



Produrre principi attivi biotech: una sfida

Da diversi anni gli investitori e i produttori del farmaceutico guardano con interesse il mercato dei medicinali biotecnologici che rappresentano un settore in forte crescita rispetto al segmento dei farmaci più tradizionali. Tuttavia, anche se i numeri del biotech sono sicuramente interessanti, bisogna considerare che, rispetto al comparto farmaceutico tradizionale, quello biotech è caratterizzato da un'alta complessità, da tempi di sviluppo lunghi e da una produzione molto articolata

La storia dei farmaci biotecnologici inizia nei primi anni '80 con l'impiego delle tecniche del DNA ricombinante, che hanno consentito di produrre e utilizzare nella terapia molecole complesse come le proteine, la cui sintesi, nella maggior parte dei casi, è impraticabile per via chimica. I medicinali biotecnologici attualmente in uso sono proteine ottenute con processi di estrazione e purificazione a partire da substrati cellulari che hanno subito procedi-

menti di ingegnerizzazione (inserzione di un gene) o di modifica (come la fusione cellulare). «Sino all'applicazione di queste tecniche rivoluzionarie, i farmaci in commercio erano costituiti da molecole derivate da sintesi chimica e da prodotti di origine naturale contenenti molecole molto complesse prodotte per estrazione da organi, tessuti o liquidi biologici animali o umani. Successivamente, grazie alle tecniche del DNA ricombinante, si è riusciti a introdurre geni (frammenti di DNA umano) in grado di codificare protei-

ne umane di interesse farmacologico (per esempio insulina, interferone-alfa, ormone della crescita) in microrganismi semplici (*Escherichia coli*, lievito) o in linee cellulari di mammifero col risultato finale di una produzione di quantità elevate di proteine di elevata purezza» spiega Santi Spampinato, professore di Farmacologia dell'Università di Bologna. Le biotecnologie hanno consentito di usare le cellule come piccole biofabbriche e hanno permesso di produrre quantità considerevoli di principio attivo ab-

bassando i costi e soprattutto sganciando la produzione dall'essere umano: la somatotropina (200 milioni di USD a livello mondiale nel 2007, fonte CPA) prima della produzione biotech veniva estratta dal cadavere.

Oltre alle proteine terapeutiche i principi attivi (API) biotech sono costituiti dagli anticorpi monoclonali (mAb), molecole che hanno avuto un successo sempre crescente e hanno rappresentato la reale innovazione terapeutica data dai medicinali biotech, e dai vaccini terapeutici. «In campo terapeutico – continua Spampinato – gli anticorpi monoclonali rappresentano di gran lunga la più grande categoria di sostanze biofarmaceutiche attualmente in studio, e centinaia di queste preparazioni si trovano correntemente sotto sperimentazione preclinica e clinica, non solo nella cura del cancro, ma anche nella rivelazione e nel trattamento di patologie cardiovascolari, neurologiche, immunologiche, infettive, nella diagnosi per immagini e nella prevenzione della reazione immunitaria di rigetto nei trapianti di organi».

In soli 30 anni i farmaci di origine biotech sono arrivati a costituire il 20% dei medicinali in commercio a livello mondiale e nel 2007 il mercato globale dei farmaci biotecnologici è cresciuto del 12,5% (rispetto al 6,4% del mercato dei farmaci globale) e oggi è pari a 75 miliardi di dollari (fonte IMS).

Secondo i dati presentati recentemente dalla Chemical Pharmaceutical generic Association (CPA) nel report "World Biotech APIs Market – Technologies and trends", il mercato globale degli API biotech è costituito per il 68% dalle proteine, per il 22% dagli anticorpi monoclonali e per il restante 10% dai vaccini (sia preventivi sia terapeutici). Sempre secondo lo stesso report, le previsioni di crescita per il mercato degli API biotech nei prossimi 4 anni è del 15,1% a livello mondiale con punte del 30-35% annuo in India e Cina. Se per la maggior parte delle proteine (diverse dagli anticorpi) le quantità prodotte a livello mondiale vanno da poche centinaia di grammi anno a circa 10 kg anno, gli anticorpi monoclonali hanno *range* che va da 50-100 kg a qualche centinaio di chilogrammi.

Le caratteristiche dei principi attivi biotech

Pur essendo considerati entrambi farmaci, i principi chimici "tradizionali" e biologici e biotecnologici, in particolare, differiscono

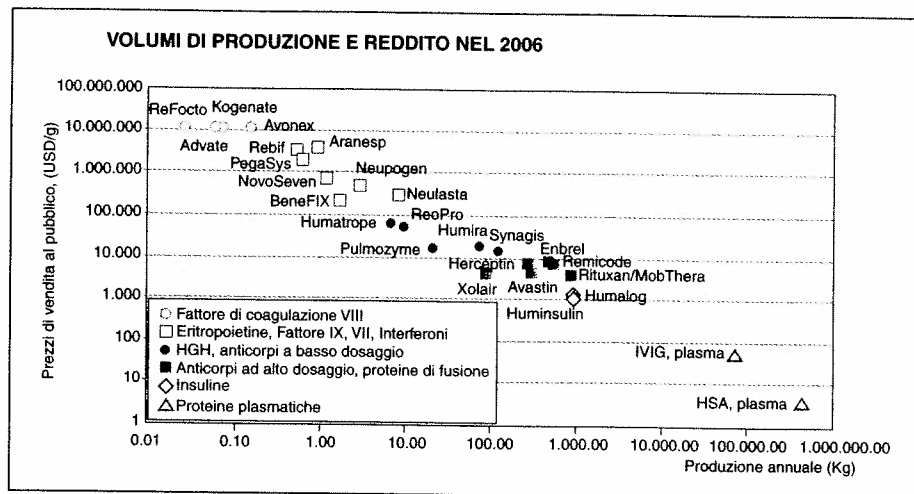


Figura 1 - Volumi di produzione e prezzi di vendita in USD nel 2006 (Fonte: BioPharm International, dati GE Healthcare BioSciences)

in maniera sostanziale per quanto riguarda struttura, azione e produzione e queste differenze devono essere tenute in debita considerazione da tutti gli attori del mondo del farmaco, dai ricercatori, ai produttori, ai medici. Infatti, se i primi hanno una struttura di basso peso molecolare (per questo sono anche chiamati *small chemical entities*), ben caratterizzata dal punto di vista analitico, i secondi, tipicamente proteine o anticorpi, sono dotati di un peso molecolare decisamente più elevato e hanno una struttura più complessa ed eterogenea in grado di modificare la propria disposizione nello spazio in base alle condizioni ambientali. Le molecole biologiche sono prodotte da cellule viventi e generalmente sono costituite da una miscela di diverse isoforme, create dalle cellule delle diverse specie animali attraverso modificazioni post-traslazionali della catena amminoacidica, come glicosidazione, sializzazione, solfatazione, acilazione. Talvolta le diverse isoforme possono essere differenti per quanto riguarda l'attività biologica, la farmacocinetica, la sicurezza d'uso e l'immunogenicità.

I principi attivi biotech non sono caratterizzabili in maniera completa con le metodiche analitiche attuali e variazioni delle caratteristiche chimico-fisiche, che nelle entità chimiche a basso peso molecolare sono "di lieve entità", possono avere conseguenze clini-

che non prevedibili in base ai dati analitici. Per questo il dossier analitico degli API biotech comprende un numero di analisi 20 volte superiore a quello degli API tradizionali. Risulta quindi molto difficile individuare i parametri analitici che devono essere con-

siderati per caratterizzare una proteina terapeutica: per questo motivo nel caso dei farmaci biotech si afferma che "the process is the product" ossia il processo è il prodotto.

«Allo stato attuale le metodiche analitiche in uso per le proteine ricombinanti e gli anticorpi monoclonali non consentono di avere la stessa completa caratterizzazione, tipica dei farmaci tradizionali di

sintesi. Per garantire la qualità del farmaco e la sicurezza del paziente il modo di produrre questi farmaci deve e dovrà essere completamente diverso: bisognerà che i produttori sviluppino il processo di produzione in modo approfondito per avere un processo robusto. Infatti per i farmaci biotecnologici la qualità del prodotto finito è una cosa veramente importante ed è garantita solamente dal fatto di essere sicuri di aver operato nella maniera corretta e nell'aver effettuato a valle controlli di qualità che garantiscano veramente la qualità del prodotto finito» racconta **Maria Luisa Nolli**, Ceo di Areta International (Gerenzano, VA).

«I farmaci biotecnologici hanno caratteristiche che li rendono completamente diver-



Maria Luisa Nolli



si dai prodotti farmaceutici tradizionali. La problematica di base è legata alla complessità della molecola biologica, che determina una complessità di approccio» sottolinea **Roberto Verga** di BiCT, società di ricerca e sviluppo nei materiali e molecole di natura biotecnologia, Bagnolo Cremasco (CR). Gli API tradizionali sono prodotti aggiungendo e miscelando composti chimici e reagenti noti utilizzando reazioni controllate e prevedibili, che portano soprattutto alla produzione della molecola desiderata. Le proteine terapeutiche sono il risultato di complesse attività cellulari e sono isolate tra le sostanze prodotte e secrete da cellule ingegnerizzate che, infatti, producono il farmaco voluto insieme a una serie di altre molecole e composti prodotti dal loro metabolismo. La produzione di un farmaco biotecnologico non è quindi affrontabile basandosi sulle conoscenze della chimica classica e variazioni del processo produttivo, che sono di minore entità nei farmaci tradizionali, come quelle della dimensioni del lotto e del sito di produzione. In campo biotecnologico sono i processi complessi che richiedono diversi studi e numerosa documentazione a supporto.

La fabbrica cellulare

Il primo passo per procedere alla produzione di un farmaco biotech consiste nella creazione di un insieme di cellule altamen-



Roberto Verga

te standardizzate in grado di produrre il farmaco perché è stato inserito al loro interno il gene in grado di codificare per la proteina terapeutica desiderata (*Master Cell Bank, MCB*). Successivamente una parte della MCB viene prelevata e fatta espandere per ottenere le cellule da utilizzare direttamente nella produzione del principio attivo (*Working*

Cell Bank, WCB).

La produzione vera e propria, o fermentazione, avviene poi in un reattore in cui le cellule della WCB vengono fatte crescere in condizioni di coltura ben controllate. Le proteine prodotte dalla WCB vengono poi isolate con metodiche differenti a seconda che le proteine siano secrete nel mezzo di coltura o siano presenti come corpi di inclusione all'interno delle cellule stesse. Dopo l'isolamento si procede poi alla purificazione e alla

conservazione del principio attivo ottenuto nelle condizioni migliori (gli API biotech sono instabili e sensibili al calore). «Ciascuna fase è critica a tal punto che, la modifica dell'impianto produttivo, anche solo parziale da parte dello stesso produttore originale, richiede una sua rivalidazione. Ciò significa che ciascun prodotto ha un proprio profilo di immunogenicità unico» spiega **Roberto Gradnik**, presidente di Assobiotec.

«Il processo produttivo può essere diviso in **upstream** (coltura cellulare iniziale e processo di fermentazione) e **downstream** (purificazione e ottenimento del prodotto finito). La definizione di queste due fasi e il loro sinergismo porta al processo produttivo ottimale, dopo un opportuno scale-up» spiega Verga.

Le linee cellulari

La scelta della cellula da ingegnerizzare è alla base di tutto il processo di produzione. «L'utilizzo di batteri, come l'*Escherichia coli*, geneticamente ben conosciuti e facili da col-

Tabella 1. Schema processo produttivo

Identificazione e isolamento del gene che codifica la proteina
Scelta della cellula ospite e del vettore per l'inserimento nella cellula ospite
Inserimento nella cellula ospite e creazione della Master Cell Bank
Produzione della Working Cell Bank
Sviluppo e crescita delle Working Cell Bank nelle condizioni di coltura più idonee
Produzione della proteina
Isolamento della proteina

LA PRODUZIONE ITALIANA DI API BIOTECH



Roberto Gradnik

«L'Italia – spiega Roberto Gradnik – è storicamente il più importante fornitore mondiale di principi attivi farmaceutici. I motivi di questa leadership hanno origine nella ben consolidata cultura chimica del Paese e nella qualità dell'insegnamento universitario, insieme alla creatività e flessibilità tipiche di molti settori dell'industria italiana.

La presenza in Italia di numerose industrie chimiche farmaceutiche di respiro internazionale, insieme a costruttori di apparecchiature chimiche d'avanguardia, sono ulteriori fattori che hanno consentito all'Italia di raggiungere una posizione preminente in questo settore. Per quanto invece riguarda i principi attivi farmaceutici biotech, si tratta di prodotti nella grande maggioranza dei casi ancora sotto copertura brevettuale, e quindi di stretta produzione da parte delle imprese che li hanno messi sul mercato. Anche il questo settore le qualità "italiane" si sono fatte apprezzare e ci sono imprese che producono in Italia per tutto il mondo.

Vi sono infine realtà italiane che stanno già lavorando alla messa a punto di propri biosimilari per quei prodotti biotech che sono oggi fuori brevetto.

Vi sono alcune realtà produttive in Italia che hanno le caratteristiche tecnologiche, d'impianto e di personale, in grado di procedere alla produzione di farmaci biotech. Queste realtà sono impegnate e nello sviluppo di propri biosimilari, e pronte a proporsi come partner produttivi delle principali imprese biotecnologiche e farmaceutiche che ne avessero bisogno».

tivare, offre una maggiore semplicità operativa e consente di avere grandi biomasse in tempi veloci. Purtroppo i coli sono in grado di operare solo alcuni tipi di modificazioni post-traslazionali e quindi non danno molecola simile a quella umana. Inoltre i batteri tendono a formare corpi di inclusione e non secernono la proteina nel mezzo di coltura, quindi il recupero di quest'ultima diventa più lungo, anche se possibile con tecniche non complicate. Tuttavia i coli sono ampiamente utilizzati nella produzione di molecole non complesse o che non contengono zuccheri. Talvolta la differenza non sembra avere effetto sull'attività clinica e terapeutica come nel caso del *Granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF), una proteina umana che presenta alcuni residui glucidici, che esiste in commercio sia in forma non glicosilata (Filgrastim), perché prodotta da E.Coli, sia in forma glicosilata e indistinguibile da quella umana (Lenograstim), perché prodotta da cellule di ovaio di criceto cinese (CHO).



Giuseppe Salvo

«Le cellule di mammifero in genere, per fattori propri, intrinseci alla loro stessa natura non sono in grado di raggiungere elevate densità cellulari, oltretutto i tempi di divisione cellulare e quindi di duplicazione, sono notevolmente più lunghi rispetto a quelli microbici (20 min per E. coli contro 20 ore circa per CHO)» spiega Giuseppe Salvo, responsabile del dipartimento di biotecnologie, dell'Istituto Biochimico Italiano G. Lorenzini S.p.A. (Aprilia, LT).

D'altra parte le cellule di mammifero sono più simili a quelle umane e sono in grado di operare tutte le modifiche post-traslazionali presenti nelle proteine umane. Le cellule di mammifero hanno una crescita più lenta di quelle dei batteri, sono più complesse e presentano una difficoltà di attivazione, ma sono diffuse e sono ben standardizzate e vengono utilizzate perché danno i prodotti il più simili possibile alla molecola umana naturale. Allo stato attuale la maggioranza (60-70%) degli anticorpi e delle proteine ricombinanti è prodotta da cellule di mammifero.

Alla base di un processo biotecnologico per la produzione di una molecola ricombinante, vi è la linea cellulare. Tutte le normative a riguardo indicano chiaramente la neces-

sità di caratterizzare in maniera approfondita la linea cellulare utilizzata per la produzione. La linea cellulare ricombinante iniziale, o *Master Cell Bank*, viene preparata a partire da cellule, acquistate da società specializzate come ATCC (*American Type Culture Collection*) ECACC (*European Collection of Cell Cultures*), in cui viene trasferito il gene

che codifica la proteina. In genere la preparazione delle MCB avviene presso società specializzate che la preparano, la caratterizzano, e assicurano che le cellule producano la proteina voluta, che la linea sia stabile e che non presenti contaminazioni (assenza

di micoplasma, endotossine, contaminanti virali). La MCB viene conservata in azoto liquido. Dalla MCB vengono isolate progressivamente un certo numero di cellule che costituiranno poi la *Working Cell Bank* ossia le cellule che dopo replicazione saranno direttamente coinvolte nella produzione.

La durata della MCB, che è dell'ordine di anni, dipende oltre che dal suo utilizzo anche dalla sua stabilità: le cellule batteriche sono più stabili, mentre quelle di mammifero tendono comunque a differenziarsi e a essere meno stabili.

La produzione delle cellule

La fermentazione rappresenta il punto del processo in cui vengono sintetizzati gli API. Le cellule della WCB vengono fatte cresce-

Tabella 2. Principali farmaci biotech e linee cellulari produttrici (Fonte: BioPharm International dati General Electric)

Specialità API Area terapeutica	Tipo biotecnologico	Linea cellulare da mammifero
Eritropoietine	Proteina ricombinante	Si
Insuline	Proteina ricombinante	No
Interferoni	Proteina ricombinate	Parzialmente
Enbrel Etanercept Reumatologia	Proteina di fusione	Si
Remicade Infiximab Reumatologia	mAb	Si
Rituxan/Mabthera rituximab Oncologia	mAb	Si
Neulasta/Neupogen G-CSF	Proteina ricombinante	Parzialmente
Fattori di coagulazione FVIII, FVII	Proteina ricombinante	Si
Avastin/Bevacizumab Oncologia	mAb	Si
Humira/Adalimumab Reumatologia	mAb	Si
Ormoni della crescita	Proteina ricombinante	No
Erbix/Cetuximab Oncologia	mAb	Si
Synagis Palivizumab Antivirale	mAb	Si



re in opportuni reattori (materiale, dimensione e geometria) secondo metodiche e in condizioni (*medium* di crescita, condizioni di areazione) definite e controllate rigorosamente in modo da ottimizzare la sintesi della proteina. «La scelta del bioreattore da utilizzare è basata su numerosi parametri: la dimensione è valutata in base alle quantità di API che devono essere prodotte, per cui se è inusuale avere impianti di produzione di proteine ricombinanti (come eritropoietine, interferone beta ecc.) che superino i 200-500 litri, per la produzione di mAb si possono avere volumetrie anche notevolmente superiori ai 1000 litri», spiega Salvo.

Le scelte della metodologia di produzione *batch*, *fed-batch* o perfusione influenzano i tempi del processo. «Utilizzando cellule di mammifero in *batch* la produzione di un lotto avviene in 7 giorni circa, in 10-12 giorni per la coltura in *fed-batch* (sono i processi più diffusi), mentre con la perfusione si raggiungono tempi molto lunghi superiori al mese (anche fino a 6 mesi).

La perfusione sicuramente è la metodologia che porta a più alte rese, ma per le sue peculiarità di durata e, in qualche modo, di stress deve essere ben giustificata. Le richieste delle Autorità regolatorie in merito alla stabilità genetica della linea cellulare è molto stringente. In processi del genere, più che negli altri tipi, i controlli *in process* sul prodotto (controllo delle isoforme e della loro percen-

tuale) e sulle relative impurezze assumono un'importanza fondamentale. Quando possibile, l'utilizzo di colonnine cromatografiche di immunoaffinità, in grado di riconoscere tutte le isoforme, può essere di ausilio nel controllo del processo e nell'individuazione di eventuali cambiamenti nella biosintesi. Normalmente nei processi molto lunghi, bisogna aver chiara la definizione di lotto», continua il responsabile di IBI.

«Le fermentazioni biotecnologiche - spiega Salvo - richiedono numerosi controlli *in process*, per arrivare a ottenere processi robusti con una relativamente bassa variabilità, alcuni comuni a tutte le produzioni, come pH, ossigeno disciolto, temperatura, agitazione, altri sono specifici dell'organismo utilizzato».

Successivamente il terreno di coltura viene raccolto e la proteina ottenuta o per secrezione o per rottura della cellula batterica deve essere purificata con mezzi adeguati, centrifugazione e cromatografia. Questo è un passaggio importante perché la proteina, che, come detto non è un composto stabile, deve essere isolata da tutti gli altri prodotti del metabolismo della cellula, da eventuali residui cellulari (come zuccheri, acidi grassi ecc.), contaminanti come virus, prioni, endotossine in tempi e in condizioni che non ne provochino la degradazione.

La produzione di farmaci biotech pone anche il problema della conservazione dei pro-

dotti intermedi o dell'API finito, se non immediatamente formulato: esistono infatti prodotti che in soluzione sterile concentrata, per certi periodi possono essere conservati a 4° C, in attesa di essere formulati e altri che devono essere congelati anche fino a -80 °C. Questa fase, se pur semplice a dirsi, nasconde degli aspetti molto importanti non sempre facilmente risolvibili con i classici metodi di congelamento, poiché bisogna garantire l'omogeneità dei componenti la soluzione nella fase congelata.

La sicurezza

All'interno della procedura di produzione bisogna poi porre particolare attenzione alle procedure di pulizie per evitare ogni tipo di rischio di contaminazione del prodotto biotech (che essendo somministrato per via iniettiva deve possedere tutti i requisiti di sterilità degli iniettabili).

Un'altra questione che deve essere affrontata è quella dello smaltimento della biomassa una volta esaurito il ciclo produttivo. «Lo smaltimento della biomassa residua deve essere ben controllato le cellule devono essere inattivate completamente. In base a una serie di analisi preventive si dichiara il grado di pericolosità di questo materiale che è rifiuto biologico da sanitzare e sterilizzare.

Le procedure di pulizia e di smaltimento sono gli ultimi tasselli del processo produttivo, ma sono passaggi veramente molto impor-

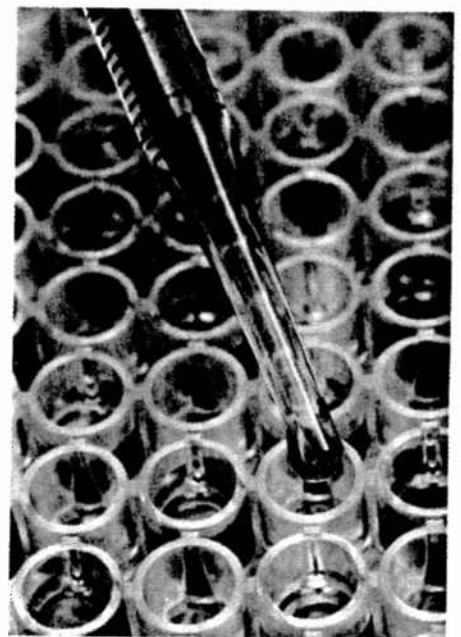
LE BIOTECNOLOGIE E I PRODUTTORI DI API ITALIANI



Marcello Fumagalli

«La produzione di principi attivi farmaceutici di sintesi tradizionali è completamente diversa da quella dei principi attivi biotecnologici. In Italia, molti produttori di API sono ancora fortemente legati alla sintesi tradizionale, anche perché sintetizzare proteine ricombinanti richiede lo stravolgimento dell'impianto e necessita dell'introduzione a tutti i livelli della cultura biotecnologica, chimica e regolatoria, del concetto della qualità delle convalide e una rivalutazione della figura del biotecnologo nei siti produttivi».

illustra Marcello Fumagalli, Direttore Generale di Chemical Pharmaceutical generic Association (CPA). «Tuttavia il settore chimico delle molecole tradizionali potrà avvantaggiarsi della biotecnologie attraverso l'utilizzo di biocatalizzatori, ovvero di enzimi modificati fissati su matrici, che facilitano la produzione di molecole chimiche piccole, ma complesse dal punto di vista chimico, come ormoni steroidei e antibiotici. La biocatalisi è un'ottima chance ed è l'unico modo per frangere la chimica fine tradizionale verso un futuro sempre più biotecnologico», continua Fumagalli.



tanti», spiega Verga. Per problemi di sicurezza, oltre che di possibile contaminazione da altre preparazioni, le linee biotech sono in aree ambientali controllate (classe D, per sala lavaggio e preparazione terreni e soluzioni; classe C, area di processo e preparazione inoculi), logicamente tutte le operazioni dove vengono maneggiate cellule sono effettuate sotto cappa a flusso laminare tipo biohazard. Relativamente alla safety, il livello di contenimento è quello richiesto per poter maneggiare OGM in Classe 2.

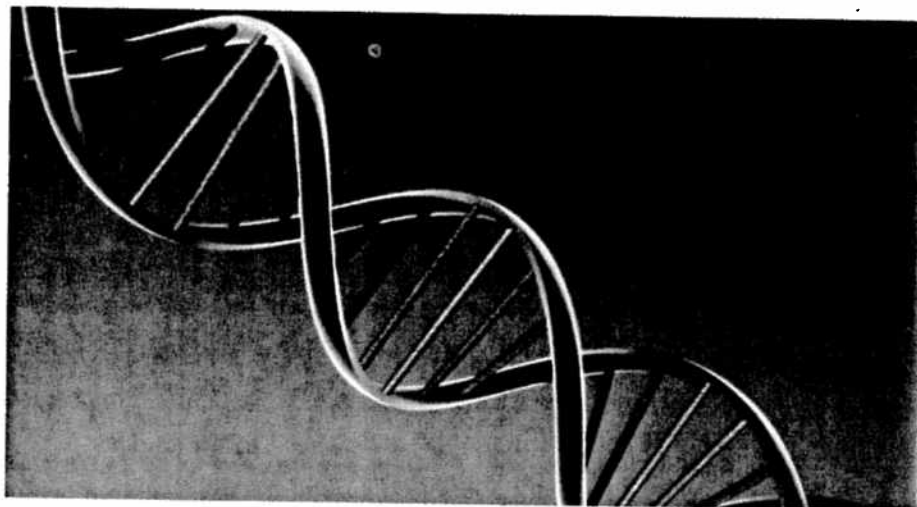
Gli impianti destinati ai prodotti ricombinanti da cellule di mammifero devono essere segregati da quelli che dedicati ai prodotti da batteri per evitare il rischio di contaminazioni crociate. Per aspetti legati alla sicurezza, il personale operante nei reparti di biotecnologie, viene monitorato frequentemente sia mediante visite mediche sia tramite specifiche analisi ematiche e solo il personale in buona salute può transitare nelle aree di processo.

Un particolare training sugli aspetti di sicurezza viene fornito anche al personale di manutenzione (che viene comunque affiancato dal personale di reparto) e della ditta che si occupa delle pulizie. Qualsiasi cosa esca dall'area di processo, viene decontaminata o chimicamente o mediante sterilizzazione in autoclave, con procedure validate.

I costi del biotech

Gli API biotech richiedono notevoli investimenti, decisamente superiori a quelli delle *small chemical entities*. «Gli investimenti nella ricerca e sviluppo dei farmaci biotech sono sei volte quelli delle molecole tradizionali e gli investimenti per le strutture produttive arrivano a essere 25-30 volte quelli degli impianti tradizionali. I costi degli impianti di isolamento e purificazione (*upstream*) rappresentano l'80% del costo dell'impianto produttivo totale, gli stessi costi sono del 20% nelle sintesi tradizionali. Il *Drug Master File* di un prodotto biotech raggiunge le 1000 pagine contro la cinquantina di pagine di quelli di una *small chemical entity*. I tempi di sviluppo sono di pochi anni rispetto a qualche mese degli API tradizionali», racconta **Marcello Fumagalli**, Direttore Generale di CPA.

«Nello studio della fattibilità di una nuova produzione di proteine ricombinanti da cellule di mammifero e sui costi che bisogna



prevedere sia per lo sviluppo del processo e di seguito per la produzione, sia per eventuali investimenti le decisioni chiave riguardano:

- il tipo di prodotto;
- l'organismo produttore;
- il tipo di processo;
- tipo di attrezzatura utilizzabile (classica o disposable)
- analisi (interne o esterne; nella scelta influisce anche l'eventuale presenza di riferimenti riportati in farmacopea);
- la grandezza del batch (tanti piccoli o pochi grandi).

Non si può scegliere di sviluppare un anticorpo monoclonale, di cui le dosi sono nell'ordine dei 100-150 mg utilizzando bioreattori da 200 litri per la produzione. Questo sarebbe un grosso collo di bottiglia, poiché per quanto le rese possano essere elevate non si avrebbe sufficiente prodotto», spiega Salvo.

Da un punto di vista di spesa, molto dipende dalle competenze esistenti *in house* con particolare riferimento all'impiantistica.

«Il costo di un impianto-continua Salvo - progettato *in house* di circa 600 m², conforme alle GMP per operare in classe D e C con una classe di safety di livello 2, in cui sono già disponibili le mura esterne e alcuni servizi quali acqua demineralizzata, vapore e aria, si aggira intorno a 1,5 milioni di euro, a cui vanno aggiunti circa 4-5 milioni di euro, per le attrezzature di sviluppo (processo e linee cellulari, caratterizzazione analitica) e per l'allestimento di una linea di produzione con bioreattori e sistemi di purificazione fino a 200 litri. Il 10% dei costi/anno va

preventivato per la riqualifica/manutenzione delle varie macchine e per la calibrazione strumenti.

Durante lo sviluppo di un processo, vanno considerati il costo vivo per la linea cellulare di mammifero quantificabile intorno ai 50.000-150.000 euro/linea (dipende se si hanno già vettori proprietari che garantiscano una buona espressione della proteina di interesse) a cui si aggiungono gli oneri per la sua caratterizzazione e certificazione (in media 250.000 euro). Il costo per lo sviluppo del processo (ci si possono aspettare variazioni anche sensibili in funzione del prodotto) fino a scala 30 litri con la convalida su 4 lotti, è quantificabile in circa 800.000 euro includendo la caratterizzazione analitica e lo sviluppo di un antisiero per la ricerca delle proteine dell'ospite (HCP).

Per finire, va aggiunto oltre al personale (e questo dipende dall'azienda), lo studio di *spiking* virale sul processo di *downstream* (bisogna dimostrare quanto i vari step di purificazione compreso la nano filtrazione finale abbattano o inattivano un'eventuale carica virale) quantificabile in circa 250.000-350.000 euro.

Rapportando il tutto a un bioreattore da 200 litri (150 litri effettivi), il costo medio per un batch in perfusione, per un mese, con un cambio di terreno giornaliero incluso le analisi, si aggira intorno ai 120.000 euro, a cui bisogna aggiungere sempre il personale. Logicamente una grossa incidenza è data dal terreno di coltura (calcolando un costo medio/litro di 15 euro) e dalle analisi, in particolare se bisogna dimostrarne l'attività *in vivo* su animali».