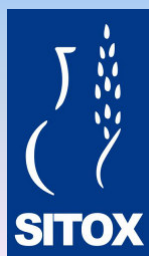


## Farmaci Biologici

### Vaccini Virali Attenuati

*Lucia Fiore*  
**CRIVIB- Reparto Vaccini Virali**  
**ISS**



SOCIETÀ ITALIANA DI TOSSICOLOGIA

Qualità e sicurezza dei farmaci biologici e  
dei farmaci prodotti con biotecnologie  
(biotecnologici)

*Roma, 17 maggio 2011*  
Università di Roma "La Sapienza"



- Il primo vaccino attenuato realizzato da **Edward Jenner nel 1796** contro il **vaiolo umano** usando ceppi eterologhi.

**Louis Pasteur** cento anni dopo dimostrava che si poteva indurre immunità utilizzando **microrganismi omologhi modificati**, sia nella loro virulenza, sia con la loro inattivazione totale.

Dagli studi di **Louis Pasteur** fino ad oggi, sono stati molti i vaccini sviluppati contro diverse malattie d'origine batterica e virale, utilizzando diversi metodi, **sia per attenuare la virulenza** degli agenti infettivi e selezionare ceppi non virulenti, **sia mediante l'inattivazione** totale degli stessi.



### Che cos'è un vaccino attenuato?



Un vaccino attenuato è un agente infettivo vivo omologo a quello che produce la malattia, ma la cui virulenza è stata attenuata, in modo da indurre immunità duratura contro l'agente omologo virulento senza produrre malattia.

Vaccino può essere realizzato a partire, o da **ceppi attenuati in modo naturale, isolati da persone asintomatiche o con lieve sintomatologia** (Rotarix, GSK), o **attraverso un certo numero di passaggi in cellule**, (cellule primarie provenienti dal rene di scimmia (Polioral), in cellule umane diploidi, linee cellulari continue) o passaggi in animali.

I virus perdano la loro virulenza ma continuano ad avere la capacità di replicarsi o moltiplicarsi nell'ospite e di essere processati dal sistema immunitario evocando una risposta immune e protettiva verso le malattie.

I più comuni **Vaccini Virali Vivi Attenuati** usati nell'infanzia sono quelli contro i **Poliovirus, Morbillo, Rosolia, Parotite, Varicella, Rotavirus, Febbre Gialla** (per i viaggiatori zone endemiche)

Hanno un'alta specificità verso un solo tipo di infezione, di conseguenza le formulazioni vaccinali contengono diverse componenti se in natura esistono più sierotipi.

Richiedono speciali accorgimenti di conservazione (**catena del freddo, per evitare che il microrganismo muoia parzialmente o totalmente**), ma hanno il vantaggio di determinare una buona risposta immunitaria con un'unica somministrazione o al massimo due-tre richiami.

Con l'eccezione **dei vaccini antipolio e antirotavirus, assunti per via orale**, generalmente i vaccini vivi attenuati sono somministrati per via **intramuscolare** (morbillo, rosolia, parotite, varicella) **o sottocute** (febbre gialla)

I vaccini contengono anche piccole quantità di conservanti e antibiotici e alcuni contengono stabilizzanti in modo che rimangano inalterati in situazioni quali cambiamenti di temperatura, umidità ecc.



#### VACCINI **ATTENUATI**

Stimolazione CD 4+ y CD 8+  
CITOCHINE (Interferone)  
MINOR ANTIGENE  
MINOR STABILITA'  
MEMORIA  
MENO SICURI  
ADIUVANTI NON CRITICI

#### VACCINI **INATTIVATI**

Fondamentalmente CD 4+  
Meno CITOCHINE  
MAGGIOR ANTIGENE  
MAGGIOR STABILITA'  
MEMORIA  
PIU' SICURI  
ADIUVANTI CRITICI

Il principale problema dei vaccini vivi attenuati è che l'attenuazione può non essere stabile, e si possa così ritornare a forme virulente.

**Il vaccino antipolio di Sabin può raramente (frequenza di 1:600.000 – 1.000.000) indurre paralisi nei soggetti vaccinati con la prima dose.**

**Il vaccino antirotavirus può raramente causare intussuscezione nei soggetti vaccinati** gli altri vaccini danno reazioni minori.

I vaccini vivi attenuati **non vanno somministrati a persone con difetti del sistema immunitario** perché possono ritornare a forme virulente, persistere e causare la malattia

I vaccini vivi attenuati inducono una **risposta immunitaria mucosale e umorale (IgA) superiore ai vaccini inattivati**

- □ I vaccini contro la polio, il morbillo, la parotite e la rosolia proteggono più del 95% dei bambini che hanno completato il calendario previsto di vaccinazione.

Questi vaccini oltre a proteggere le persone immunizzate, diminuiscono anche il numero di suscettibili alla malattia conferendo *herd immunity* o immunità di branco ai contatti e rallentano la circolazione dei virus.

Poiché i vaccini sono dati a persone sane, è necessario che siano garantiti i più elevati standard di sicurezza.

Come risultato di questo principio i vaccini sono tra i farmaci più sicuri che possiamo ricevere.

□

## Autorizzazione all'immissione in commercio Art. 6 dir 2001/83/CE art.6 D.Lvo 219/2006

- Un vaccino può essere immesso sul mercato nell'area economica europea (EEA) solo dopo aver ricevuto una **autorizzazione all'Immissione in Commercio (AIC)** da parte di un'autorità competente di uno stato membro o quando viene rilasciata una autorizzazione comunitaria dalla CE valida sull'intero territorio Eu.
- **Variazioni ed estensioni dell'AIC** sono autorizzate ai sensi dello stesso art.6.

## NORMATIVE DI RIFERIMENTO

### Direttive da applicare per le AUTORIZZAZIONI / VARIAZIONI secondo le Procedure Comunitarie

Directive 2001/83/ EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use. OJ L311, 28.11.2001.

Directive 2004/27/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 amending Directive 2001/83/EC on the Community code relating to medicinal products for human use. OJ L136/34, 30.04.2004.

Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 laying down Community procedures for the authorisation and supervision of medicinal products for human and veterinary use and establishing a European Medicines Agency. OJ L136/1, 30.04.2004

D.Lgs. 24 aprile 2006, n. 219. Attuazione della direttiva 2001/83/CE (e successive direttive di modifica) relativa ad un codice comunitario concernente i medicinali per uso umano, nonché della direttiva 2003/94/CE. G.U. 21 giugno 2006, n. 142 (S.O.).

D.L.vo 29 dicembre 2007, n. 274. Disposizioni correttive al decreto legislativo 24 aprile 2006, n. 219, recante attuazione della direttiva 2001/83/CE relativa ad un codice comunitario concernente Medicinali per uso umano. G.U. 14 febbraio 2008, n. 38.

### Autorizzazione all'immissione in commercio di farmaci con **Procedura Nazionale** Presentazione della richiesta della Ditta di AIC → AIFA → valutatori ISS **Polioral (antipolio)** Dossier di registrazione in formato CTD

#### Modulo 1 (Dati amministrativi)

#### Modulo 2 (introduzione e riassunti della parte di qualità, degli studi non-clinici e clinici)

#### Modulo 3 (Quality)

3.1 Table of Contents

3.2 Body of Data

#### 3.2.S Drug Substance

3.2.S.1 General Information

#### 3.2.S.2 Manufacture

3.2.S.3 Characterization

#### 3.2.S.4 Control of Drug Substance

#### 3.2.S.5 Reference Standards or Materials

3.2.S.6 Container Closure System

#### 3.2.S.7 Stability

#### 3.2.P Drug Product

3.2.P.1 Description and Composition of the Drug Product

3.2.P.2 Pharmaceutical Development

#### 3.2.P.3 Manufacture

#### 3.2.P.4 Control of Excipients

#### 3.2.P.5 Control of Drug Product

#### 3.2.P.6 Reference Standards or Materials

3.2.P.7 Container Closure System

#### 3.2.P.8 Stability

3.2.A Appendices

3.2.A.1 Facilities and Equipment

3.2.A.2 Adventitious Agents Safety Evaluation

#### Modulo 4 (Nonclinical Study Report)

#### Modulo 5 (Clinical Study Report)

## **Variazioni di Tipo II**

### **Polioral (vaccino antipolio)**

**Richiesta di variazione da parte della Ditta  
di tipo II → AIFA → valutatori ISS**

**Valutazione delle Sezioni del CTD modificate in seguito all'introduzione  
della variazione**

**In particolare i dati sperimentali per la convalida  
del nuovo processo di produzione**

## **Assessment Report**

**Documento (parere) che contiene la valutazione scientifica  
degli esperti ISS che viene inviata all'AIFA e quindi  
alla Ditta**

Eventuale richiesta, se necessario, di informazioni aggiuntive tecniche o  
procedurali (list of Questions)

## Rinnovo AIC

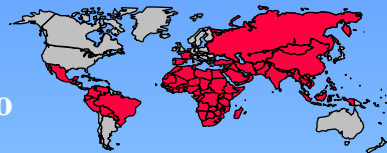
Dopo 5 anni dall'Immissione in Commercio il titolare dell' AIC deve presentare una richiesta di rinnovo dell' AIC.

In questa occasione vengono rivalutati aspetti di qualità, efficacia e sicurezza. La Ditta deve registrare tutte le **reazioni avverse osservate in Italia, Eu, Paesi terzi.**

Casi di poliomielite 1988 > 350.000/anno  
**125 paesi endemici**



## Vaccini Antipolio



Il Programma di Eradicazione Mondiale della poliomielite lanciato nel **1988 dall'OMS** ha conseguito enormi risultati  
Il sierotipo 2 selvaggio è stato eradicato

**Rimangono ancora 4 Paesi endemici per la polio:  
Africa, India, Pakistan e Afganistan**

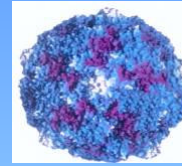
La Regione Europea dell'OMS (che include l'Italia) è stata dichiarata  
Polio – Free nel 2002

**L'Italia ha adottato nel 2002 il vaccino inattivato di Salk**

Il vaccino orale di Sabin prodotto in Italia (Novartis) nelle varie formulazioni (trivalente e monovalente) controllato dall'ISS non è più usato in Italia ma **viene rilasciato per mercato estero**  
**“United Nations” UNICEF**

## Vaccino antipolio orale di Sabin

- Vaccino virale
- Vivo, Attenuato
- Trivalente (sierotipi 1, 2 e 3)
- Monovalente 2005 (sierotipo 1 o 3) (**prodotti da Novartis dal 2008**)
- Bivalente 2010 (sierotipi 1 e 3) (**prodotto da Novartis nel 2011**)
- Somministrazione orale (confezioni 20ds, 10ds e 1ds)
- Sterile (preparato in asepsi)
- **Normativa: Eu. Ph. 0215 and WHO-TRS 904**



**I Vaccini Monovalenti prodotti da Novartis sono stati autorizzati all'immissione in commercio attraverso una procedura "Fast Track"**

**Non sono stati richiesti alla Ditta i trials clinici** essendo i vaccini monovalenti già registrati e usati nelle **fasi iniziali della vaccinazione "anni '60"** l'OMS ha chiesto che si potessero utilizzare i dati dei trials clinici effettuati con lotti prodotti da altre Ditte essendo stati usati gli stessi Master Seed e le stesse Formulazioni.

## Vaccino OPV

### Norme Soprannazionali

European Pharmacopoeia Monograph 6.1, 2008. Poliomyelitis vaccine (oral) 04/2008:215.

European Pharmacopoeia Monograph 6.0, 2008. Test for neurovirulence of poliomyelitis vaccine (oral) 01/2008:2.6.19

European Pharmacopoeia Monograph 6.0, 2008. Poliomyelitis vaccine (oral) 01/2008:0215

### Norme Nazionali

D. ACIS 15 novembre 1956. Registrazione e controllo di Stato del vaccino antipoliomielitico. G.U. 26 gennaio 1957, n.23.

D.M. 10 agosto 1962. Registrazione e controllo di Stato dei vaccini poliomiolitici preparati con virus vivi attenuati. G.U. 5 settembre 1962, n.224.

D.M. 19 gennaio 1990. Modificazioni e aggiornamento del decreto ministeriale 30 agosto 1962 sulla registrazione e controllo di Stato di vaccini poliomiolitici preparati con vaccini vivi attenuati. G.U. 15 febbraio 1990, n. 38.

D.M: 7 aprile 1997. Procedure tecniche per il controllo di Stato per il vaccino antipoliomielite. G.U. 20 giugno 1997, n. 142.

### Linee Guida Europee

Official Control Authority Batch Release of Monovalent Bulk Poliomyelitis vaccine (oral) (OPV). PA/PH/OMCL (2007) 505.

Official Control Authority Batch Release of Trivalent Poliomyelitis vaccine (oral) (OPV). PA/PH/OMCL (2007) 519.

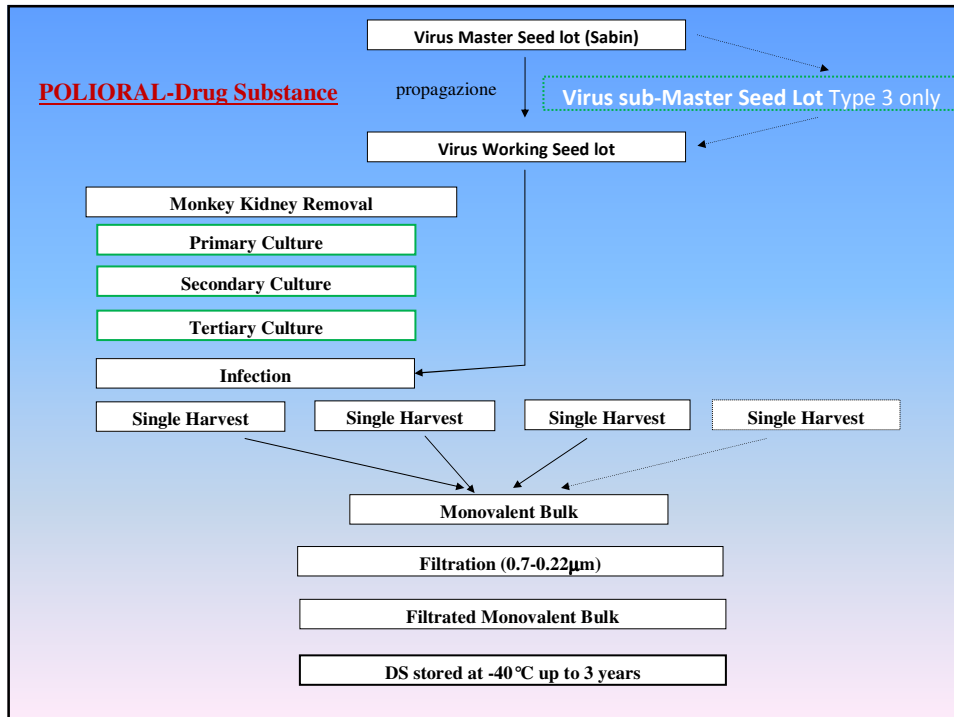
Official Control Authority Batch Release of Poliomyelitis Vaccine (Inactivated) (IPV). PA/PH/OMCL (2007) 491.

European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM) - OCABR: OPV transgenic mouse test PA/PH/OMCL (07) 53 DEF.

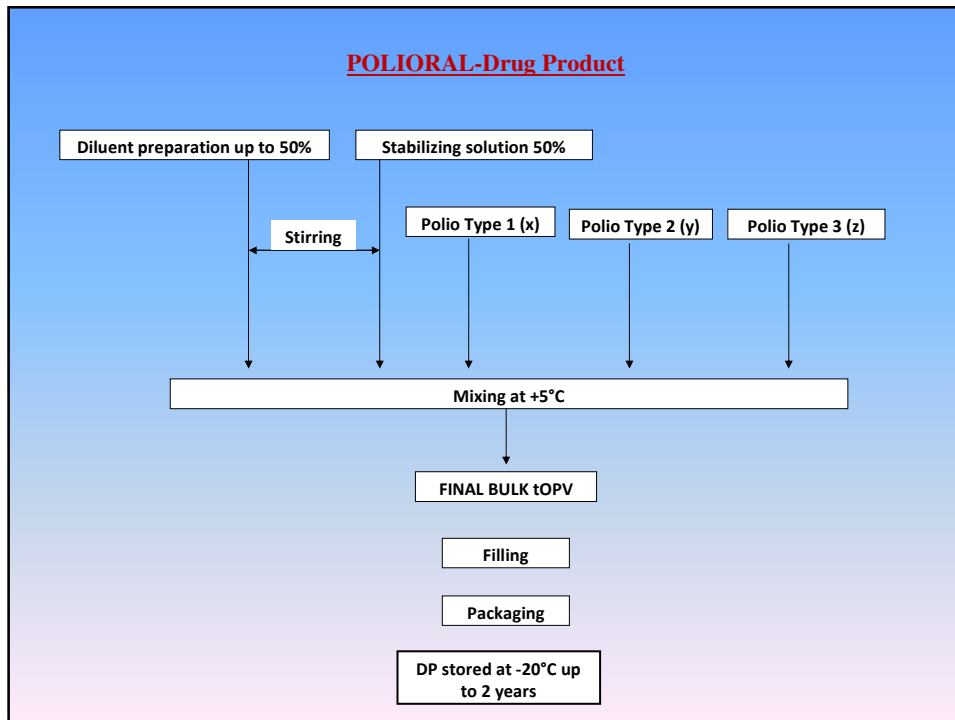
Linea Guida: Recommendations for the production and control of poliomyelitis vaccine (oral). WHO Technical Report Series, n. 904, 2002.

Linea Guida: Procedure for assessing the acceptability, in principle, of vaccine for purchase by United Nations agencies. WHO/V&B/02.08.

E Dragunski, K Karpinski, DJ Wood: "Neurovirulence test of type 1, 2 or 3 live poliomyelitis vaccines (oral) in transgenic mice susceptible to poliovirus" version 2 FDA (USA) and NIBSC (UK).



## POLIORAL-Drug Product



## IPC and Release tests-DS

### Test on Animals used for Production

Autopsy  
 Antibodies against Herpes-B virus  
 Antibodies against SV40/polyoma virus  
 Antibodies against Foamy virus  
 Antibodies against SIV  
 Antibodies against CMV  
 Antibodies against Marburg virus  
 Antibodies against Ebola virus  
 Test for Tuberculosis

### Test on Control Cells

Observation  
 Haemadsorbing viruses  
 Extraneous agents  
 Mycoplasma  
 Sterility

### Test on Single Harvest

Identity  
 Potency  
 Extraneous agents  
 Mycoplasma  
 Mycobacterium tuberculosis  
 Sterility  
 Reverse transcriptase

**MAPREC per il sierotipo 3**

Marker T test (for Monovalent Bulk Suspension type 3 only)

### Test on Monovalent Bunks before Filtration

Potency  
 Adventitious agents  
 Bioburden

### Test on Monovalent Bunks after Filtration

Identity  
 Potency  
 Marker T Test  
 Sterility  
 Mycoplasma  
**Neurovirulence (Monkeys or Mice)**  
 Marker D test  
 Reverse transcriptase  
**MAPREC per il sierotipo 3**

### Parameters monitored

CO<sub>2</sub>  
 pH  
 Temperature  
 Time

## IPC and release tests-DP

### **Parameters monitored**

Volume of formulation (by weight)  
Rotation Speed  
Duration of formulation and filling  
Hourly weight check (for each needle and for each machine)

### **Test on Final Bulk**

Sterility

### **Test on Finished Product**

#### **Appearance**

#### **Identity**

Sterility  
Extractable Volume  
Magnesium Chloride content  
pH

#### **Potency**

**Accelerated Stability Titer (48 hr at 37°C)**

## Controllo di Stato dei Vaccini art.138 del DL.vo 129/2006

- **Prima della distribuzione ogni lotto è sottoposto a Controllo di Stato**
- **Decreto 31/3/2008 “Prescrizioni e procedure tecniche per l’esecuzione dei controlli dei lotti di medicinali immunobiologici e medicinali derivati dal sangue e dal plasma umani” che affida l’incarico ad ISS – OMCL.**
- **EDQM guidelines** (European Directorate for the Quality of Medicines –Strasbourg (Fr)) indicano i saggi che OMCL deve eseguire sui vari tipi di vaccini al fine **armonizzare le procedure di controllo.**
- **Mutuo Riconoscimento:** Il controllo eseguito da OMCL non deve essere ripetuto.
- **OMCL deve operare in un sistema di assicurazione della qualità (ISO17025)**
- Ogni OMCL prepara un **Annual Report** della propria attività che presenta all’OMCLs Network (**Annual Meeting**)

## Controlli eseguiti dall' ISS sul vaccino OPV

Batch release

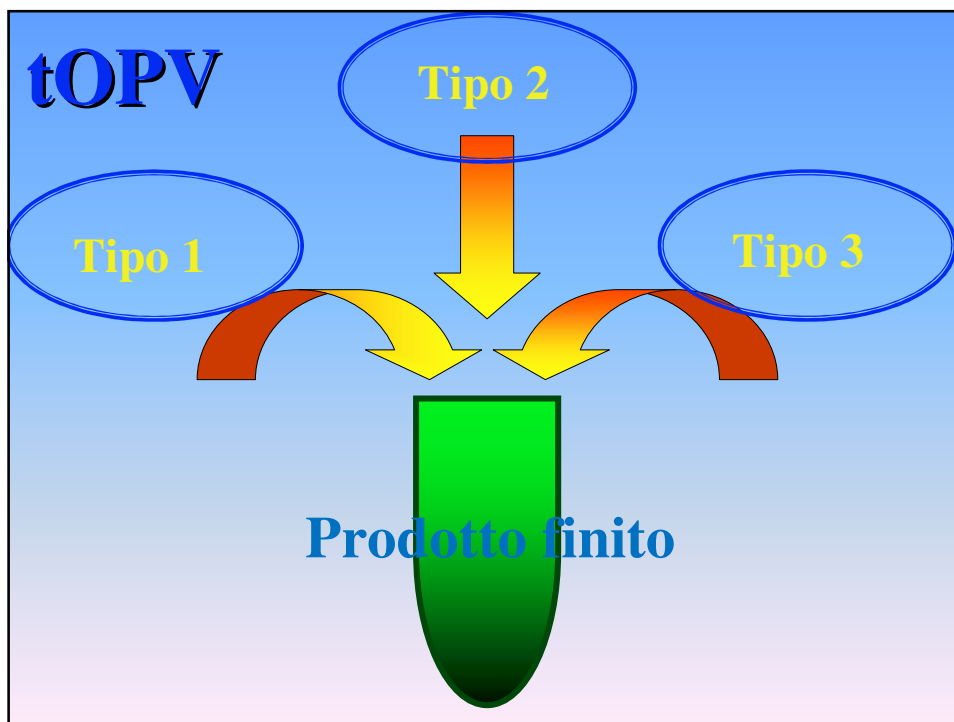
### Bulk lots/ Working Viral Seeds

**Monkey Neurovirulence test (MNVT)** I lotti di Bulks Monovalenti vengono sottoposti a un esame e valutazione indipendente dei preparati istologici (secondo set di vetrini) forniti dalla Ditta

**Mouse neurovirulence test (mNVT)** I lotti di Bulks monovalenti sono sottoposti ad una valutazione indipendente da parte dell'ISS dell'esame clinico dei topi inoculati. Valutazione effettuata in parallelo e alcuni giorni presso la Ditta

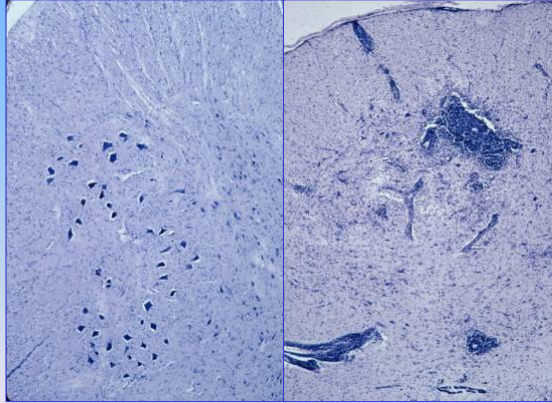
**Accreditamento operatori** per la lettura dei Vetrini (scimmia) e per l'Esame Clinico (topi transgenici)

**MAPREC per il tipo 3 in futuro anche per il tipo 1 e 2**  
condotto indipendentemente dall' ISS



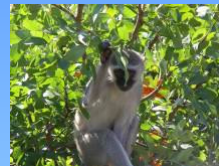
# OPV Monkey Neurovirulence Test (MNVT) sui BULKS MONOVALENTI

## Regione lombare



## Dettagli del saggio

- ◆ Scimmie usate: *Macaca fascicularis*
- ◆ Numero di scimmie analizzate:
  - tipo 1:** 14 mnks/vaccino + 14 mnks/referenza SO+2
  - tipo 2:** 14 mnks/vaccino + 14 mnks/referenza SO+2
  - tipo 3:** 20 mnks/vaccino + 20 mnks/referenza SO+2
- ◆ Numero di vetrini da esaminare :



**Midollo Spinale**      12 lumbar sections / 2 slides  
                                 10 cervical sections / 2 slides

**Cervello**              2 medulla oblungata / 1 slide  
                                 1 pons/cerebellum / 1 slide  
                                 1 midbrain / 1 slide  
                                 1 thalamus / 1 slide  
                                 1 cortex / 1 slide

**29 sezioni/  
scimmia**

## Validità del saggio MNTV

- La validità di un lotto di vaccino (o semente virale) dopo test di MNVT avviene tramite confronto fra i risultati ottenuti su una Referenza e quelli ottenuti sul vaccino (o sulla semente virale) in esame. **Il parametro oggetto dei confronti è il MLS (Mean Lesion Score)**, un punteggio derivante dalla media dei punteggi attribuiti a tutti i veterinari relativi a tutti i primati in esame, dopo la loro lesione. Questa quantità verrà indicata con  $X_{ref}$ , nel caso della Referenza "attuale"  $X_{ref}$  nel caso del vaccino in esame e nel caso della media *pooled* relativa alle ultime 5 Referenze testate prima di quella in esame ("attuale"). Oltre al calcolo del MLS verrà stimata, per le 5 Referenze testate precedentemente a quella "attuale", la loro variabilità *pooled*, calcolando la Varianza *within-test* ( $S^2$ ).

- Validità del Vaccino (o del VS)**

Una volta verificata la validità della Referenza "attuale" si può passare alla verifica della validità del Vaccino (o VS) analizzando i risultati del MLS presenti nel Foglio "VACC" del File Excel originale (sempre nella cella AK37); tale valore rappresenterà la quantità  $X_{ref}$ .

Una volta calcolata la differenza fra il MLS della Referenza "attuale" e quello del Vaccino in esame (cioè la quantità " $X_{ref} - X_{ref}$ "), per poter concludere sulla validità del vaccino essa va confrontata con alcuni valori  $C_1$  e  $C_2$ , secondo il seguente schema:

Condizione	Esito
$SE (X_{ref} - X_{ref}) < C_1$	Esito Favorevole
$SE C_1 < (X_{ref} - X_{ref}) < C_2$	Vaccino verrà Ritestato
$SE (X_{ref} - X_{ref}) > C_2$	Esito NON Favorevole

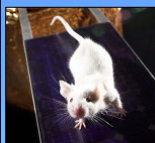
I valori  $C_1$  e  $C_2$  vengono calcolati secondo le seguenti formule:

$$C_1 = 2,3 \cdot \sqrt{2 \cdot S^2 / N_1} \quad ; \quad C_2 = 2,6 \cdot \sqrt{2 \cdot S^2 / N_1}$$

Con  $N_1$  = numero di primati validi nel test relativo al vaccino in esame



- ◆ **Confronto dei risultati ottenuti dall'ISS con quelli della Ditta e rispetto alle specifiche richieste**
- ◆ **Analisi statistica indipendente effettuata dall'ISS anche sui valori forniti dalla Ditta**



## Test di neurovirulenza in topi transgenici per il recettore di poliovirus

**1990-1991:** Allestimento di linea di topi transgenici TgPVR21 per il test NVT (V. Racaniello et al. 1990; A. Nomoto et al. 1991)

**1993-2000:** Studio collaborativo internazionale  
Approvazione Commissione "Biological Standardization" WHO del test di NVT in topi per il rilascio di bulks monovalenti di vaccino OPV

**Esecuzione test mNVT:** presso Azienda produttrice del Vaccino

**Abilitazione operatore:** (NIBSC) Training, studi collaborativi internazionali

**Autorità Nazionale di Controllo:** valutazione clinica in parallelo, ma in modo indipendente, dei topi nella fase post-inoculo (**giorni 3° e 4° e fine test**) presso la Ditta

**Richiesta di Autorizzazione ad eseguire il test neurovirulenza su topo da parte della Ditta all'AIFA (**Variazione di tipo II**) 2007**

- **Valutazione delle Sezioni del CTD modificate in seguito all'introduzione della variazione**
- Analisi della documentazione approvata dal NIBSC (UK) che accredita gli operatori per questo saggio contenente:
- Training panel (2 test separati di due differenti campioni insieme alla referenza)
- Implementation panel (3 test)
- **Test di neurovirulenza in parallelo topo e scimmia (4 test)**

Novartis ha introdotto mNVT:

- Nel **2008** per polio **tipo 3**
- Nel **2010** per polio **tipo 1**

Il **Tipo 2** sarà presentato all'AIFA nel **2012**

## Normative/Linee Guida

**Curr. Ph Eur Monograph 0215 Poliomyelitis Vaccines (oral )**

**WHO Standard Operating Procedure : Neurovirulence Test of Type 1,2 or 3 Live Poliomyelitis Vaccines (oral) in transgenic mice susceptible to poliovirus**

**OCABR guideline for training and maintenance of competence of OMCL observers for the transgenic mouse test for evaluation of OPV Neurovirulence**

**PA/PH/OMCL (10) 11R OCABR: Strategy for Independent Testing of OPV Bulks**

**PA/PH/OMCL (10) 11R OCABR: OPV transgenic Mouse test**

## Esecuzione del test

Test *in vivo* basato esclusivamente sulla clinica dei topi inoculati con vaccino.  
(attualmente poliovirus tipo 3 e 1), **suddivisibile in 3 fasi**.

### Fase I pre-inoculo

- Arrivo topi TgPVR21 (età 5 settimane) di sesso maschile e femminile, controllo stato fisico, etc.
- Randomizzazione dei topi nelle gabbie secondo schema WHO (sesso, dose inoculo, ordine di inoculo)
- Marcatura dei topi
- Quarantena per 7 giorni
- Randomizzazione delle gabbie secondo ordine pre-stabilito
- Controllo peso
- Rasatura regione dorsale

## Esecuzione del test Fase II: inoculo intraspinale

N° topi: 16 maschi, 16 femmine per ogni condizione di inoculo

### Vaccino inoculato: (sierotipo 1 o 3)

- Referenza WHO alta dose
- Referenza WHO bassa dose
- Vaccino da testare alta dose
- Vaccino da testare bassa dose

### Sito e modalità di inoculo:

- Inserzione di ago di microsiringa tra l'ultima vertebra toracica e prima lombare ed avanzamento nel midollo spinale.
- Reazione ad uno o entrambi gli arti posteriori (Jerk).
- Iniezione del vaccino (5 ul).
- Reazione agli arti posteriori (Quiver).
- Registrazione su scheda delle reazioni.

### Personale: Anestesista

Responsabile Inoculo  
Assistente inoculo  
Compilatore records

## Esecuzione del test Fase III: post-inoculo

- **Esame clinico giornaliero per 14 giorni** e valutazione dell'abilità del topo ad aggrapparsi alla gabbia e della capacità di deambulazione su superficie piana.
- **OMCL esegue lo score clinico (3-4 gg e alla fine del test)**
- **Importante é la concordanza nello score clinico tra OMCL e Ditta**
- Registrazione sintomi clinici: debolezza, paresi, paralisi arti anteriori e posteriori
- Sacrificio dei topi gravemente compromessi
- Sacrificio dei topi rimasti alla fine del periodo di osservazione
- Assegnazione di "score" ai dati clinici osservati:

Debolezza	= 0
Paralisi parziale	= 1
Paralisi totale	= 1
- Esclusione dal test di paresi, paralisi da trauma e morti non specifiche
- **Analisi statistica** dei risultati ottenuti (confronto tra reference e vaccino) **ripetuta indipendentemente dall'ISS su tutti i dati forniti dalla Ditta.**

## INOCULO



## PRESI ARTO POSTERIORE DX



## PARALISI ARTI POSTERIORI



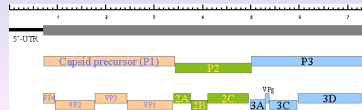
## OPV-Tg MICE NVT

- Il rilascio é essenzialmente basato su un' accurata valutazione della documentazione inviata dalla Ditta
- Il **10%** dei lotti viene saggiato in modo indipendente da un "sub-contracting lab. " accreditato (NIBSC,UK)
- Il contratto per il test indipendente **mNVT** (NIBSC/NOVARTIS/ISS) **stabilito a Maggio 2009.**

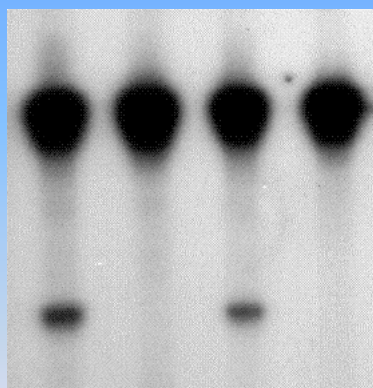
## Saggio MAPREC Mutant Analysis by PCR and Restriction Enzyme Cleavage

**Il saggio MAPREC è richiesto per il sierotipo 3 quando si utilizza il saggio di neurovirulenza sui topi transgenici**

- Durante la produzione di vaccino e la replicazione virale il genoma di polio accumula mutazioni.
- La **mutazione U472C nella regione 5' NCR** nell' OPV3 è associata con i lotti di vaccino che hanno fallito il MNVT.
- Mediante il saggio MAPREC è possibile quantificare la percentuale di virus che presentano questa mutazione in ogni sospensione madre (Single Harvest e Bulk Finale) di vaccino (approvato da WHO, EDQM come QC test).
- Sono stati condotti studi collaborativi e il MAPREC è oggi fattibile anche per OPV1 e OPV2



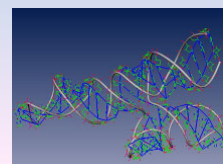
## Saggio MAPREC (PCR Quantitativa)



• 7 ctrl

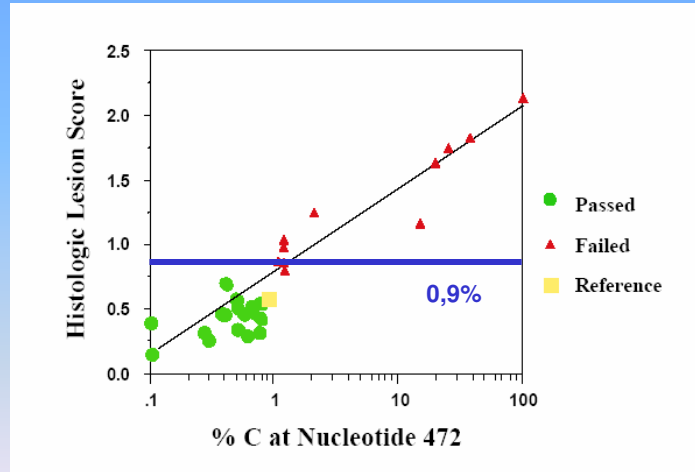
• 5X

**1 vaccino = 80 campioni**



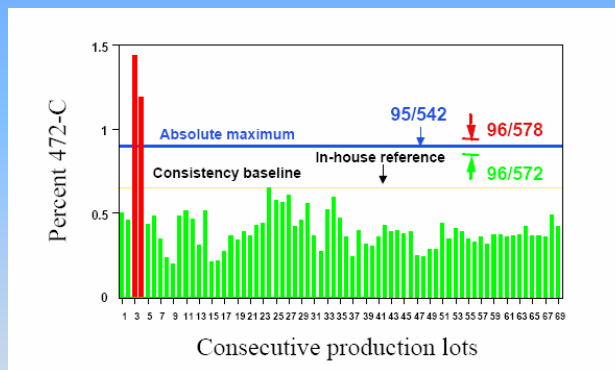
## Saggio MAPREC

### Limite di accettabilità



## Saggio MAPREC

### Consistenza del Vaccino



- \* Sorveglianza della stabilità genetica a lungo termine dei vaccini vivi.
- \* Miglioramento della sicurezza del vaccino.

## Controlli eseguiti dall' ISS sul vaccino OPV

### Batch release

### Prodotto finito

I lotti per **PUNICEF** sono rilasciati in compliance con le "Recommendations for the Production and Control of Poliomyelitis Vaccine (oral), WHO Technical Report Series, No. 904, 2002" and "WHO Recommendations for Vaccine Supply to UNICEF".

#### **Potenza**

Per essere accettabile un lotto OPV deve avere un titolo per ciascun sierotipo non inferiore a:

Poliovirus Tipo 1:  $10^{6.0}$  CCID<sub>50</sub>/Human dose

Poliovirus Tipo 2:  $10^{5.0}$  CCID<sub>50</sub>/Human dose

Poliovirus Tipo 3:  $10^{5.8}$  CCID<sub>50</sub>/Human dose

I lotti con valori non conformi per l' UNICEF (e.g., titolo per il Polio 3 minore rispetto alle specifiche ma superiore a ( $10^{5.5}$  CCID<sub>50</sub>/Human dose) sono rilasciate in accordo alle **specifiche dell' European Pharmacopoeia, 4<sup>th</sup> Edition.**

#### **Degradazione termica**

Al saggio di degradazione termica i lotti sono rilasciati se dopo il trattamento per (48h a 37°C) il decremento di titolo é minore o uguale a 0.5 log.

#### **Identità**

Conferma dei sierotipi presenti

#### **Appearance**

Assenza di corpi estranei, limpidezza etc

## Controlli eseguiti dall' ISS sul vaccino OPV

### Batch release UNICEF/WHO

### Prodotto finito

**Per tutti i lotti vengono esaminati i "Summary protocols " protocolli di produzione e controllo forniti dalla Ditta.**

Particolare attenzione alla verifica della conformità dei test di rilascio della Ditta alle specifiche di Farmacopea e/o riportate nel Dossier di Registrazione.

#### **Test di rilascio ISS (specifiche EP 0215 e WHO TRS 904 2002 annex1)**

**Trivalente OPV:** Saggi di Potenza, identità e stabilità (degradazione accelerata) effettuati su circa il **30%** dei lotti scelti random considerando anche il cambiamento di serie.

**Monovalente Tipo 1 e 3:** Saggi di potenza, identità e stabilità (degradazione accelerata) sono stati effettuati sul **100% dei lotti** (2008-2009) e sul **50% dei lotti dal 2010.**



## Vaccino antipolio inattivato di Salk (IPV)

**L'Italia ha introdotto il vaccino IPV/Salk nel 2002**

I vaccini IPV **non sono prodotti in Italia** ma sono importati dalle Ditte: Sanofi MSD, GSK and NVI con **Procedura di Mutuo Riconoscimento**

In collaborazione con L'AIFA

L'ISS esegue la sorveglianza Post – Marketing (**PMS**)

Programma annuale di controllo delle composizioni dei medicinali.

I NAS campionano presso farmacia o distributori i lotti di vaccino richiesti dall'AIFA-ISS

**Sui lotti prelevati l'ISS valuta (Potenza e Identità)**

## Vaccino Inattivato di Salk (IPV)

- Contiene i 3 sierotipi di poliovirus (1, 2 e 3 ) **selvaggi**
- Può presentarsi in formulazione singola o associato ad altri vaccini



## Vaccini con IPV in Commercio

Vaccini in forma singola:

**IMOVAX-Polio (Sanofi Pasteur)**

Vaccini in forma combinata:

**Pentavac** : tossoide difterico; tossoide tetanico tossoide pertussico ; emoagglutinina filamentosa; poliovirus inattivato, Haemophilus influenzae. **(Sanofi Pasteur)**

**Tetravac** : tossoide tetanico; tossoide pertussico ; emoagglutinina filamentosa; poliovirus inattivato **(Sanofi Pasteur)**

**Polio- Infanrix** : Diphtheria toxoid, tetanus toxoid, acellular pertussis vaccine, inactivated poliovirus, Haemophilus influenzae type b polysaccharide **(Glaxo Smith Kline)**

**Infanrix-hexa**: Diphtheria toxoid, tetanus toxoid, acellular pertussis vaccine, inactivated poliovirus, Haemophilus influenzae type b polysaccharide; Hepatite B **(Glaxo Smith Kline)**

## Attività di valutazione di Pareri richiesti dall'AIFA

### Modifica AIC

Procedure di mutuo riconoscimento con Italia CMS  
Natura delle variazioni: tipo II B

### Modifica AIN

Natura delle variazioni: tipo II B

- Arrivo in ISS della documentazione della Ditta e richiesta dell'AIFA.
- Inizio della valutazione dei dossier secondo la time-table indicata (per le MRP).
- Esame delle osservazioni pervenute dal Concerned Member State (CMS) nel PVAR.
- Eventuale richiesta, se necessario di informazioni aggiuntive tecniche o procedurali (list of Questions)
- Conclusione Procedura: emissione del FVAR

## Processo di produzione IPV

- |                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| 1) Inoculo virus su cellule Vero      |   |
| 2) Raccolta (Single Harvest )         | <i>Chiarificazione</i>                    |
| 3) Sospensione purificata concentrata | <i>Concentrazione e filtrazione</i>       |
| 4) Monovalenti 1, 2 e 3               | <i>Filtrazione e <b>Inattivazione</b></i> |
| 5) Concentrato trivalente             | <i>Miscelazione</i>                       |
| 6) Prodotto finito trivalente         | <i>Filling</i>                            |

**Le variazioni possono interessare una di queste fasi**

## Procedure di mutuo riconoscimento (MRP)

### **Variazioni di tipo II**

- Sono quelle variazioni che intervengono su prodotti già approvati mediante MRP.

### **Tempistica**

- RMS invia il proprio rapporto *Preliminary Variation Assessment Report (PVAR)* agli altri Paesi (CSM)                      entro                      day 40
- I Paesi (CSM) si esprimono    entro                      day 55
- Conclusione della procedura    entro                      day 60
- Blocco temporaneo della Procedura (clock stop) in caso di richiesta alla Ditta di ulteriore documentazione di supporto.

## Organizzazione del Dossier

- Il Dossier è accompagnato innanzitutto da **“Application for Variation to a Marketing Authorisation”** comprendente una serie di informazioni quali:
  - *Usa del farmaco (medico o veterinario)*
  - *N. Procedura*
  - *Reference Member State*
  - *Concerned Member States*
  - *Tipo di variazione*
  - **Variazione riguardante Quality**
  - *Ditta Applicante*
  - *Prodotto interessato alla variazione*
  - *Lista delle variazioni presentate nell’applicazione*
  - *Descrizione e background di tutte le variazioni proposte*

## Organizzazione del Dossier

Il Dossier consta di 3 Moduli:

**Modulo 1** - Information and Prescribing Information

Common Technical Document Amendment

Introduzione

Descrizione delle variazioni

Razionale per la variazione

Studio di validazione del processo per introdurre la variazione

Analisi comparative tra prodotto ottenuto secondo il metodo vigente e in seguito alla variazione (per assicurare la qualità del prodotto)

Test di controllo di qualità sui prodotti ottenuti in seguito a variazione

Studi di stabilità

**Modulo 2**

Descrizione del Processo di produzione e *in Process Control* eseguiti

Validazione del processo

**Modulo 3 Quality**

Produzione

Descrizione del Processo di produzione e *in Process Control* eseguiti

**Controllo dei materiali**

**Controllo degli intermedi di produzione e step critici**

**Validazione del processo**

**Sviluppo del processo di produzione**

## Esempi di Variazioni per l'IPV

- Introduzione di nuovi supporti per le colonne cromatografiche.
- Introduzione di nuovi test di controllo di qualità (es PCR quantitativa per la presenza di SV40).
- Sostituzione di recipienti per la conservazione del prodotto.
- **Eliminazione di test *in vivo*** e sostituzione con **test *in vitro***.
- Soppressione di test in alcune fasi del processo di produzione perché ridondanti (es mycobacterium).
- Aggiornamento delle specifiche in alcuni test per introduzione di nuovi limiti di accettabilità.

## Normative per il Vaccino IPV

- **Norme Sopranazionali**
- European Pharmacopoeia Monograph 6.0, 2008. Poliomyelitis vaccine (inactivated) 01/2008:0214
- 
- European Pharmacopoeia Monograph 6.0, 2008. Immunochemical methods 01/2008:2.7.1
- 
- European Pharmacopoeia Monograph 6.0, 2008. In vivo assay of poliomyelitis vaccine (inactivated) 01/2008:2.7.20
- 
- **Norme Nazionali**
- D.M. 9 luglio 1963. Registrazione e controllo di Stato del vaccino per la poliomielite inattivato, purificato e concentrato. G.U. 16 ottobre 1963, n. 271.
- 
- D.M. 6 febbraio 1964. Registrazione e controllo di Stato dei vaccini misti contro la poliomielite, la pertosse, la difterite ed il tetano. G.U. 26 ottobre 1964, n. 263.
- 
- D.M. 9 marzo 2001. Procedure tecniche per l'esecuzione del controllo di Stato del vaccino antipoliomielite inattivato (IPV). G.U. 24 maggio 2001, n.119.
- 
- **D.M. 18 giugno 2002. Modifica della schedula vaccinale antipoliomielitica. G.U. n. 163 del 13.07.02.**

## Controllo vaccino antipolio inattivato

- Consiste nella determinazione del titolo dell'Antigene D per i tre sierotipi di poliovirus e viene eseguito **mediante saggio ELISA**
- Il titolo è stabilito dal confronto con una *European Reference (Pharmacopoeia)*.
- Vengono seguite *Standard Operative Procedures* per il saggio e la strumentazione.
- Per i **vaccini combinati** è prevista una fase preliminare di **desorbimento** della componente IPV prima di procedere **al saggio ELISA**

## Titoli Antigene D prodotto finito

Due Metodi Statistici per l'analisi  
(Il parallel line method è quello suggerito in Pharmacopoea)

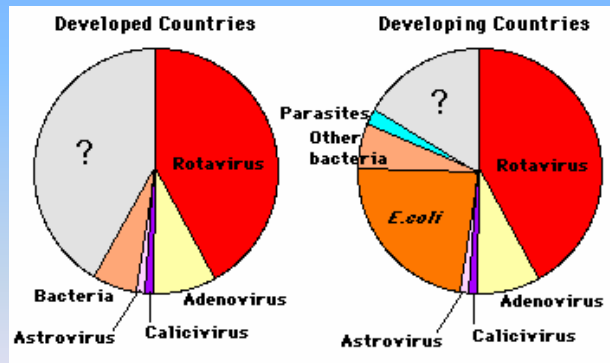
Finished product	Parallel line method
Type 1	20-43 DU/dose
Type 2	5-9 DU/dose
Type 3	17-36 DU/dose

## Farmacovigilanza art.129-134 DL.vo 129/2006

- Il sistema nazionale fa capo a AIFA che collabora a tal fine con le regioni e l'ISS
- Conformemente alle modalità concordate a livello comunitario e definite da EMA si raccolgono e si valutano le informazioni utili per la sorveglianza di medicinali con particolare riguardo a **reazioni avverse, uso improprio, abuso, tenendo conto anche dei consumi.**
- Il titolare dell'AIC è tenuto a registrare tutte le reazioni avverse osservate in Italia, Eu, paese terzo e presentare ogni 5 anni un Periodic Surveillance Update Report (PSUR)

## Vaccini contro la Gastroenterite (GE) da Rotavirus

## ROTAVIRUS CAUSES THE HIGHEST LEVEL OF GE AMONG DEVELOPED AND DEVELOPING COUNTRIES



Picture Source: <http://www.tulane.edu/~dmsander/WWW/335/Diarrhoea.html>

## Global distribution of rotavirus mortality



Each dot = 1000 deaths.

- 85% of these in developing countries.
- ~527,000 rotavirus (RV) related deaths per year in young children <5 years.

Parashar et al., 2006; WHO report, 2007.



## Vaccini per prevenire GE da Rotavirus

	<b>Rotarix® (GSK)</b>	<b>RotaTeq® (Merck)</b>
<b>Origine</b>	<b>Umano monovalente attenuato</b>	<b>Bovino pentavalente</b>
<b>Ceppo</b>	<b>G1, P(8)</b>	<b>G1, G2, G3, G4, P(8)</b>



<http://www.rotavirusvaccine.org/vaccine-facts.htm>

Due vaccini vivi, attenuati Rotarix® (GlaxoSmithKline) and RotaTeq® (Merck) sono stati autorizzati dall' European Medicines Agency (EMA) e dalla Food and Drug Administration (FDA) e commercializzati nel 2006

Approvati e Commercializzati in Italia nel 2006-7.  
Nessuna raccomandazione per vaccinazione su larga scala dal Ministero della Salute e AIFA



Rotarix è un vaccino monovalente derivato dal più comune ceppo di RV umano, G1P[8]

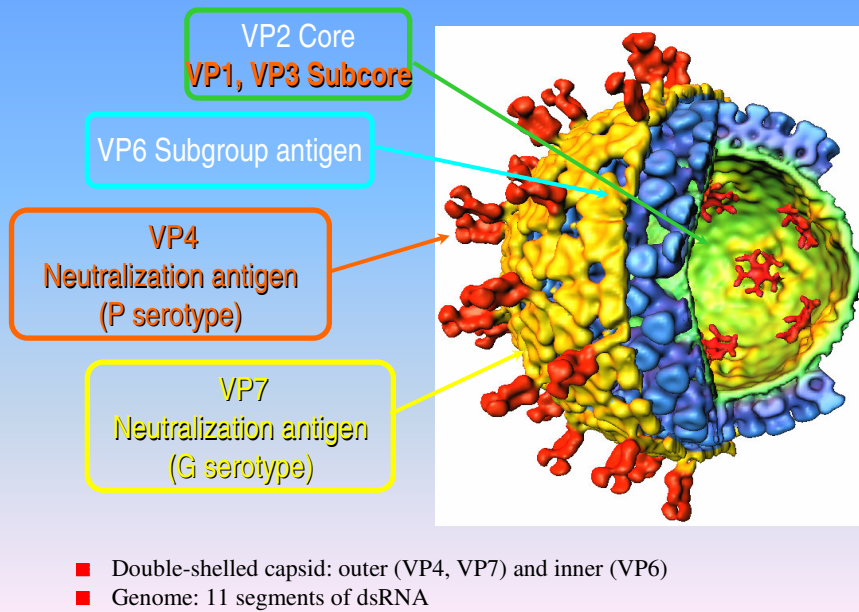
Rotateq è basato su un ceppo bovino, WC3, contiene 5 virus riassortanti bovino-umano



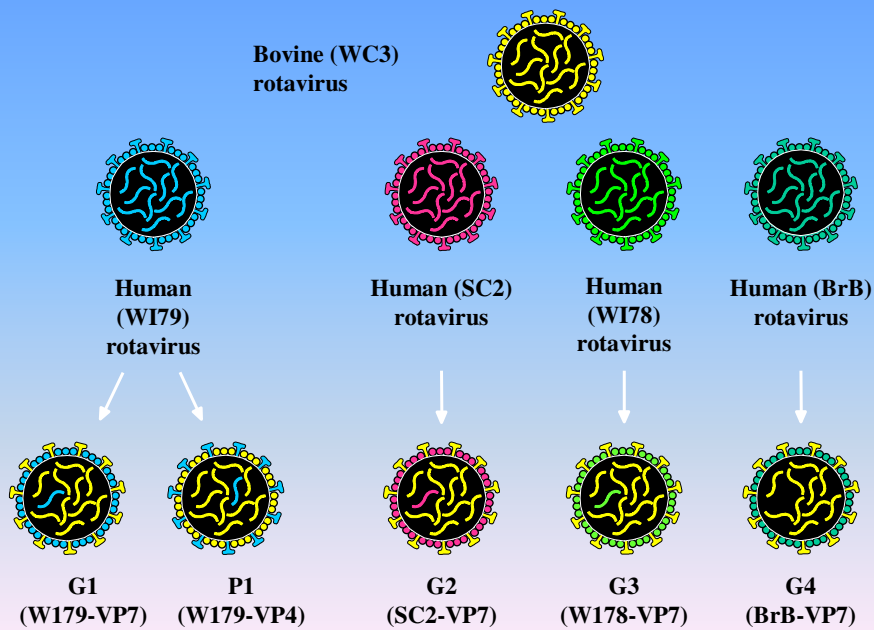
## Sierotipi di Rotavirus

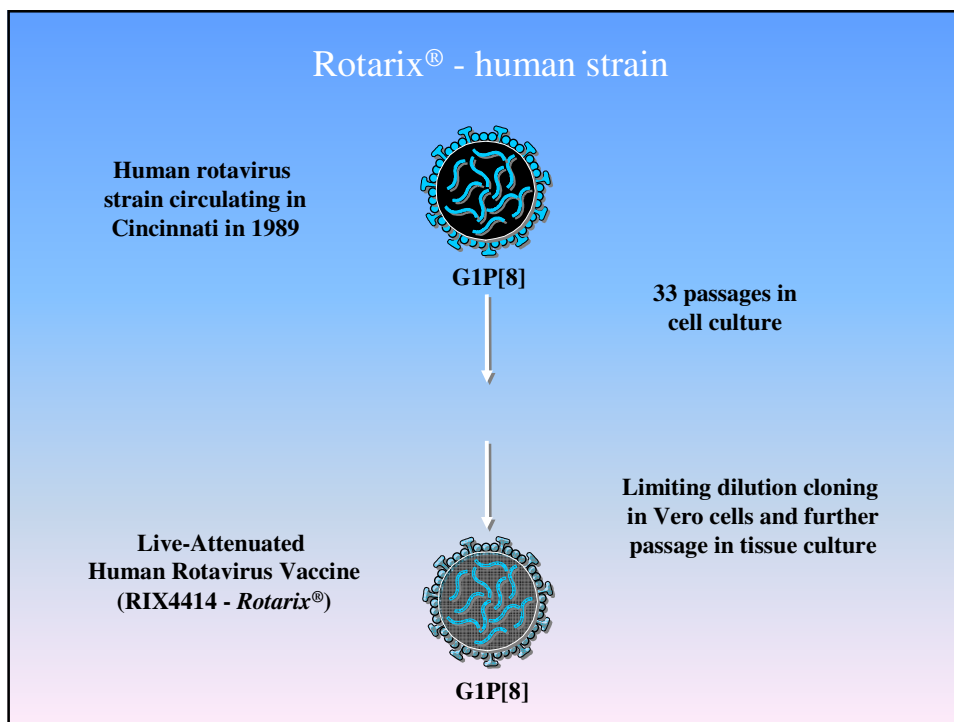
- Almeno **14 (VP7) G-** e **20 (VP4) P-** tipi di rotavirus di gruppo A
- I quattro genotipi più diffusi nell'uomo sono:  
VP7 (G) genotipi: 1, 2, 3 and 4 in combinazione con **P[8], [4] (G1P[8], G2P[4], G3P[8]), e G4P[8]**
- Nuovi sierotipi possono emergere (es. **G9, G8, G12**)

## Rotavirus: segmented RNA virus with a wheel shape



## Rotateq® - human-bovine reassortant strains





**Characteristics of RotaTeq<sup>®</sup> (RV5) and Rotarix<sup>®</sup> (RV1)**

Characteristic	RV5	RV1
Parent rotavirus strain	Bovine strain WC3 (type G6P7[5])	Human strain 89-12 (type G1P1A[8])
Vaccine composition	Reassortant strains G1 x WC3; G2 x WC3; G3 x WC3; G4 x WC3; P1A[8] x WC3	Human strain 89-12 (type G1P1A[8])
Vaccine titer	≥2.0–2.8 x 10 <sup>6</sup> infectious units (IU) per dose, depending on serotype	≥10 <sup>6.0</sup> median cell culture infective dose (CCID <sub>50</sub> ) after reconstitution, per dose
Cell culture substrate	Vero cells	Vero cells
Formulation	Liquid requiring no reconstitution	Vial of lyophilized vaccine with a prefilled oral applicator of liquid diluent (1 ml)
Applicator	Latex-free dosing tube	Tip cap and rubber plunger of the oral applicator contain dry natural latex rubber. The vial stopper and transfer adapter are latex-free.
Other content	Sucrose, sodium citrate, sodium phosphate monobasic monohydrate, sodium hydroxide, polysorbate 80, cell culture media, and trace amounts of fetal bovine serum.	Lyophilized vaccine: amino acids, dextran, Dulbecco's Modified Eagle Medium, sorbitol, and sucrose. Liquid diluent contains calcium carbonate, sterile water, and xanthan
Preservatives	None	None
Shelf life	24 months	24 months
Storage	Store refrigerated at 36°F–46°F (2°C–8°C). Administer as soon as possible after being removed from refrigeration. Protect from light.	Storage before reconstitution: Refrigerate vials of lyophilized vaccine at 36°F–46°F (2°C–8°C); diluent may be stored at a controlled room temperature of 68°F–77°F (20°C–25°C). Protect vials from light. Storage after reconstitution: Administer within 24 hours of reconstitution. May be stored refrigerated at 36°F–46°F (2°C–8°C) or at room temperature up to 77°F (25°C), after reconstitution.
Volume per dose	2 ml	1 ml

**Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep. 2009;58:1-25.**

## Schedule for administration of rotavirus vaccines

Characteristic	Vaccine	
	RV5*	RV1†
No. doses in series	3	2
Recommended ages for doses	2, 4, and 6 mos	2 and 4 mos
Minimum age for first dose	6 wks	
Maximum age for first dose	14 wks and 6 days	
Minimum interval between doses	4 wks	
Maximum age for last dose	8 mos and 0 days	

\* RotaTeq®.  
† Rotarix®.

Prevention of rotavirus gastroenteritis among infants and children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep. 2009;58:1-25.

## Safety of rotavirus vaccines

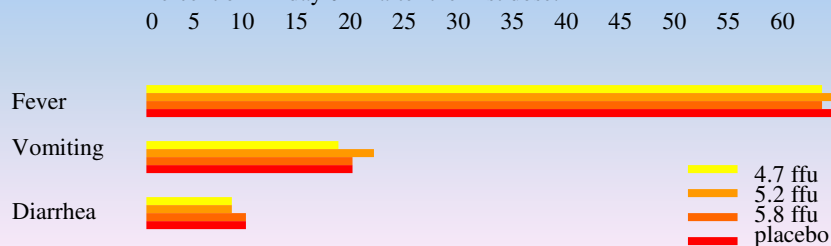
**Rotateq** REST study that enrolled more than 70,000 infants: “No evidence of intussusception among vaccinated compared to placebo recipients”

Percent of AE day 0-14 after any dose:

	Vaccine	Placebo	p-value
Fever	32.1	33.2	NS
Vomiting	26.6	23.6	NS
Diarrhea	44.5	36.4	NS

**Rotarix** A series of trials in which >63,000 children were enrolled: “**No significant** adverse events or **increased risk of intussusception**...”

Percent of AE day 0-14 after the first dose:





***Grazie per l'attenzione***