

WHO Expert Committee on Biological Standardization

Highlights of the 46th Meeting, October 1996¹

The WHO Expert Committee on Biological Standardization (ECBS) reviews developments in the field of biological substances used in medicine and recommends procedures to assure their quality, safety and efficacy. It establishes International Reference Materials as well as requirements and guidelines for the production and control of biologicals covering, for example, vaccines, plasma products and diagnostics, whether produced by traditional or new biotechnologies. The 46th meeting of the Committee was held in Geneva in October 1996 and its report will be published in the WHO *Technical Report Series*.

The ECBS recognized the ever increasing expansion of the field of biologicals and its increasing diversity. Such diversity, together with the development of products derived by novel biotechnologies, raises new and particular questions of safety and efficacy and effective control measures based on a firm scientific foundation need to be established. The Committee noted that a review of the scientific basis of standardization and quality control of biologicals had recently been conducted on behalf of the National Biological Standards Board of the United Kingdom, which has responsibility for the National Institute for Biological Standards and Control (United Kingdom), one of the WHO International Laboratories for Biological Standards. The review was undertaken with the collaboration of WHO and the support of the European Medicines Evaluation Agency and the European Pharmacopoeia. The report was presented to WHO by the Chairman of the Board at a special ceremony. Because its conclusions have important implications at the international level, the ECBS

¹ See No. 14, 1996, pp. 105-108.

Comité OMS d'experts de la Standardisation biologique

Faits marquants de la 46^e réunion, octobre 1996¹

Le Comité OMS d'experts de la Standardisation biologique examine les nouveaux développements concernant les substances biologiques utilisées en médecine et recommande des procédures destinées à assurer leur qualité, leur innocuité et leur efficacité. Il établit les substances internationales de référence ainsi que des normes et des lignes directrices pour la production et le contrôle des substances biologiques couvrant, par exemple, les vaccins, les dérivés du plasma et les réactifs diagnostiques, que ces substances soient produites par des méthodes classiques ou grâce aux nouvelles biotechnologies. Le Comité a tenu sa 46^e réunion à Genève en octobre 1996, et son rapport sera publié dans la *Série de Rapports techniques* de l'OMS.

Le Comité a pris note de l'extension et de la diversification croissantes du domaine des substances biologiques. Cette diversification, avec le développement de produits issus des nouvelles biotechnologies, soulève des questions nouvelles et particulières en matière de sécurité et d'efficacité, et des mesures de contrôle effectives, qui s'appuient sur une solide base scientifique, doivent être établies. Le Comité a noté qu'un examen des bases scientifiques de la standardisation et du contrôle de la qualité des substances biologiques avait récemment été réalisé au nom du *National Biological Standards Board* du Royaume-Uni, dont relève le *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC) du Royaume-Uni, l'un des laboratoires internationaux d'étalons biologiques de l'OMS. Cet examen a été entrepris avec la collaboration de l'OMS et le soutien de l'Agence européenne pour l'évaluation des médicaments et de la Pharmacopée européenne. Le rapport a été présenté par le président du *National Biological Standards Board* lors d'une cérémonie spéciale. Ses conclusions ayant d'importantes répercussions au niveau international, le Comité a recommandé que ce rapport soit publié sous les auspices

¹ Voir N° 14, 1996, pp. 105-108.

recommended that the report be published under the auspices of the Biologicals Unit of WHO to permit its wide dissemination globally.

The Committee was informed that a review had also been carried out by the *Statens Seruminstitut* (SSI), Copenhagen, another WHO International Laboratory for Biological Standards, of its role in the field of biological standardization in which it had been active for almost 75 years. The conclusion had been that its efforts should in the future concentrate on a scientific contribution to the field and that the SSI should cease to hold and distribute International Reference Materials. Agreement had been reached, with the full knowledge of WHO, that stocks of reference materials should be transferred from the SSI to the NIBSC for distribution with effect from April 1997. The conditions of distribution would be the same as for International Reference Materials already held by the NIBSC. Tribute was paid to the long and valuable contribution of the SSI to the activities of WHO in the field of biological standardization.

The use of International Reference Materials established by WHO for designating the activity or identity of biological preparations used in prophylaxis, therapy or diagnosis ensures comparability of the activities of these substances worldwide, as well as the reliability of diagnostic procedures. Their wide use emphasizes the key role of these materials in harmonizing the quality of biologicals at the international level. Based on the results of international collaborative studies, the ECBS established 8 new or replacement standards in 1996 (*Table 1*). Also, 8 International Reference Materials were discontinued (*Table 1*), a number of these being antibiotics where the microbiological assay had been replaced by a physico-chemical assay method for a number of years. In addition, 12 interim Reference Reagents (*Table 1*) were established. This is a new class of reference materials, established on the basis of limited data in rapidly developing fields, especially in the cytokines area, where there is a need for standardization in measurement before an International Standard can be established. The availability of these Reference Reagents was considered vital as the study of these biological substances moved from the laboratory into the clinic.

The ECBS adopted 3 new documents at its meeting, revised requirements for cell substrates to be used for the production of biologicals, guidelines for the production and control of the acellular pertussis component of monovalent or combined vaccines, and guidelines for assuring the quality of DNA vaccines.

The revised requirements for use of animal cells as *in vitro* substrates for the production of biologicals take into account the latest available data relating to cell substrates. They were adopted after extensive consultation worldwide, especially discussion at a WHO/International Association of Biological Standardization/Fondation Mérieux International symposium on the Safety of Biological Products prepared from Mammalian Cell Cultures held in Annecy, France, in September 1996. The Requirements cover the characterization and testing of continuous cell lines and diploid cell lines for the production of both viral vaccines and other biologicals, such as monoclonal antibodies and recombinant DNA products, as well as some general manufacturing requirements which apply also to primary cells. Considerable emphasis is placed on testing for extraneous agents, and manufacturers are clearly encouraged, wherever possible, to use for production cell substrates which can be generated from cell banks which have been thoroughly characterized, instead of primary cells. In the revised requirements for diploid cell lines the

de l'unité Produits biologiques de l'OMS pour lui assurer une diffusion mondiale.

Le Comité a été informé qu'un examen avait également été réalisé par le *Statens Seruminstitut* (SSI) de Copenhague, un autre laboratoire international d'étalons biologiques de l'OMS, sur son rôle dans le domaine de la standardisation biologique, domaine dans lequel il est actif depuis près de 75 ans. Il a été conclu que les efforts du SSI devraient être à l'avenir davantage axés sur une contribution scientifique et que l'institut devrait cesser de détenir et de distribuer les substances internationales de référence. Il a été convenu, avec l'assentiment de l'OMS, que les stocks de substances de référence seraient transférés du SSI au NIBSC, qui les distribuera dès avril 1997. Les conditions de distribution des substances seront les mêmes que pour les substances internationales de référence déjà détenues par le NIBSC. La précieuse contribution du SSI aux activités de l'OMS dans le domaine de la standardisation biologique pendant de si longues années a été dûment reconnue.

L'utilisation des substances internationales de référence établies par l'OMS pour qualifier l'activité ou l'identité des préparations biologiques utilisées pour la prophylaxie, le traitement ou le diagnostic permet de comparer l'activité de ces substances à l'échelle mondiale et de vérifier la fiabilité des procédures diagnostiques. Leur usage très répandu souligne le rôle clé que jouent ces substances dans l'harmonisation de la qualité des produits biologiques au niveau international. En s'appuyant sur les résultats d'études collectives internationales, le Comité a établi en 1996 8 nouveaux étalons ou étalons de remplacement (*Tableau 1*). Huit substances internationales de référence ont été supprimées (*Tableau 1*), dont plusieurs étaient des antibiotiques pour lesquels le titrage microbiologique avait été remplacé par une méthode physico-chimique depuis plusieurs années. En outre, 12 nouveaux réactifs de référence intérimaires ont été établis (*Tableau 1*). Il s'agit d'une nouvelle classe de substances de référence, établies sur la base de données limitées dans des domaines en évolution rapide, en particulier celui des cytokines, où une standardisation des mesures est nécessaire avant que le statut d'étalon international ne soit établi. Il a été jugé indispensable de mettre ces réactifs de référence à disposition dans la mesure où leur étude est passée du stade du laboratoire au stade de l'utilisation clinique.

Le Comité a adopté 3 nouveaux textes lors de sa réunion, à savoir des normes révisées pour les substrats cellulaires utilisés pour la production de substances biologiques, des lignes directrices pour la production et le contrôle de la composante coquelucheuse acellulaire des vaccins monovalents ou associés, et des lignes directrices pour l'assurance de la qualité des vaccins à base d'ADN.

Les normes révisées relatives à l'utilisation de cellules animales comme substrat *in vitro* pour la production de substances biologiques tiennent compte des données les plus récentes sur les substrats cellulaires. Elles ont été adoptées après de nombreuses consultations au niveau mondial, en particulier une discussion dans le cadre d'un symposium OMS/Association internationale de Standardisation biologique/Fondation Mérieux sur l'innocuité des produits biologiques préparés en cultures cellulaires de mammifères, qui s'est tenu à Annecy, France, en septembre 1996. Les normes portent sur la caractérisation et le contrôle des lignées cellulaires continues et des lignées de cellules diploïdes destinées à la production des vaccins viraux et d'autres produits biologiques, comme les anticorps monoclonaux et les produits recombinants, et contiennent des normes générales de fabrication qui s'appliquent également aux cellules primaires. Les normes insistent fortement sur les épreuves de recherche des agents contaminants et les fabricants sont vivement encouragés, si possible, à utiliser pour la production des substrats cellulaires qui peuvent être obtenus à partir de banques de cellules entièrement caractérisées, et non à partir de cellules primaires. Dans les normes révisées relatives aux lignées de

extent of chromosomal re-characterization needed for well established diploid cell lines, such as MRC-5 and WI-38, as well as the extent of routine tumorigenicity testing has been relaxed.

cellules diploïdes, l'importance de la recaractérisation caryotypique nécessaire pour des lignées de cellules diploïdes reconnues, comme les cellules MRC-5 et WI-38, ainsi que l'étendue des épreuves de routine portant sur la tumorigénicité, ont été assouplies.

Table 1 **International Biological Standards and Reference Reagents established by WHO in 1996**

Tableau 1 **Étalons biologiques internationaux et réactifs internationaux de référence établis par l'OMS en 1996**

Antibodies – Anticorps

Anti-rubella immunoglobulin, human – Immunoglobuline antirubéolique, humaine

First International Standard – Premier étalon international

Blood products – Produits sanguins

Blood coagulation factor IX concentrate, human – Concentré de facteur IX de la coagulation sanguine, humain

Third International Standard – Troisième étalon international

Blood coagulation factors II, VII, IX, X, plasma, human – Facteurs II, VII, IX, X de la coagulation sanguine, humains, plasmatiques

Second International Standard – Deuxième étalon international

Ferritin, human (recombinant) – Ferritine humaine (recombinante)

Third International Standard – Troisième étalon international

Whole blood folate – Folates du sang complet

First International Standard – Premier étalon international

Thromboplastin, human (recombinant), plain – Thromboplastine humaine (recombinante), simple

Third International Standard – Troisième étalon international

Cytokines^a

Interleukin-5 – Interleukine-5

First Reference Reagent – Premier réactif de référence

Interleukin-7 – Interleukine-7

First Reference Reagent – Premier réactif de référence

Interleukin-9 – Interleukine-9

First Reference Reagent – Premier réactif de référence

Interleukin-11 – Interleukine-11

First Reference Reagent – Premier réactif de référence

Interleukin-12 – Interleukine-12

First Reference Reagent – Premier réactif de référence

Interleukin-13 – Interleukine-13

First Reference Reagent – Premier réactif de référence

Interleukin-15 – Interleukine-15

First Reference Reagent – Premier réactif de référence

Leukaemia inhibitory factor – Facteur inhibiteur des leucémies

First Reference Reagent – Premier réactif de référence

Oncostatin M – Oncostatine M

First Reference Reagent – Premier réactif de référence

Tumour necrosis factor, beta – Facteur de nécrose tumorale, bêta

First Reference Reagent – Premier réactif de référence

Nerve growth factor – Facteur de croissance nerveuse

First Reference Reagent – Premier réactif de référence

Endocrinological substances^a – Substances endocriniennes^a

Thyroid stimulating hormone, human (recombinant) – Thyroïdostimuline humaine (recombinante)

First Reference Reagent – Premier réactif de référence

Miscellaneous – Divers

Endotoxin – Endotoxine

Second International Standard – Deuxième étalon international

MAPREC analysis of poliovirus type 3 (Sabin) – Analyse MAPREC du poliovirus type 3 (Sabin)

First International Standard – Premier étalon international

DISCONTINUATIONS – SUPPRESSIONS

Anti-rubella serum, human – Sérum antirubéolique, humain

Second International Reference Preparation – Deuxième préparation internationale de référence

Factor IX component of blood coagulation factors II, IX and X concentrate, human – Constituant facteur IX du concentré de facteurs II, IX et X de la coagulation sanguine, humain

Second International Standard – Deuxième étalon international

Oleandomycin – Oléandomycine

First International Standard – Premier étalon international

Spectinomycin – Spectinomycine

First International Reference Preparation – Première préparation internationale de référence

Triacetyloleandomycin – Triacétyloléandomycine

First International Reference Preparation – Première préparation internationale de référence

Viomycin – Viomycine

Second International Reference Preparation – Deuxième préparation internationale de référence

Endotoxin for limulus gelation tests – Endotoxine, pour le test de gélification

d'un lysat d'amœbocytes de limule

First International Standard – Premier étalon international

Thromboplastin, human, plain – Thromboplastine humaine, simple

Second International Reference Preparation – Deuxième préparation internationale de référence

^a These reference materials are interim Reference Reagents, as distinct from International Reference Reagents, and are established on the basis of limited data for certain rapidly developing fields where there is a need for standardization in measurement before an International Standard can be established. – Ces substances de référence sont des réactifs de référence intermédiaires, distincts des réactifs internationaux de référence, et sont établis sur la base de données limitées dans des domaines en évolution rapide où une standardisation des mesures s'impose avant qu'un étalon international ne soit établi.

There is also a major departure from previous requirements published by WHO concerning recommendations on the amount of residual cellular DNA permitted in products derived from continuous cell lines. In 1986, a WHO Study Group advised on the levels of contaminating DNA deriving from continuous cell lines used in the production of biopharmaceutical products for human use. A risk assessment based on an animal oncogene model suggested that *in vivo* exposure to one nanogram of cellular

Les normes s'écartent également des normes précédemment publiées par l'OMS en ce qui concerne les recommandations sur la quantité d'ADN cellulaire résiduel admise dans les produits dérivés de lignées cellulaires continues. En 1986, un groupe d'étude de l'OMS avait examiné les taux admissibles d'ADN contaminant provenant des lignées cellulaires continues utilisées dans la production de produits biopharmaceutiques à usage humain. Une évaluation du risque fondée sur un modèle d'oncogène chez l'animal avait suggéré qu'une exposition *in vivo* à un nanogramme d'ADN

DNA, where 100 copies of an activated oncogene are present in the genome, could give rise to a transformation event once in 10^9 recipients. Based on this and other evidence available at the time, it was concluded that the risk associated with residual DNA from continuous cell lines in a product is negligible when the amount of such DNA is 100 picograms or less in a single human dose, given parenterally. The perceived problem was not the DNA *per se*, but specific DNA sequences encoding activated oncogenes. A reassessment of this situation based on the current state of knowledge of the risk posed by residual DNA from continuous cell lines has led to DNA being considered now more as a cellular contaminant rather than a significant risk factor which requires removal to extremely low levels. In the light of this reassessment, the recommendations have been revised so that up to 10 nanograms of residual DNA from continuous cell lines per dose of a purified product can now be considered acceptable. Of course, as before, the purification process should be validated to demonstrate its capacity to remove cellular DNA, including spiking studies. In addition, batch to batch consistency should be demonstrated for clinical batches and in 3 or more consecutive production batches. However, subsequently, routine release testing for residual DNA in the final purified batch may now not be needed. A similar approach to the control of host cell protein contaminants was also recommended.

The Committee also considered Requirements for acellular pertussis vaccines in the light of comment and advice from 2 recent international meetings. In view of the lack of consensus about the antigenic composition of an ideal acellular pertussis vaccine and the fact that no unequivocal immunological correlates of protection against pertussis had yet been demonstrated, nor a generally accepted animal model validated to predict the clinical efficacy of these vaccines, the Committee emphasized the need for continued research to identify immune markers of protection and rigorous post marketing monitoring of vaccines, for safety and effectiveness. However, because of the urgent need for guidance, the Committee agreed that the document be adopted as Guidelines instead of Requirements to allow for future developments in the field. It also recommended that a WHO Working Group should be organized to discuss appropriate issues such as collaborative studies designed to facilitate developments in the field, for example in assay methods, and to consider how the Guidelines could be extended.

The ECBS also recognized the importance of providing guidance to national control authorities on the rapidly developing field of DNA-vaccines. This radically new approach to vaccination involves the direct introduction of plasmid DNA containing the gene encoding the antigen against which an immune response is sought into appropriate host tissue, followed by the *in situ* production of the target antigen or antigens. Although this approach offers a number of advantages, there are also several potential safety issues which need to be addressed. These are (i) the injected DNA taken up by cells of the host may integrate into the host's chromosomes and cause an insertional mutagenic event; (ii) the long-term expression of a foreign antigen may result in an undesired immunopathological reaction; (iii) the use of genes encoding cytokines or co-stimulating molecules may pose extra risks; (iv) antibodies against the injected DNA itself may be formed and may contribute towards undesired autoimmune reactions and

cellulaire, dans lequel 100 copies d'un oncogène activé sont présentes dans le génome, pouvait donner lieu à un phénomène de transformation chez un receveur sur 10^9 . D'après ces résultats et d'autres données connues à l'époque, il avait été conclu que le risque associé à l'ADN cellulaire résiduel provenant des lignées cellulaires continues était négligeable lorsque cette quantité ne dépassait pas 100 picogrammes par dose unique destinée à l'homme, administrée par voie parentérale. Le problème perçu n'était pas lié à l'ADN lui-même mais à des séquences d'ADN spécifiques codant pour des oncogènes activés. Une réévaluation de cette situation, d'après les connaissances actuelles sur les risques associés à l'ADN résiduel provenant de lignées cellulaires continues, a conduit à considérer l'ADN davantage comme un contaminant cellulaire que comme un facteur de risque significatif exigeant une élimination extrêmement poussée. A la lumière de cette réévaluation, les recommandations ont été révisées et une quantité d'ADN résiduel provenant des lignées cellulaires continues ne dépassant pas 10 nanogrammes par dose de produit purifié peut désormais être jugée acceptable. Naturellement, le processus de purification doit toujours être validé pour démontrer son aptitude à éliminer l'ADN cellulaire, notamment au moyen d'études de marquage. De plus, la régularité des lots doit être démontrée pour les lots utilisés en clinique, et sur au moins 3 lots de production consécutifs. Par la suite, le contrôle de routine de la quantité d'ADN résiduel avant la mise en circulation du lot final purifié peut toutefois être omis. Une approche similaire pour le contrôle des protéines contaminantes provenant des cellules hôtes a également été recommandée.

Le Comité a également examiné les normes relatives aux vaccins anticoquelucheux acellulaires à la lumière des commentaires et des conseils reçus lors de 2 récentes réunions internationales. Etant donné l'absence de consensus quant à la composition antigénique d'un vaccin anticoquelucheux acellulaire idéal et compte tenu du fait qu'on n'a pas encore mis en évidence de corrélats immunologiques stricts de la protection contre la coqueluche, et qu'il n'existe pas de modèle animal généralement reconnu qui soit validé pour prévoir l'efficacité clinique de ces vaccins, le Comité a souligné la nécessité de poursuivre les recherches afin d'identifier des marqueurs immunologiques de la protection ainsi que la nécessité d'une surveillance stricte des vaccins après commercialisation du point de vue de leur innocuité et de leur efficacité. Cependant, en raison de l'urgence de lignes directrices, le Comité est convenu d'adopter le document en tant que ligne directrice et non en tant que norme afin de pouvoir tenir compte des avancées dans ce domaine. Il a également recommandé qu'un groupe de travail de l'OMS soit organisé pour débattre de questions appropriées, par exemple les études collectives destinées à favoriser les progrès dans ce domaine, notamment en ce qui concerne les méthodes de titrage, et pour examiner la manière de compléter et d'élargir les directives.

Le Comité a également reconnu l'importance de lignes directrices à l'intention des autorités dans le domaine en évolution rapide des vaccins à base d'ADN. Cette approche radicalement nouvelle de la vaccination suppose l'introduction directe de plasmides d'ADN contenant le gène codant pour l'antigène contre lequel on recherche une réponse immunitaire dans les tissus appropriés de l'hôte, puis la production *in situ* du ou des antigènes cibles. Bien que cette approche présente divers avantages, un certain nombre de questions d'innocuité doivent être examinées: i) l'ADN injecté dans les cellules de l'hôte peut s'intégrer dans ses chromosomes et provoquer une mutagenèse par insertion; ii) l'expression prolongée d'un antigène étranger peut entraîner une réaction immunopathologique indésirable; iii) l'utilisation de gènes codant pour des cytokines ou des molécules provoquant une co-stimulation peut entraîner des risques supplémentaires; iv) des anticorps contre l'ADN injecté lui-même peuvent se former et contribuer à des réactions auto-immunes indésirables; v) l'antigène exprimé peut lui-même posséder une activité biologique. Ces diverses ques-

(v) the expressed antigen may itself have biological activity. These various issues are discussed in the Guidelines, recognizing that they must be addressed experimentally in the development of DNA-vaccines. The purpose of the document is to indicate appropriate methods for the control of the manufacture and testing of plasmid DNA vaccines and the information specific to these vaccines that should be included in submissions by manufacturers to national control authorities in support of applications for the authorization of clinical trials and marketing.

Reports on various other activities in the biological standardization field were also considered by the ECBS at this meeting. These included reports on reverse transcriptase activity in avian cells, on cytokines, on reference preparations for evaluating hepatitis B, C and HIV diagnostic kits and on the standardization of gene amplification methods for the virological safety testing of blood products. The Committee recognized the great importance of the latter 2 activities for ensuring the quality and safety of blood and blood derivatives. Its attention was also drawn to the possible implications of WHO's biological standardization activities on international trade as a result of the entry into force of World Trade Organization agreements and it asked for this area to be clarified.

tions sont discutées dans les lignes directrices, qui reconnaissent qu'elles doivent faire l'objet d'études expérimentales dans le cadre du développement des vaccins à base d'ADN. L'objectif du texte est d'indiquer des méthodes appropriées de contrôle de la fabrication et d'essai des vaccins à base d'ADN plasmidique, et d'indiquer les informations spécifiques à ces vaccins qui doivent figurer dans les dossiers soumis par les fabricants aux autorités nationales de contrôle à l'appui des demandes d'autorisation d'essais cliniques et de mise sur le marché.

Lors de sa réunion, le Comité a également examiné des rapports sur diverses autres activités dans le domaine de la standardisation biologique. Ces rapports portaient sur l'activité transcriptase inverse dans les cellules aviaires, sur les cytokines, sur des préparations de référence destinées à l'évaluation des trousse de diagnostic pour l'hépatite B, l'hépatite C et le VIH, et sur la standardisation des méthodes d'amplification génique utilisées pour les épreuves de sécurité virologique des produits sanguins. Le Comité a reconnu l'importance de ces 2 dernières activités du point de vue de l'assurance de la qualité et de la sécurité du sang et des produits sanguins. Il a également noté les répercussions possibles des activités de standardisation biologique de l'OMS sur le commerce international à la suite de l'entrée en vigueur des accords de l'Organisation mondiale du Commerce et a demandé des éclaircissements à ce sujet.