků týkajících

obrázek 6 Hodnocení vazebné schopnosti a stability přípravku Humira (Bližší vysvětlení v textu) (Podle 5)



se kvality výroby, ojediněle dostupné údaje přitom svědčí o poměrně široké variabilitě. Výsledky uvedené studie hodnotící sérii kvalitativních vlastností Humiry svědčí o konzistentním a přísně kontrolovaném výrobním profilu v průběhu více než deseti let výroby, během zvyšování objemu její

produkce na několika výrobních místech. Uvedená komplexní analýza prokazuje, že mikroheterogenita přípravku Humira je časově konzistentní a pohybuje se v úzkém rozmezí variability z hlediska strukturálních, fyzikálně-chemických i funkčních vlastností.

#### Literatura

- Vzdělávací program pro bioproceny a biologické léčivé přípravky, National Institute for Bioprocessing research and training, Dublin, 2014.
- Ramanan S, Grampp G. Drift, evolution, and divergence in biologics and biosimilars manufacturing. *Biodrugs* 2014;28:363–72.
- Szymczak MM, Friedman RL, Uppoor R, et al. Detection, measurement, and control in pharma manufacturing. *Pharm Technol* 2011;35:70–6.
- European Medicines Agency. Comparability of biotechnological/biological products subject to changes in their manufacturing process. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500002805.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002805.pdf).

- Tebbey PW, Varga A, Naill M, et al. Consistency of quality attributes for the glycosylated monoclonal antibody Humira® (adalimumab). *mAbs* 2015;7:805–11.
- European Medicines Agency, 2014. Humira procedural steps taken and scientific information after authorization. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Procedural\\_steps\\_taken\\_and\\_scientific\\_information\\_after\\_authorisation/human/000481/WC500050869.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Procedural_steps_taken_and_scientific_information_after_authorisation/human/000481/WC500050869.pdf)
- Jiang XR, Song A, Bergelson S, et al. Advances in the assessment and control of the effector functions of therapeutic antibodies. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10:101–11.

- Alessandri L, Ouellette D, Acquah A, et al. Increased serum clearance of oligomannose species present on a human IgG1 molecule. *mAbs* 2012;4:509–20.
- Dalziel M, Crispin M, Scanlan CN, et al. Emerging principles for the therapeutic exploitation of glycosylation. *Science* 2014;343:1235681.
- Abes R, Teillaud J. Impact of glycosylation on effector functions of therapeutic IgG. *Pharmaceuticals* 2010;3:146–57.