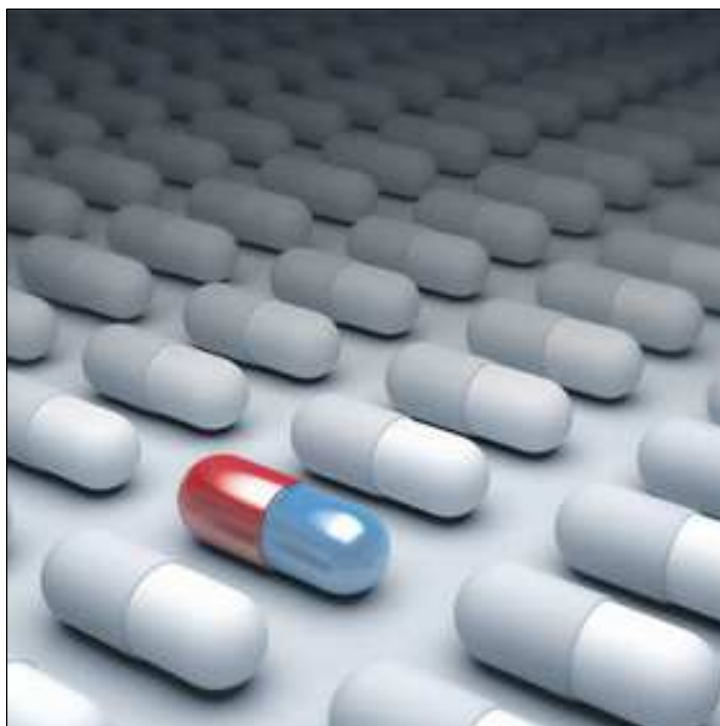




## **TRABAJO DE FIN DE GRADO**

## **FACULTAD DE FARMACIA**

## **BIOSIMILARES: BIOSIMILITUD ANALÍTICA**



AUTOR: AIRAN MARTÍN CONCEPCIÓN

TUTOR: ALEXIS MANUEL OLIVA MARTÍN

CURSO: 2016-2017

## INDICE

---

Abstract/Resumen	3
Objetivos	4
Material y métodos	4
Fármacos biológicos y biosimilares	5
Biosimilitud analítica	6
Antecedentes y estado actual	6
Como demostrar la biosimilitud	10
Evaluación de la biosimilitud	12
análisis de propiedades físico-químicas	12
análisis estructural	13
actividad biológica	14
estabilidad	15
inmunogenicidad	16
Conclusiones	16
Bibliografía	17

## **ABSTRACT**

A biological drug is developed from a biological source, they have an immense complexity of both structural and functional, and therefore only the living beings are capable of producing this, this complexity is what makes them hard to identical copies. A biosimilar is a drug developed for that is similar to the reference drug; it is different with respect to a generic in the sense that these are identical copies because they have simpler structures that the biological and can be manufactured in series. To demonstrate that the biosimilars are similar to the biological reference is necessary to make a series of studies. First stage, we must study the structural and functional characterization whereas in a second stage, studies of pharmacokinetics and pharmacodynamics, animal studies, clinical immunogenicity and clinical studies in order to evaluate the safety, tolerability and effectiveness. The objective of this work will be the assessment of the biosimilarity demonstrating the similarity at the level of purity and quality. The study of physico-chemical, biological activity, impurities and stability must demonstrate that the existing differences will not have clinical consequences and this should be carried out simultaneously in both products. The development of these biosimilar should get a health savings and that many patients can access them at a lower cost.

## **RESUMEN**

Un fármaco biológico es aquel desarrollado a partir de una fuente biológica, caracterizándose por su complejidad tanto estructural como funcional, y por ello solo los seres vivos son los únicos capaces de producir esta complejidad, de ahí la dificultad de obtener una copia idéntica. Un biosimilar es un fármaco desarrollado para que sea similar al fármaco de referencia. Es diferente con respecto a un genérico en cuanto que estos son copias idénticas puesto que tienen estructuras más simples que los biológicos y pueden fabricarse en serie siendo idénticos. Para demostrar que los biosimilares son parecidos a los biológicos de referencia se realizan una serie de estudios. Se comienza estudiando la caracterización estructural y funcional; en una segunda etapa, se realizan estudios de farmacocinética y farmacodinamia, estudios en animales, inmunogenicidad clínica y finalmente estudios clínicos para evaluar la seguridad, tolerancia y eficacia. El objetivo de este trabajo será la evaluación de la biosimilitud demostrando la similitud a nivel de pureza y calidad. Para ello, el estudio de las propiedades fisicoquímicas, actividad biológica, impurezas y estabilidad deberán demostrar que las diferencias existentes no tendrán consecuencias clínicas. Todos estos estudios deben realizarse simultáneamente tanto en el biológico de referencia como en el biosimilar. El desarrollo de estos biosimilares podría implicar un ahorro sanitario y facilitar que un mayor número de pacientes puedan acceder a tratamientos con un menor coste.

## **OBJETIVOS**

Este trabajo tiene un doble objetivo:

1. Describir las diferencias entre medicamentos biológicos y biosimilares
2. Conocer los ensayos necesarios para demostrar la biosimilitud analítica y funcional de los fármacos biosimilares

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Para la realización del presente trabajo se utilizó la base de datos PubMed ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) realizando la búsqueda con las siguientes palabras clave: biosimilar; physico-chemical characterization; structural characterization; analytical similarity; quality attribute; circular-dichroism; chromatography; Proteomics; mass-spectrometry. Además dada la trascendencia de este tipo de fármacos, se consultó la página web de la Agencia Española de Medicamentos y Productos sanitarios (AEMPS) así como la página web de la Agencia de Drogas y Alimentos de EE.UU. (FDA).

## **FÁRMACOS BIOLÓGICOS Y BIOSIMILARES**

### **¿Qué es un fármaco biológico?**

Un fármaco biológico es aquel que ha sido elaborado a partir de una fuente biológica: microorganismos (bacterias, hongos, etc), órganos y tejidos de origen vegetal o animal, y fluidos de origen vegetal o animal.

Algunos de ellos pueden estar ya presentes en el organismo humano y, como ejemplos se pueden mencionar la insulina, la hormona del crecimiento y las eritropoyetinas. A diferencia de los fármacos no biológicos, los biofármacos se caracterizan por su complejidad tanto a nivel estructural como funcional, razón por la que únicamente los seres vivos tienen capacidad de reproducir esta complejidad. Tanto esta complejidad como la forma en la que se producen pueden provocar cierto grado de variabilidad en las moléculas del mismo biofármaco, en particular, entre los distintos lotes del fármaco <sup>1</sup>.

### **¿Qué es un fármaco biosimilar?**

Un fármaco biosimilar es un producto biológico que se desarrolla para que sea similar a un medicamento biológico ya existente (el “fármaco de referencia”). Los biosimilares no son iguales a los genéricos, que tienen estructuras químicas más simples y se consideran idénticos a sus medicamentos de referencia.

El biosimilar y su producto de referencia son esencialmente la misma sustancia biológica, aunque existen ligeras diferencias debido a la complejidad de su naturaleza y a los métodos de producción. Al igual que el fármaco de referencia, el biosimilar posee un grado de variabilidad natural, aunque se debe demostrar que esa posible variabilidad no afecta a la seguridad ni a la eficacia <sup>1</sup>.

Para la aprobación de biosimilares, estos deben pasar un exhaustivo ejercicio de comparabilidad que demuestre que realmente son similares al biológico de referencia <sup>2</sup>.

## **BIOSIMILITUD ANALÍTICA**

### **Antecedentes y estado actual**

No creemos oportuno describir en detalle las diferencias entre los conceptos de “fármacos bioequivalentes” y “fármacos biosimilares”, pero sí resaltar que no están resueltos los problemas que plantea una definición de “biosimilitud”, a partir de la cual pudiéramos derivar los criterios analíticos para evaluarla. Los puntos que articulan la discusión actual sobre biosimilares y su autorización son los siguientes:

Primero, dos fármacos biosimilares no tienen que ser necesariamente químicamente idénticos debido a los sistemas de expresión y de purificación utilizados (fases up-stream y fase down-stream respectivamente), y las modificaciones químicas intencionadas para mejorar la biodistribución (biobetters). Segundo, los sistemas de producción de fármacos biotecnológicos son menos estables que los procesos de síntesis química, por lo que hemos de aceptar cierto grado de variabilidad tanto para el fármaco de referencia como para el fármaco biosimilar. Tercero, las interacciones entre el fármaco y los excipientes utilizados son complejas, y la incidencia en la calidad y estabilidad del producto no bien conocidas<sup>3</sup>.

Desde la autorización del primer biosimilar en 2006, la introducción de los medicamentos biosimilares ha sido muy variable en los distintos países de la Unión Europea. En España su utilización en estos 10 años ha sido creciente y los profesionales sanitarios se han ido familiarizando con su desarrollo y con el procedimiento regulatorio que se sigue para su evaluación y autorización, aunque la extrapolación de los datos clínicos obtenidos a todas las indicaciones que posee el medicamento de referencia sigue siendo un aspecto controvertido.

Desde que la legislación sobre medicamentos biosimilares entrase en vigor se han autorizado más de 30 medicamentos de este tipo que incluyen diferentes principios activos tales como somatropina, eritropoyetina, filgrastim, o insulina, entre otros, y varios anticuerpos monoclonales como infliximab, rituximab y adalimumab (Tabla 1).

<b>NOMBRE</b>	<b>PRINCIPIO ACTIVO</b>	<b>AREA TERAPEUTICA</b>	<b>FECHA AUTORIZACIÓN</b>
<b>Abasaglar</b>	Insulina glargina	Diabetes mellitus	09/09/2014
<b>Abseamed</b>	Epoetin alfa	Anemia, cáncer, fallo renal	28/08/2007
<b>Accofil</b>	Filgrastim	Neutropenia	18/09/2014
<b>Amgevita</b>	Adalimumab	Artritis, artritis psoriásica, colitis reumatoide, Crohn, psoriasis, espondilitis anquilosante	22/03/2017
<b>Bemfola</b>	Follitropin alfa	Anovulación	27/03/2014
<b>Benepali</b>	Etanercept	Artritis, artritis psoriásica, psoriasis reumatoide	14/01/2016
<b>Binocrit</b>	Epoetin alfa	Anemia, fallo renal	28/08/2007
<b>Epoetin Alfa Hexal</b>	Epoetin alfa	Anemia, cáncer, fallo renal	28/08/2007
<b>Filgrastim hexal</b>	Filgrastim	Cáncer, neutropenia, trasplante de células madres hematopoyéticas	06/02/2009
<b>Flixabi</b>	Infliximab	Artritis, artritis psoriásica, colitis reumatoide, Crohn, psoriasis, espondilitis anquilosante	06/05/2016
<b>Grastofil</b>	Filgrastim	Neutropenia	18/10/2013
<b>Inflectra</b>	Infliximab	Artritis, artritis psoriásica, colitis reumatoide, Crohn, psoriasis, espondilitis anquilosante	10/09/2013
<b>Inhixa</b>	Enoxiparina sódica	Tromboembolismo venoso	15/09/2016
<b>Lusduna</b>	Insulina glardina	Diabetes mellitus	04/01/2017
<b>Movymia</b>	Teriparatide	Osteoporosis	11/01/2017
<b>Nivestim</b>	Filgrastim	Cáncer, trasplante de células madres hematopoyéticas, neutropenia	08/06/2010

<b>Omnitrope</b>	Somatropina	Cáncer, trasplante de células madres hematopoyéticas, síndrome Turner	12/04/2006
<b>Ovaleap</b>	Follitropin alfa	Anovulación	27/09/2013
<b>Ratiograstim</b>	Filgrastim	Cáncer, trasplante de células madres hematopoyéticas, neutropenia	15/09/2008
<b>Remsima</b>	Infliximab	Artritis, artritis psoriásica, colitis reumatoide, Crohn, psoriasis, espondilitis anquilosante	10/09/2013
<b>Retacrit</b>	Epoetin zeta	Anemia, transfusión sanguínea autologa, cáncer, fallo renal	18/12/2007
<b>Silapo</b>	Epoetin zeta	Anemia, transfusión sanguínea autologa, cáncer, fallo renal	18/12/2007
<b>Solymbic</b>	Adalimumab	Artritis, artritis psoriásica, colitis reumatoide, Crohn, psoriasis, espondilitis anquilosante	22/03/2017
<b>Terrosa</b>	Teriparatide	Osteoporosis	04/01/2017
<b>Tevagrastim</b>	Filgrastim	Cáncer, trasplante de células madres hematopoyéticas, neutropenia	15/09/2008
<b>Thorinane</b>	Enoxaparina sodica	Tromboembolismo venoso	15/09/2016
<b>Truxima</b>	Rituzimab	Artritis reumatoide, leucemia linfocítica crónica de cel. B, Linfoma No Hodking	17/02/2017
<b>Zarzio</b>	Filgrastim	Cáncer, trasplante de células madres hematopoyéticas, neutropenia	06/02/2009

**Tabla 1:** Biosimilares comercializados en EEUU y en Europa hasta marzo de 2017 <sup>4</sup>.

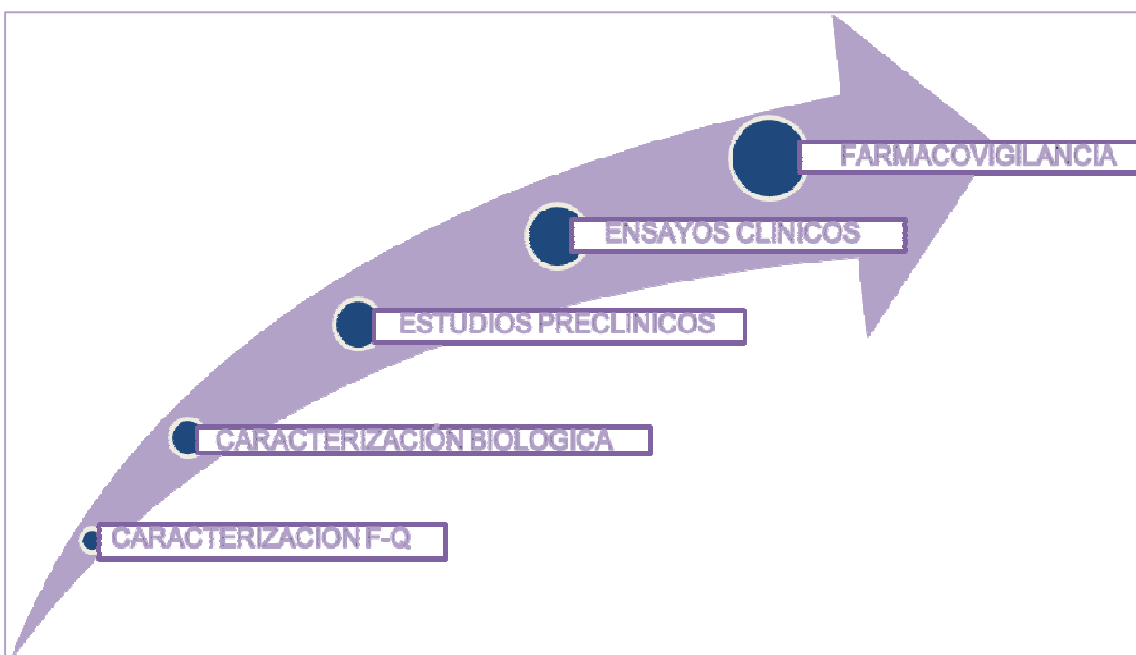


La mayoría de los fármacos biológicos son proteínas, lo que significa que están formados por cadenas peptídicas con una estructura tridimensional, razón por la que son más complejos que los sintetizados químicamente (Tabla 2). Al ser tan complejos es difícil predecir cómo será el producto final, ya que cualquier mínimo cambio puede afectar al producto final y a su actividad biológica <sup>5</sup>.

<b>Característica</b>	<b>Fármacos</b>	<b>Biofármacos</b>
<b>Tamaño y estructura</b>	<1000Da Estructura simple y definida	4000-140.000Da Estructuras tridimensionales
<b>Estabilidad</b>	Basada en estudios de aceleración	Basada en su conformación espacial
<b>Diferencias farmacocinéticas</b>	Difunden fácilmente F=mayor Sufren metabolización	Difunden peor F=menor→inyectarlos No sufren metabolización
<b>Mecanismos farmacológicos</b>	Su mecanismo farmacológico, mediante el enlace con los objetivos (enzimas, receptores...)	Su mecanismo farmacológico, mitiga las deficiencias del cuerpo (ej.: déficit de insulina)
<b>Seguridad</b>	Más tóxicos. Pueden enlazar con otros destinos	Menos tóxicos
<b>Procesos de fabricación</b>	Síntesis química	Origen biotecnológico, obtenidos a partir de cultivos celulares

**Tabla 2:** Principales características de los fármacos convencionales y biofármacos según Chow y col. .2013.

Para establecer la biosimilitud entre el biosimilar y el producto de referencia es necesario realizar una serie de estudios y ensayos. Primero con análisis físico-químicos y biológicos para demostrar la elevada similitud. En segundo lugar y una vez demostrado que no existe grandes diferencias significativas en el primer nivel, se realizan ensayos preclínicos y clínicos conducentes a demostrar la biosimilitud en este ámbito. Si el resultado es favorable, se procede a la autorización por la autoridad competente, teniendo en cuenta los riesgos post-comercialización con la farmacovigilancia del producto, como se muestra en la figura 1 <sup>6</sup>.

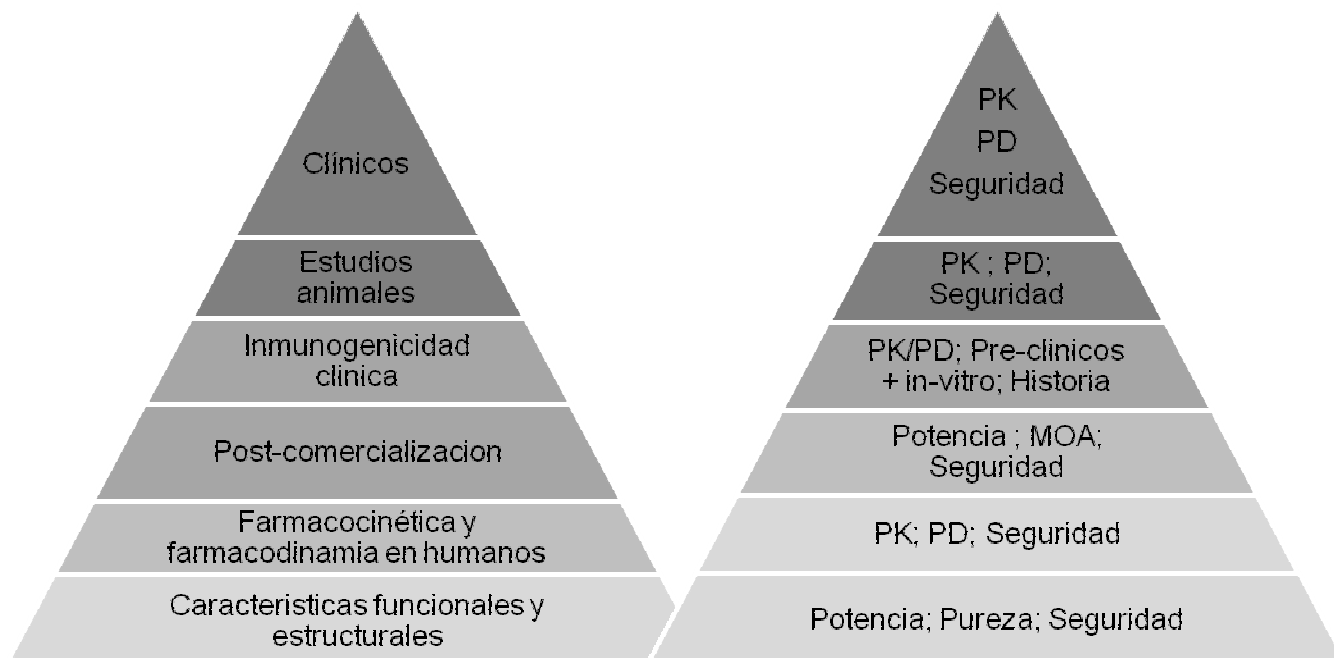


**Figura 1:** Etapas implicadas en el proceso de análisis y estudio de los biosimilares

### ¿Cómo demostrar la biosimilitud?

A diferencia de los productos genéricos, el desarrollo de productos biosimilares es mucho más complicado debido a las diferencias fundamentales a nivel de la estructura y función y a los procesos de fabricación. Así que los criterios y métodos estándar para el diseño y el análisis de evaluación de la bioequivalencia de genéricos no pueden ser directamente aplicables a la evaluación de similitud de productos biosimilares <sup>7</sup>.

Es aconsejable comenzar con la evaluación de similitudes en atributos de calidad críticos en varias etapas del proceso de fabricación. El proceso se inicia con la caracterización estructural y funcional. En una segunda etapa, se realizan estudios de farmacocinética-farmacodinamia, estudios en animales, inmunogenicidad clínica y estudios clínicos para evaluar la seguridad, tolerancia y eficacia como vemos en la figura 2 <sup>7</sup>.



**Figura 2.** En la parte izquierda de la pirámide se resume el acercamiento gradual recomendado por la FDA. Comenzamos con la evaluación de similitud en atributos de calidad críticos en las distintas etapas del proceso de fabricación del biosimilar comparando con los productos de referencia. En la parte derecha de la pirámide indica el plan que tiene el fabricante sobre el acercamiento sugerido por la FDA <sup>7</sup>.

La FDA (Food and Drug Administration) estadounidense ha publicado tres guías preliminares para demostrar la biosimilitud de los biosimilares. Estas guías incluyen: (A) consideraciones científicas en la demostración de biosimilitud a un producto de referencia; (B) consideraciones de calidad en la demostración de biosimilitud a un producto de referencia y (C) preguntas y respuestas <sup>8,9,10</sup>.

Los objetivos de estas guías son:

- Un enfoque gradual para demostrar la biosimilitud, que incluye una comparación del producto propuesto y el producto de referencia con respecto a la estructura, la función, la toxicidad animal, la farmacocinética y farmacodinamia, la inmunogenicidad clínica y la seguridad y eficacia clínica.
- Las pruebas que utilizara la FDA para revisar las solicitudes de un biosimilar acorde con el enfoque para la evaluación de las evidencias científicas.
- Principios científicos generales en la realización de análisis estructural, ensayos funcionales, ensayos con animales, estudios de farmacocinética y farmacodinamia, evaluaciones de inmunogenicidad clínica y estudios clínicos comparativos <sup>8</sup>.

En cambio la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) publicó en 2005 la Guía "Guideline on Similar Biological Medicinal Products (CHMP/437/04), actualizada en 2014 (CHMP/437/04 Rev 1). A diferencia de EE.UU., en Europa no hay criterios generales, sino que se deben establecer caso por caso.

Sin embargo, es necesario proporcionar los estudios de comparabilidad que garanticen la calidad, seguridad y eficacia del biosimilar y el producto de referencia utilizado en dicho estudio debe estar autorizado en Europa.

## **Evaluación de la biosimilitud**

Con el fin de demostrar la similitud a nivel de la pureza y calidad, la caracterización del biosimilar y el producto de referencia deben ser llevadas a cabo usando las técnicas apropiadas para comparar sus propiedades fisicoquímicas, actividad biológica, impurezas y estabilidad. Además debe demostrarse la coherencia y solidez del proceso de fabricación mediante los respectivos controles de calidad y validación del proceso. Para garantizar la seguridad y eficacia; deben llevarse a cabo los ensayos de inmunogenicidad, los estudios preclínicos, los ensayos clínicos y la farmacovigilancia para demostrar que no existen diferencias significativas <sup>11</sup>.

No se espera que los productos sean idénticos. Las diferencias que se encuentren deben justificarse y demostrar que no tendrán consecuencias clínicas, para ello los estudios clínicos se realizan paralelamente en ambos productos.

### Análisis de las propiedades físico-químicas

En la caracterización físico-química se estudia el peso molecular, tamaño y forma, la carga y la hidrofobicidad. Una de las primeras técnicas utilizadas para el análisis de proteínas fue la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), <sup>12, 13,14</sup>. Su principal ventaja es la simplicidad en la interpretación del peso molecular, pero este ensayo tiene limitaciones y los resultados pueden ser engañosos. Esta técnica se usa a menudo combinada con Western (técnica que implica una reacción de la proteína con anticuerpos específicos para visualizar el producto).

El isoelectroenfoque (IEF) separa las proteínas según su punto isoeléctrico y puede utilizarse junto con el blotting de proteínas para demostrar la heterogeneidad de los productos <sup>15</sup>. Tanto IEF como PAGE son técnicas de aplicación muy solicitadas y pueden utilizarse de forma cualitativa o cuantitativa con el análisis densitométrico <sup>16</sup>.

Una alternativa a PAGE es la electroforesis capilar de zona (EZC) que separa las proteínas en función de su radio hidrodinámico, y carga <sup>15</sup>. La posibilidad de automatización facilita el proceso de control y validación de la misma, hecho que ha incrementado su interés y difusión entre los laboratorios <sup>17</sup>.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se ha convertido en una potente técnica en el análisis de proteínas. Es compatible con otras técnicas y puede automatizarse, permite procesar grandes cantidades de muestra, establecer procesos de control y validación.

La HPLC en fase reversa permite separar proteínas en función de su mayor o menor afinidad por la columna (superficie apolar) con respecto al solvente de naturaleza polar.

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) separa las proteínas en función de su tamaño.

Hoy en día se considera la mejor técnica para cuantificar la dimerización y formación de agregados <sup>18</sup>. Sundaram y col; han utilizado esta técnica en el proceso de caracterización de un biosimilar de insulina humana. El FDA tiene previsto proponer en un próxima guía la utilización de la SEC en el proceso de caracterización de anticuerpos monoclonales, haciendo hincapié en la necesidad de conocer el perfil de impurezas presente en la muestra, especialmente las especies de alto y bajo peso molecular así como la cuantificación de las diferentes especies, de forma que dicho perfil se debe ajustar a los criterios de calidad (todavía no se conocen) establecidos para cada anticuerpo.

### Análisis estructural

En el artículo *New Trends in Analysis of Biopharmaceutical Products* <sup>19</sup> se revisaron los métodos analíticos utilizados para detectar y cuantificar la presencia de impurezas y alteraciones estructurales debidas a la degradación de los fármacos biotecnológicos. Esta caracterización estructural aborda diferentes aspectos:

- Secuenciación de aminoácidos en la estructura primaria
- Estructuras de orden superior incluyendo secundario, terciario y cuaternario
- Modificaciones enzimáticas post-transcripcionales como la glicosilación y fosforilación.
- Otras posibles variaciones como la deaminación y la oxidación
- Modificaciones químicas intencionadas <sup>8</sup>.

Para cumplir con estos objetivos se dispone de un amplio abanico de técnicas, cada una de ellas mide distintas propiedades de la molécula <sup>20</sup> y con una especificidad y sensibilidad adecuadas <sup>21</sup>. Debido a la propia complejidad de la estructura de los fármacos proteicos junto con la diversidad de métodos analíticos, es necesario combinar la información suministrada por varias técnicas con el fin de garantizar la calidad y estabilidad de las proteínas.

La estructura primaria de las proteínas es la secuencia lineal de los aminoácidos, desde el grupo amino terminal hasta el grupo carboxilo libre.

Aunque existen varios métodos para identificarla, las más frecuentes son: la espectrometría de masas sola o combinada con el mapeo peptídico obtenido tras degradación enzimática selectiva y la degradación de Edman <sup>22, 23,24</sup>.

La espectroscopia de dicroísmo circular (CD) es un método útil para evaluar la estructura secundaria, proporcionando información sobre la existencia de estructura alfa, beta o random-coil <sup>25</sup>. La estructura terciaria proporciona información tridimensional sobre la conformación y plegamiento de la proteína donde los puentes de di-sulfuro juegan un papel importante <sup>26,27</sup>.

La estructura terciaria puede ser investigada por fluorescencia intrínseca, especialmente debida al triptófano, y por RMN de proteínas bidimensional y difracción de rayos-x.

La fluorescencia del triptófano es la más utilizada, dada su sensibilidad para detectar cambios estructurales relacionados con la desnaturalización, la agregación y la formación de complejos de proteínas<sup>28, 29, 30,31</sup>. La especificidad se puede incrementar utilizando tintes fluorescentes que se unen a determinados elementos estructurales<sup>32,33</sup>.

La difracción de rayos X y la RMN constituyen técnicas alternativas para determinar las estructuras tridimensionales de las proteínas, pero presentan limitaciones en el análisis de rutina<sup>34</sup>. La RMN permite generar la huella digital espectral de proteínas en solución y proporcionar información de la ubicación de los elementos en el espacio tridimensional. Proporciona datos de los residuos que tienen contacto con solventes y puede ser utilizada para demostrar un grado de comparabilidad estructural<sup>17</sup>. Esta información se puede confirmar utilizando la difracción de Rayos-X, técnica que proporciona información sobre la distancia que existe entre los átomos lo que permite conocer su posición en el espacio.

La interacción que se produce entre las diferentes especies de una proteína, especialmente de monómero-monómero son responsables de la existencia de estructura cuaternaria. En este caso, la técnica de elección es la ultracentrifugación analítica, método capaz de manejar muestras de proteínas donde hay presentes grandes partículas de agregados. Consta de una centrifuga de alta velocidad, un rotor y un sistema óptico para medir el gradiente de concentración de proteínas. La muestra se separa por peso molecular y radio hidrodinámico<sup>35</sup>. La ultracentrifugación es capaz de proporcionar un mayor grado de confianza en el análisis de agregación en comparación con métodos alternativos<sup>36</sup>.

Hoy en día, la combinación de separación cromatográfica y espectrometría de masas de ionización por electrospray junto con la degradación enzimática selectiva es el método de elección para dilucidar cambios a nivel estructural<sup>37,38</sup>. Además la combinación de esta técnica con el dicroísmo circular y la electroforesis en gel (SDS-PAGE), permitió a Perrin y col. (2010) incrementar la capacidad y sensibilidad para detectar modificaciones a diferentes niveles estructurales de biosimilares que de otro modo pasarían desapercibidos.

### Actividad biológica

La actividad biológica de productos proteicos debe ser evaluada mediante ensayos funcionales en cultivos in-vitro y/o in-vivo. Los ensayos in-vitro pueden incluir pruebas aglutinantes y de cinética enzimática. Los ensayos in-vivo pueden incluir el uso de modelos de animales de la enfermedad para evaluar los modelos farmacodinámicos o la eficacia.

La idea general es realizar un ensayo de dilución que mide el efecto del producto biológico en un organismo, en las células del tejido, enzimas o su unión al receptor, proceso que se ha de realizar a diferentes dosis. Las técnicas que pueden ser utilizadas incluyen: método de interpolación y/o de bracketing, método de múltiples puntos.

En este punto, las autoridades recomiendan a los fabricantes que deben desarrollar y validar bioensayos para comprobar la actividad biológica. Además, dichos ensayos deben ser fáciles de manejar y que permitan comprobar la calidad de forma sencilla y rápida en el laboratorio.

La ELISA en diferentes formatos ha sido establecida e integrada en los protocolos de pruebas analíticas <sup>17</sup>.

Los ensayos in-vitro son potentes métodos para evaluar la calidad de una proteína terapéutica. Una proteína para enlazar a un receptor específico o un ligando debe adoptar una correcta configuración tridimensional. La funcionalidad del enlace puede relacionarse directamente con la actividad biológica de la proteína. Aunque los procedimientos analíticos que permiten evaluar las propiedades fisicoquímicas de la proteína son esenciales para demostrar la comparabilidad estructural, los bioensayos in-vitro y/o in-vivo son capaces de confirmar la actividad biológica.

Ebbers y col demostraron con estudios in vitro, la vinculación específica del bevacizumab con el factor de crecimiento endotelial vascular. Esto fue confirmado con diversos ensayos de inmunoprecipitación y ensayos de resonancia de plasmón superficial. Estos ensayos permiten una evaluación cuantitativa de la afinidad de los anticuerpos a su destino <sup>39</sup>.

#### Estabilidad.

Los estudios de estabilidad forman parte de la caracterización de los biosimilares. Los biofármacos pueden estar sometidos a procesos de inestabilidad química (oxidación, proteólisis, etc) y/o física (desnaturalización, agregación, etc). Los estudios de estabilidad deben incluir resultados de ensayos acelerados bajo diversas condiciones de estrés (temperatura, luz, humedad...) con el fin de identificar las posibles vías de degradación de la proteína y determinar su mecanismo.

Aunque los datos de estabilidad a tiempo real forman la base para determinar el plazo de validez del fármaco, la utilización de metodologías como la de Vogel-Tamman-Fulcher o de Arrhenius pueden ser engañosas y dar lugar a plazos de validez sobrestimados, pero pueden ser aplicadas para fijar los límites inferior y superior para la velocidad de agregación, es decir, conocer los diferentes escenarios con respecto a la agregación potencial del fármaco <sup>40</sup>

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica utilizada para evaluar la estabilidad térmica de proteínas <sup>17</sup>. El mecanismo de agregación de las proteínas puede implicar la existencia de una conformación intermedia desnaturalizada (desplegada) a partir de la cual se lleva a cabo la agregación.

Esta etapa de desnaturalización, clave en la estabilidad de la proteína, puede estudiarse mediante calorimetría diferencial de barrido <sup>41</sup>.

### Inmunogenicidad

La seguridad y eficacia depende en parte del grado de su pureza, de ahí la necesidad de conocer la naturaleza y origen de las impurezas. Estas impurezas pueden tener su origen en la fuente biológica utilizada (un simple error de codificación puede dar lugar a un producto inactivo o productos secundarios no deseados). También se debe tener en cuenta los productos químicos utilizados en el propio proceso de fabricación o aquellos factores que pueden inducir la formación de agregados (temperatura, agitación, filtración, etc). Esto último tiene especial relevancia desde el punto de vista de la inmunogenicidad. En el caso de los biosimilares, el FDA (2012) indica que el perfil de agregados y el porcentaje de especies de elevado peso molecular deben ser conocidos.

Si tras un estudio comparativo no se observan diferencias en estos dos aspectos no es necesario determinar la inmunogenicidad del producto. Sin embargo, no está claro cuál es el nivel de agregados considerado aceptable ni tampoco se ha fijado la cantidad, tipo y tamaño de estos agregados capaz de inducir una respuesta inmune.

Debido a que los biológicos son moléculas activas pueden provocar una respuesta inmune inesperada, razón por la que se considera la inmunogenicidad como el problema más crítico de seguridad para la evaluación de los biosimilares.

La inmunogenicidad de los biosimilares puede tener consecuencias como; hipersensibilidad, autoinmunidad, pérdida de eficacia.

Las causas posibles de inmunogenicidad incluyen, pero no están limitados a: (I) las diferencias entre las secuencias de proteínas terapéuticas y de proteínas endógenas, (II) las secuencias no-humana, (III) alteraciones estructurales, (IV) condiciones de almacenamiento; (V) la purificación durante el proceso de fabricación, (VI) la formulación, (VII) la ruta, dosis y frecuencia de administración, (VIII) estado del paciente como antecedentes genéticos<sup>2</sup>.

### **CONCLUSIONES**

Un biosimilar se caracteriza por su complejidad que radica en su propia naturaleza y en su proceso de fabricación, por lo que hemos de aceptar cierto grado de variabilidad entre el fármaco de referencia y el biosimilar, pero a su vez las diferencias existentes no deben tener consecuencias clínicas ni afectar a la seguridad y eficacia de los mismos.

Para demostrar la biosimilitud analítica se debe analizar las propiedades físico-químicas, análisis estructural, estabilidad, actividad biológica e inmunogenicidad del biosimilar y del producto de referencia. Para este fin, se dispone de un amplio número de técnicas analíticas, destacando el hecho de recurrir a varias de ellas para caracterizar totalmente ambos productos.

El desarrollo de los biosimilares debería permitir que muchos pacientes puedan acceder a tratamientos con un menor coste con las mismas garantías de seguridad y eficacia y con el consiguiente ahorro sanitario.



## **BIBLIOGRAFÍA**

- [1] Preguntas y respuestas sobre medicamentos biológicos y biosimilares EMA/837805/2011
- [2] Chow S., Wang, J., Endrenyi, L. and Lachenbruch, P. (2013). Scientific considerations for assessing biosimilar products. *Statistics in Medicine*,32, 370-381.
- [3] Kamerzell, T. J., Esfandiary, R., Joshi, S. B., Middaugh, C. R., Volkin, D. B. (2011) Protein – excipient interactions: mechanisms and biophysical characterization applied to protein formulation development. *Advanced Drug Delivery Review* 63, 1118 – 1159
- [4] (<http://www.ema.europa.eu/ema/>)
- [5] Bui, L., et al.(2015). Key considerations in the preclinical development of biosimilars. *Drug Discovery Today*,20, 3-15.
- [6] Li, E., Abbas, R., Jacobs, I. and Yin, D. (2015). Considerations in the Early development of Biosimilar Products. *Drug Discovery Today*, 20, 1-9.
- [7] Chung Chow S. (2014). On Assessment of Analytical Similarity in Biosimilar Studies. *Drug Designing: Open Access*, 03.
- [8] Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product. Guidance for Industry. (2015). U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Biologics Evaluation and Research (CBER).
- [9] Quality considerations in demonstrating biosimilarity of a Therapeutic Protein Product to a reference product.(2015). U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration.
- [10] Biosimilars: Additional Questions and Answers Regarding Implementation of the Biologics Price Competition and Innovation Act of 2009. (2015). U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration.
- [11] Guideline on Similar Biological Medicinal Products. (2005). The European Medicines Agency . Evaluation of Medicines for Human Use. EMEA/CHMP/437/04
- [12] Laemmli U., K.,(1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227. 680-685
- [13] Goeddel, D., V., Heyneker, H.,L., Hozumi, T., Arentzen, R., Itakura, K., Yansura, D.,G., et al.,(1979). Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature* 281, 554-548.

- [14] Lee Huang, S.,(1984). Cloning and expression of human erythropoietin in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 2708-2712.
- [15] Park, S.,S., et al.(2009). Biochemical assessment of erythropoietin products from Asia versus Epoetin alfa manufactured by Amgen. *May. J Pharm Sci*, 98,1688-1699.
- [16] Vesterbe, O. and Svensson, H.,(1966). Isoelectric fractionation analysis and Characterization of ampholytes in natural pH gradients.4. Further studies on resolving power in connection with separation of myoglobins. *Acta Chem Scand*, 20, 820-834.
- [17] Robert, J., Falconer, Dianne Jackson-Matthews and Stephen, M. Mahler.,(2011) Analytical strategies for assessing comparability of biosimilars. *J Chen Technol Biotechnol*, 86, 915-922.
- [18] Oliva, A., Fariña, J.B., M. Llabrés. (2015) Fitting bevacizumab aggregation kinetic data with the Finke-Watzky two-step model: effect of thermal and mechanical stress. *Eur. J. Pharm. Sci.* 77, 170-179
- [19] Oliva, A., Fariña, J.B., and Llabres, M. (2007). New Trends in Analysis of Biopharmaceutical Products. *Current Pharmaceutical Analysis* 3,230-248
- [20] Hanke, A.T., Otens, M. (2014) Purifying biopharmaceuticals: knowledge-based chromatographic process development. *Trends in Biotechnology*, 32, 210-220.
- [21] Sorgel, F., Lerch, H., Lauber, T.,(2010). Physicochemical and biologic comparability of a biosimilar granulocyte colony-stimulating factor with its reference product. *BioDrugs* 24, 347-357.
- [22] H. Steen, M. Mann, (2004) The abc's (and xyz's) of peptide sequencing, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 699-711
- [23] P. Edman,(1950). Method for determination of the amino acid sequence in peptides, *Acta Chem, Scand*,4, 283-293
- [24] J.R.Yates, S. Speicher, P.R. Griffin, T. Hunkapiller, (1993). Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification. *Anal. Biochem.*, 214, 397-408.
- [25] Whitmore, L., and Wallace, B.A., (2007) Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* 89, 392-400
- [26] M.J. Feige, F. Hagn, J. Esser,H Kessler, J. Buchner,(2007). Influence of the internal disulfide bridge on the folding pathway of the CL antibody domain, *J. Mol. Biol.*,365, 1232-1244.
- [27] W.J. Wedemeyer, E. Welker, M. Narayan, H.A. Scheraga,(2000). Disulfide bonds and protein folding, *Biochemistry*, 39, 4207-4216.

- [28] Chen, Y. and Barkley, M.D., (1998). Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. *Biochemistry*, 37, 9976-9982
- [29] Hanslip, S.J., Zaccari, N.R., Middelberg, A.P.J. and Falconer, R.J.,(2008). Intrinsic fluorescence as an analytical probe of virus-like particle assembly and maturation. *Biochem Biophys Res Commun*, 375,351-355.
- [30] Duy, C. and Fitter, J.,(2006). How aggregation and conformational scrambling of unfolded states govern fluorescence emission spectra. *Biophys J* 90, 3704-3711.
- [31] Reshetnyak, Y.,K. and Burstein, E.A.,(2001). Decomposition of protein Tryptophan Fluorescence spectra into log-normal components. II. The statistical proof of discreteness of tryptophan classes in proteins. *Biophys J* 81,1710-1734
- [32] A. Hawe, M. Sutter, W. Jiskoot,(2008). Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization, *Pharm. Res.* 25, 1487-1499
- [33] R.A. Poole, A. Hawe, W. Jiskoot, K. Braeckmans,(2012). Fluorescence spectroscopy to characterize protein aggregates and particles, in: *Analysis of Aggregates and Particles in Protein Pharmaceuticals*, John Wiley & Sons, Inc, 201-226.
- [34] B.A. Manjasetty, A.P. Turnbull, S. Panjikar, K. Büsow, M.R. Chance,(2008). Automated technologies and novel techniques to accelerate protein crystallography for structural genomics, *Proteomics* 8, 612-625
- [35] W.W. Streicher, M. M. Lopez, G.I. Makhatadze,(2010). Modulation of quaternary structure of S100 proteins by calcium ions, *Biophys.Chem.*, 151, 181-186
- [36] Liu J., Andya, J.D. and Shire, S.J.,(2006). A critical review of analytical ultracentrifugation and field flow fractionation methods for measuring protein aggregation. *AAPS J* 8, 80-89.
- [37] Perrin, C., Burkitt, W., Perraud, X., O'Hara, J., Jone, C. (2016) Limited proteolysis and peptide mapping for comparability of biopharmaceuticals: an evaluation of repeatability, intraassay precision and capability to detect structural changes. *Journal of Pharmaceuticals and Biomedical Analysis* 123, 162 - 172
- [38] Chen, S.-L., Wu, S.-L., Huang, L.-J., Huang, J.-B., Chen, S.-H. (2013) A global comparability approach for biosimilar monoclonal antibodies using LC-tandem MS proteomics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 80, 126 – 135
- [39] Hans, C. Ebbers, Peter J.K. van Meer, Ellen, H. M. Moors, Aukje, K. Mantel-Teeuwisse, Huber, G.M. Leufkens and Huub, Schellekens.(2013). Measures of biosimilarity in monoclonal antibodies in oncology: the case of bevacizumab. *Drug Discovery Today*, 18, 17- 18.

[40] Oliva, A., Fariña, J.B., Llabrés, M. (2016) Pre-study and in-study validation of a size-exclusion chromatography method with different detection modes for the analysis of monoclonal antibody aggregates. *J. Chromatogr. B* 1022, 206-212.

[41] Cueto, M., Dorta, M. J., Munguía, O., Llabrés, M. (2003) New approach to stability assessment of protein solution formulations by differential scanning calorimetry. *International Journal of Pharmaceutics* 252, 159-166.