



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

***EVALUACIÓN DE POTENCIA DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS QUE
CONTIENEN ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE EN UN MODELO IN
VIVO***

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB. MARTHA CECILIA MEZA PARRA

TUTOR:
DRA. HELGI JUNG COOK
FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, MARZO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO

VOCAL: DRA. ALMA LUISA REVILLA VÁZQUEZ

VOCAL: DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS

VOCAL: DRA. SONIA MAYRA PÉREZ TAPIA

SECRETARIO: DRA. ROSA VENTURA MARTÍNEZ

ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ EN LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, FACULTAD DE QUÍMICA. EDIFICIO E DEPTO. FARMACIA, LAB. 112

ASESORA DEL TEMA:

Dra. Helgi Helene Jung Cook

SUSTENTANTE:

QFB Martha Cecilia Meza Parra

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT, por la beca otorgada. No. de becario 295846, así como apoyos económicos del Proyecto CONACYT 2012 CB 179118.

A la Dra. Helgi Jung Cook, por su tutoría y consejo durante los años de maestría.

Al jurado asignado, por su apoyo en la revisión de esta tesis.

Al personal del Bioterio UNEXA de la Facultad de Química, por su enorme colaboración en el desarrollo del trabajo experimental:

M en C Marisol Rivero

MVZ María del Carmen Marín Alcocer

MVZ Ayla María Pérez Gutiérrez

MVZ Karina López Olvera

MVZ Margarita Lucero Franco García

A el QFB Carlos Castellanos de la Unidad de Citometría IIB, por el apoyo otorgado para el análisis de muestras.

A la M en C Lourdes Mayet, por su asesoría.

DEDICATORIA

A todos los que contribuyeron en el desarrollo de este proyecto y en la conclusión de esta difícil pero satisfactoria etapa de vida:

A mis papás Martha Delia Parra Olivas y Jesús Leobardo Meza Ahumada.

A mis hermanos Adrián, César, Carlos y Andrés Meza Parra.

A mi esposo Joel Azpilcueta Acosta.

A los amigos del Laboratorio 112 de la Facultad de Química e Instituto de Química: Claudia Vences, Marcela Aguilar, Nidia Barragán, Ulises Sánchez, Juan Velázquez, José Becerril, Karina Mendoza y Carolina Neira.

A la nueva generación del 112: Brenda Evangelista, Itzel Ballesteros, Christian Callejas, Celeste Gutiérrez, Sergio Soto, Brenda Bravo, Arturo Valderrama, Florencia C., Ernesto Olgúin.

A Dios

INDICE

i. Índice de tablas.....	6
ii. Índice de figuras.....	7
iii. Siglas y abreviaturas	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. ANTECEDENTES / MARCO TEÓRICO.....	10
2.1. <i>Medicamentos biotecnológicos</i>	10
2.1.1. <i>Vencimiento de patentes</i>	12
2.1.2. <i>Biosimilares, biocomparables, productos biológicos / proteínas de entrada subsecuente</i>	13
2.1.3. <i>Regulación de biotecnológicos</i>	15
2.1.4. <i>Biotecnológicos de mayor consumo mundial</i>	17
2.2. <i>EPO humana recombinante: biotecnológico de primera generación</i>	18
2.2.1. <i>Estructura química</i>	18
2.2.2. <i>Farmacodinamia</i>	20
2.2.2.1. <i>Eritropoyesis: mecanismo de acción de EPO</i>	20
2.2.2.2. <i>Receptor de EPO</i>	22
2.2.3. <i>Efecto terapéutico</i>	24
2.2.4. <i>Farmacocinética</i>	26
2.2.5. <i>Efectos secundarios</i>	27
2.2.6. <i>Inmunogenicidad</i>	27
2.2.7. <i>Posología</i>	29
2.2.8. <i>Tipos de EPO</i>	31
2.3. <i>Medicamentos innovadores (de referencia) de EPOrh</i>	35
2.4. <i>Biosimilares de EPOrh</i>	36
2.5. <i>Pruebas farmacopeicas para EPOrh como biomedicamento</i>	38
2.5.1. <i>Métodos farmacopeicos para evaluar potencia de EPOrh</i>	41
2.5.2. <i>Otros modelos de evaluación de potencia</i>	42

3. HIPÓTESIS.....	44
4. OBJETIVOS.....	44
4.1. <i>Objetivo general</i>	44
4.2. <i>Objetivos específicos</i>	44
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
5.1. <i>Reactivos</i>	45
5.2. <i>Materiales</i>	45
5.3. <i>Equipos e instrumentos</i>	46
5.4. <i>Modelo experimental</i>	46
5.5. <i>Medicamentos</i>	47
5.6. <i>Desarrollo experimental</i>	48
5.7. <i>Análisis estadístico</i>	54
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
6.1. <i>Curva Dosis-Respuesta</i>	57
6.2. <i>Comparación del medicamento de prueba A vs medicamento de referencia</i>	59
6.3. <i>Comparación del medicamento de prueba B vs medicamento de referencia</i>	60
6.4. <i>Comparación del medicamento de prueba C vs medicamento de referencia</i>	61
6.5. <i>Comparación del medicamento de prueba D vs medicamento de referencia</i>	62
• <i>Análisis de varianza</i>	63
• <i>Potencia y límites de confianza</i>	64
• <i>Ventajas y desventajas del modelo experimental utilizado</i>	70
7. CONCLUSIONES.....	72
8. PERSPECTIVAS.....	72
9. REFERENCIAS.....	73
iv. Anexo A: Carta de aprobación CICUAL.....	80

i. Índice de tablas

Tabla 1. Diferencia y similitud entre medicamentos biotecnológicos y medicamentos con fármacos de síntesis química.....	11
Tabla 2. Medicamentos biosimilares autorizados por la Agencia Europea de Medicamentos.....	14
Tabla 3. Medicamentos biotecnológicos de venta mundial (a 2008).....	17
Tabla 4. Indicaciones de la Eritropoyetina comercial.....	25
Tabla 5. EPOrh innovadoras disponibles en el mercado nacional e internacional.....	35
Tabla 6. EPOrh no innovadoras disponibles en el mercado nacional e internacional.....	37
Tabla 7. Pruebas farmacopeicas para EPOrh como biomedicamento.....	38
Tabla 8. Comparación entre cepa BALB/C y cepa B6D2F1.....	43
Tabla 9. Diluciones seriadas para preparación de curva dosis respuesta.....	48
Tabla 10. Diluciones seriadas para preparación de medicamentos.....	49
Tabla 11. Dosis de EPOrh por grupo experimental.....	50
Tabla 12. Reasignación de grupos post-administración de medicamentos.....	51
Tabla 13. Resultados en curva dosis-respuesta.....	57
Tabla 14. Medicamento de referencia R1.....	59
Tabla 15. Medicamento de prueba A.....	59
Tabla 16. Medicamento de referencia R2.....	60
Tabla 17. Medicamento de prueba B.....	60
Tabla 18. Medicamento de referencia R3.....	61
Tabla 19. Medicamento de prueba C.....	61
Tabla 20. Medicamento de referencia R4	62
Tabla 21. Medicamento de prueba D.....	62
Tabla 22. ANOVA multifactorial.....	63
Tabla 23. Parámetros estadísticos para validez de resultados.....	64
Tabla 24. Resumen de resultados del Método de Líneas Paralelas.....	67

ii. Índice de figuras

Figura 1. Estructura de la eritropoyetina.....	19
Figura 2. Mecanismo de acción de EPO.....	22
Figura 3. Cascada de señalización EPO- receptor.....	23
Figura 4. Población de células rojas: área R1.....	52
Figura 5. Histograma biparamétrico fluorescencia vs eventos.....	53
Figura 6. Curva dosis-respuesta.....	57
Figura 7. Gráficas medicamento A vs R1.....	59
Figura 8. Gráficas medicamento B vs R2.....	60
Figura 9. Gráficas medicamento C vs R3.....	61
Figura 10. Gráficas medicamento D vs R4.....	62

iii. Abreviaturas

APCR- anemia pura de células rojas

AZT- Zidovudina

BFU-E- Unidad formadora de Colonias Eritroides Tempranas

CFU-E- Unidad formadora de Colonias Eritroides Tardías

Cmáx- Concentración máxima

COFEPRIS- Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios

CSF-EEo- Unidad formadora de colonias eritroideeosinófilas

CSF-EMeg- Unidad formadora de colonias eritroidemegacariocítica

CSF-EP- Unidad formadora de colonias eritroide-células plasmáticas

CSF-GEMM- Unidad formadora de Colonias de Granulocitos-Eritrocitos-Megacariocitos-Macrófagos

Da- Daltons

DCI- Denominación común internacional

ELISA- *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EMA- *European Medicine Agency*

EP- *European Pharmacopoeia*

EPO - Eritropoyetina

EPOR- Receptor de Eritropoyetina

EPOrh- Eritropoyetina humana recombinante

EPOs- Eritropoyetinas

ERC- Enfermedad Renal Crónica

FDA- Food and Drug Administration

FEUM- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos

FLT-3L- Ligando de la Tirosina Fetal 3

GRR- Guía de Referencia Rápida

Hb- Hemoglobina

Hi- Hipótesis alterna

Ho- Hipótesis nula

HIF-1- Factor Inducible por Hipoxia 1 α

ICH- *International Conference on Harmonisation*

IGF-1- Somatomedina C

IL-3- Interleucina 3

IL-9- Interleucina 9

IPP- Información Para Prescribir

IRC- Insuficiencia Renal Crónica

iv- Intravenosa

kDa- kiloDaltons

NDA- *New Drug Application*

OMS- Organización Mundial de la Salud

PAHO- *Pan American Health Organization*

RIS- Reglamento de Insumos para la Salud

sc- Subcutánea

SCF- Factor de células seminales

SIDA- Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SSA- Secretaría de Salubridad y Asistencia

TPO- Trombopoyetina

USA- *United States of America*

VIH- Virus de Inmunodeficiencia Humana

WHO- World Health Organization

1. INTRODUCCIÓN

La eritropoyetina (EPO) es una hormona glicosilada que estimula la eritropoyesis en mamíferos y es producida *in vitro* por tecnología recombinante a partir del cultivo de células de mamífero; el biomedicamento (EPOrh) se emplea para el tratamiento de la anemia asociada a insuficiencia renal crónica y/o anemias severas debido a otras causas como son cáncer, SIDA, entre otros. La patente de eritropoyetina venció en 2006 por lo que ya se comercializan medicamentos biocomparables en el mercado nacional (Roger, 2006).

La generación de medicamentos biocomparables de este y otros medicamentos biotecnológicos crea preocupación, debido a la complejidad de estas moléculas y a la posible generación de inmunogenicidad (De Mora, 2010; Aguilar, 2010), por lo que las pruebas o ensayos necesarios previo a su registro y venta deben ser estrictamente definidos, desafortunadamente en México no hay aún criterios específicos para determinar *biocomparabilidad* en este medicamento, aunque si hay recomendaciones para medicamentos biotecnológicos en general (López Silva, 2012).

En Brasil, un estudio de 12 eritropoyetinas reportó que la potencia biológica variaba entre 68% y 119% de lo especificado y el nivel de endotoxinas bacterianas no era aceptable en 3 de los productos evaluados (Schmidt y cols., 2003). Otro estudio con el mismo fármaco dio resultados equivalentes (Singh, 2008), la actividad *in vivo* osciló entre el 71% y 226%. Por lo anterior es importante que en México se evalúe la calidad de estos biomedicamentos y así se propongan criterios y requisitos para evaluaciones *in vivo*.

Una de las especificaciones de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) para evaluar la potencia biológica de EPOrh es un ensayo *in vivo* con ratones normocitémicos de la cepa B6D2F1 u otra cepa de respuesta adecuada. La prueba se basa en la medición de la producción de reticulocitos. Dado que la cepa es de importación y alto costo, es conveniente hacer estudios con otras cepas que presenten una respuesta biológica adecuada y que a su vez permitan disminuir costos (FEUM, 2014).

Las cepas CD1 (ICR), CF1, BALB/C, han sido empleadas en diversos estudios para evaluar a este medicamento (Egrie y cols., 2003; Schmidt y cols., 2003; da Silva y cols., 2013). En el presente trabajo se evaluó la potencia biológica de productos farmacéuticos que contienen EPOrh en ratones BALB/C como modelo alternativo a la cepa B6D2F1.

2. ANTECEDENTES / MARCO TEÓRICO

2.1. *Medicamentos biotecnológicos*

Los medicamentos biotecnológicos han cobrado gran importancia en las últimas dos décadas ya que representan una opción terapéutica para el tratamiento de enfermedades crónicas, algunas asociadas a procesos inflamatorios-infecciosos y procesos cancerosos, entre otros, mejorando la expectativa y la calidad de vida de la población.

Con base en la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el artículo 81 del Reglamento de Insumos para la Salud (SSA RIS, 1998) de México, se define a un medicamento biotecnológico como:

“Toda Substancia que haya sido producida por biotecnología molecular, que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presente en forma farmacéutica, que se identifique como tal por su actividad farmacológica y propiedades físicas, químicas y biológicas”

Estos medicamentos son muy diferentes de los medicamentos formulados con fármacos de síntesis química, por lo que los paradigmas de estos no pueden ser extrapolados a biotecnológicos, que suelen ser proteínas terapéuticas, debido a diferencias en sus propiedades (Schellekens, 2008).

Una particularidad de los fármacos que constituyen a los medicamentos biotecnológicos es el tamaño de la molécula, generalmente es mucho mayor respecto a los fármacos obtenidos por síntesis química (de 50 a 1000 veces mayor).

Si se compara un fármaco de síntesis química, con un biotecnológico, el peso del primero suele ser menor a 1 kDa por ejemplo Aspirina, que pesa 180Da; mientras que el segundo pesa generalmente más de 50kDa, salvo algunas excepciones como eritropoyetina, filgrastim, insulina, que son de los biofármacos más pequeños, con pesos de 30.4kDa, 5.8kDa y 18.8kDa, respectivamente (Roger, 2006).

En la Tabla 1, se presentan las características generales de los medicamentos biotecnológicos y se hace una comparación con los de síntesis química.

Tabla 1. Diferencia y similitud entre medicamentos biotecnológicos y medicamentos con fármacos de síntesis química

	Fármacos de síntesis química	Fármacos biotecnológicos
Diferencias relacionadas al producto	<ul style="list-style-type: none"> -Producidos por síntesis química -Bajo peso molecular -Propiedades fisicoquímicas bien definidas -Estables -Alta pureza química -Diferentes rutas de administración -Entrada rápida a circulación sanguínea por capilares -Distribución hacia alguna combinación órgano-tejido -Toxicidad específica -No antigénicos 	<ul style="list-style-type: none"> -Producidos en líneas hospederas por biotecnología -Alto peso molecular - Propiedades fisicoquímicas complejas -Sensibilidad al calentamiento y agitación -Son mezclas heterogéneas, especificaciones que cambian durante el desarrollo, difíciles de estandarizar -Administración parenteral en su mayoría -Alcanzan la circulación vía linfática -Distribución limitada a plasma y fluido extracelular -No tóxicos -Algunos son antigénicos
Diferencias en manufactura	<ul style="list-style-type: none"> -Caracterización completa por métodos analíticos -Fácil de purificar -Contaminación fácil de detectar y eliminar -No se afectan por ligeros cambios en el proceso de producción y el ambiente 	<ul style="list-style-type: none"> -Difícil de caracterizar -Alta probabilidad de contaminación -Muy susceptible a ligeros cambios en el proceso de producción y el ambiente

Modificada de Sing (2011)

Los medicamentos biotecnológicos generalmente son moléculas complejas, además de mostrar heterogeneidad, debido principalmente al tipo de células en los que son producidos, por lo que es común que muchas proteínas terapéuticas en realidad sean mezclas con diferentes patrones de glicosilación o porciones de proteínas (Schellekens, 2008).

La “glicosilación” es la adición de carbohidratos a una proteína (Voet y cols., 2007). Y los tipos de glicosilación más abundantes son las N-glicosilaciones (N-acetilglucosamina se une a una asparagina o glutamina) y las O-glicosilaciones (N-acetilgalactosamina se une a serina o treonina) (Murray, 2001).

Por lo tanto la estructura química de un biotecnológico está determinada no sólo por la secuencia de aminoácidos, sino por cadenas de carbohidratos, que determinan la configuración espacial de la molécula. También hay modificaciones durante el proceso de extracción, purificación de la célula en que se producen, el medio de cultivo, formulación y almacenamiento (Schellekens, 2008).

Existen guías internacionales para evaluar la calidad, seguridad y eficacia de un medicamento biotecnológico, entre ellas las publicadas por agencias como *European Medicine Agency* (EMA), *Food and Drug Administration* (FDA), *Japanese Ministry of Health and Welfare* e *International Conference on Harmonisation* (ICH). El objetivo de las guías es asegurar el control en el proceso de producción de estos medicamentos y la reproducibilidad lote a lote en las especificaciones del producto mediante una caracterización completa.

2.1.1. **Vencimiento de patentes**

En los años 2004-2008 empezaron a vencer las patentes de los primeros biotecnológicos, por lo que empezaron a surgir los primeros medicamentos biotecnológicos no innovadores (*biosimilares/ biocomparables*) en el mercado europeo (Martos-Rosa y cols., 2015), sin embargo no había un marco regulatorio en torno a las pruebas de calidad, seguridad y eficacia que debían cumplir.

Los fármacos de síntesis química, demuestran intercambiabilidad entre el medicamento de prueba y referencia, a través de la evaluación de la calidad del producto terminado por comparación de perfiles farmacocinéticos (estudio de bioequivalencia), bajo la premisa de que iguales perfiles farmacocinéticos entre el medicamento de prueba y referencia (y por tanto parámetros equivalentes como $C_{máx}$ y área bajo la curva), aseguran igual efecto farmacodinámico, paradigma que no puede extenderse a biotecnológicos por la naturaleza de las moléculas, por el ya mencionado complejo proceso de producción y heterogeneidad resultante (Schellekens, 2005).

A la comparación entre medicamentos biotecnológicos innovadores y no innovadores (biocomparables) se le nombra como **Estudio de Biocomparabilidad** en México y/o **Estudio de Biosimilitud**. A inicios del siglo XXI, había poca información disponible sobre los métodos analíticos, estándares, especificaciones en el proceso de producción, validación y caracterización requerida para evaluar biocomparabilidad (Schellekens, 2008). Actualmente hay abundante información específica por biomedicamento; no obstante ha habido discrepancias al definir si una exhaustiva caracterización fisicoquímica es suficiente para exentar a los medicamentos de la realización de otras pruebas. Schellekens en 2008, afirmó que no se puede solo asumir similitud entre un medicamento producido por otra compañía farmacéutica, respecto a la compañía

farmacéutica que produce el medicamento innovador, si las pruebas sólo se resumieran a una caracterización fisicoquímica, argumentando además, que aunque un método analítico fuera muy sofisticado, no podría predecir completamente las características biológicas o clínicas de un producto (Schellekens, 2008).

2.1.2. Biosimilares, biocomparables, productos biológicos / proteínas de entrada subsecuente

Un medicamento biosimilar o biocomparable es un medicamento biológico, similar a otro que ya ha sido autorizado (medicamento biológico de referencia o innovador) y cuya patente ha vencido compartiendo con éste posología y vía de administración (Martos-Rosa y cols., 2015).

A nivel internacional, el término para designar a los medicamentos biotecnológicos no innovadores ha ido cambiando. En 2003 entró en vigor en la Unión Europea (EMA) el término “medicamento biosimilar”, actualmente adoptado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). En Estados Unidos (FDA) a este tipo de medicamentos se les designa como “*follow-on biologics*” (Woodcock y cols., 2007), en Canadá (PAHO) se les nombra como “*proteins subsecuent entry*” y en nuestro país (COFEPRIS) el término empleado es “*biocomparables*”. En las discusiones científicas, discusiones regulatorias y publicaciones el término empleado es “*biosimilares*”.

De acuerdo con la EMA:

“Un medicamento biosimilar es un medicamento biológico que se desarrolla para que sea similar a un medicamento biológico ya existente (el «medicamento de referencia»).

Esta agencia establece que los biosimilares no son iguales a los genéricos, los cuales tienen estructuras químicas más simples y se consideran idénticos a sus medicamentos de referencia. El principio activo de un biosimilar y su medicamento de referencia es esencialmente la misma sustancia biológica, aunque existen ligeras diferencias debido a la complejidad de su naturaleza y a los métodos de producción (EMA, 2012).

En el año 2006, se aprobó un biosimilar de somatropina (indicada en padecimientos por deficiencia de la secreción de hormona del crecimiento) y los primeros biosimilares de

eritropoyetina (EPOrh, indicada para el tratamiento de ciertos tipos de anemia) fueron aprobados en 2007 (Martos-Rosa y cols., 2015).

En la Tabla 2, se presenta la lista de medicamentos biosimilares autorizados por la EMA para el mercado Europeo (Martos- Rosa y cols., 2015).

Tabla 2. Medicamentos biosimilares autorizados por la Agencia Europea de Medicamentos

TIPO DE MOLÉCULA	BIOSIMILAR (PRINCIPIO ACTIVO), COMPAÑÍA FARMACEÚTICA, MEDICAMENTO DE REFERENCIA: FECHA DE AUTORIZACIÓN POR LA EMA	
Hormonas	<p>Omnitrope (somatropina), producida por Sandoz, referencia Genotropina de Pfizer: abril 2006</p> <p>Binocrit (eritropoyetina alfa), producida por Sandoz, referencia Eprex de Janssen-Cilag: agosto 2007</p> <p>Retacrit (eritropoyetina zeta), producida por Hospira, referencia Erypo de Janssen-Cilag: diciembre 2007</p> <p>Ovaleap (folitropina alfa), producida por Teva Pharma, referencia GONAL-f de Merck: septiembre 2013</p> <p>Abasria (insulina glargina), producida por Eli Lilly, referencia Lantus de Sanofi Aventis: septiembre 2014</p>	<p>Abseamed (eritropoyetina alfa), producida por Medice Arzneimittel Putter, referencia Eprex de Janssen-Cilag: agosto 2007</p> <p>Epoetin alfa Hexal (eritropoyetina alfa), producida por Hexal Biotech, referencia Eprex de Janssen-Cilag: agosto 2007</p> <p>Silapo (eritropoyetina zeta), producida por STADA, referencia Eprex/Erypo de Janssen-Cilag: diciembre 2007</p> <p>Bemfola (folitropina alfa), producida por Finox Biotech, referencia GONAL- f de Merck: marzo 2014</p>
Citocinas	<p>Biograstim (filgrastim), producida por CT Arzneimittel, referencia Neupogen de Amgen: septiembre 2008</p> <p>Tevagrastim (filgrastim), producida por Teva Pharma, referencia Neupogen de Amgen: septiembre 2008</p> <p>Zarzio (filgrastim), producida por Novartis, referencia Neupogen de Amgen: febrero 2009</p> <p>Grastofil (filgrastim), producida por Apotex, referencia Neupogen de Amgen: octubre 2013</p>	<p>Ratiograstim (filgrastim), producida por Ratiopharma, referencia Neupogen de Amgen: septiembre 2008</p> <p>Filgrastim Hexal (filgrastim), producida por Hexal Biotech, referencia Neupogen de Amgen: febrero 2009</p> <p>Nivestim (filgrastim), producida por Hospira Enterprises, referencia Neupogen de Amgen: junio 2010</p> <p>Accofil (filgrastim), producida por Accord, referencia Neupogen de Amgen: septiembre 2014</p>
Anticuerpos monoclonales	<p>Inflectra (infliximab), producida por Hospira UK, referencia Remicade de Schering-Plough: septiembre 2013</p>	<p>Remsima (infliximab), producida por Celltrion Healthcare, referencia Remicade de Schering-Plough: septiembre 2013</p>

Modificada de Martos-Rosas y cols., (2015)

2.1.3. *Regulación de biotecnológicos*

La *European Medicine Agency* (EMA), es la agencia reguladora más avanzada en materia de medicamentos biotecnológicos, ya que fue la primera en emitir tratados generales sobre pruebas fisicoquímicas, estudios preclínicos, estudios clínicos e inmunogenicidad (EMA, 2015).

En Estados Unidos de América, la FDA decidió esperar a que existiera una legislación para los productos biológicos de entrada subsecuente antes de emitir las guías correspondientes. En el caso de las insulinas y la somatropina, estos fueron introducidos al mercado realizando todas las pruebas requeridas para moléculas nuevas (NDA), por lo que tuvieron que presentar estudios que demostraran seguridad, eficacia y calidad.

La diversidad de los productos biotecnológicos (proteínas glicosiladas, anticuerpos monoclonales, etc.) ha creado la necesidad de elaborar guías específicas para evaluar la comparabilidad por biofármaco (Aguilar, 2010).

Actualmente la EMA ha publicado las guías para los siguientes biomedicamentos: eritropoyetina humana recombinante, factor estimulante de colonias de granulocitos recombinante, insulina humana recombinante, heparinas de bajo peso molecular, somatropina, interferón alfa recombinante, anticuerpos monoclonales, interferón beta y r-hormona folículo estimulante recombinante (EMA Guías para biocomparabilidad, 2015).

La regulación formal en México inició en 2009, con la publicación del Artículo 222 Bis, en la Ley General de Salud (DOF, 2009), con objetivo de establecer la reglamentación de los medicamentos biotecnológicos para garantizar su seguridad y eficacia (Diario Oficial de la Federación, 2009). Mediante este decreto, se estableció que sólo puede y debe haber en México medicamentos biotecnológicos innovadores y medicamentos biotecnológicos biocomparables, por lo que se decretó como requisito hacer estudios de biocomparabilidad.

Este decreto fue un parteaguas, ya que en México, el 35% de las solicitudes de nuevos registros de sustancias innovadoras se encuentran relacionados con moléculas derivadas de procesos biotecnológicos, especialmente en materias relacionadas con atención al cáncer y enfermedades reumatológicas y neurológicas (PROBIOMED, 2013).

En el 2012 surge la Norma de Emergencia NOM-EM-001-SSA1-2012, *“Medicamentos biotecnológicos y sus biofármacos. Buenas prácticas de fabricación. Características técnicas y*

científicas que deben cumplir éstos para demostrar su seguridad, eficacia y calidad. Etiquetado. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad y farmacovigilancia”, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 20 de septiembre de 2012. Fue cancelada en 2013, integrándose a la Norma Oficial Mexicana 177 actualizada, NOM-177-SSA1-2013, “Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad” (SSA, 2013). Los avances en aspectos normativos de México, se han realizado con base en los fundamentos de organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y los tópicos deben estar en constante revisión y actualización.

En 2014, surgió la Norma Oficial Mexicana 257 NOM-257-SSA1-2014, con el objetivo de establecer cómo será el proceso para regularización de biotecnológicos, especificaciones para el control de fabricación, autorización de protocolos clínicos, requerimientos para ser medicamentos de referencia y directrices generales para la evaluación de información técnica y científica presentada para el proceso de solicitud de registro de biotecnológicos (SSA, 2014).

Otras normas que tienen injerencia en los medicamentos biotecnológicos son:

- Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013, “Buenas prácticas de fabricación de medicamentos”.
- Norma Oficial Mexicana NOM-072-SSA1-2012, “Etiquetado de medicamentos y de remedios herbolarios”.
- Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005, “Estabilidad de fármacos y medicamentos”.
- Norma Oficial Mexicana NOM-220-SSA1-2002, “Instalación y operación de la Farmacovigilancia”.

2.1.4. *Biotecnológicos de mayor consumo mundial*

Entre los medicamentos biotecnológicos de mayor consumo y venta mundial se enlistan los de la Tabla 3:

Tabla 3. Medicamentos biotecnológicos de venta mundial (a 2008)

Marca	Principio activo	Compañía farmacéutica	Año de aprobación	Ventas (Billones de dólares por año)	Vencimiento de patente
Procrit	eritropoyetina	Ortho Biotech	1990	\$2460	2004 / 2006
Epogen	eritropoyetina	Amgen	1989	\$2456	2004
Remicade	TNF alfa	Centocor	1998	\$3748	2013
Neupogen	filgrastim	Amgen	1991	\$5082	2006
Rituxan	rituximab	Genentech	1997	\$1183	2015
Avonex	interferón beta -1 ^a	Biogen	1996	\$2203	2013
Enbrel	etanercept	Immunex (Amgen)	1998	\$5982	2012
Intron A	interferón alfa- 2b	Schering Plough	1995	\$857	2002
Aranesp	darbepoetina alfa	Amgen	2001	\$3137	2024
Humira	adalimumab	Abbott	2002	\$4521	2016

Modificado de Rosen (2004)

2.2. EPO humana recombinante: biotecnológico de primera generación

La eritropoyetina humana recombinante (EPOrh), junto con la insulina humana recombinante y el filgrastim fueron de los primeros medicamentos producidos por tecnología del ADN recombinante, por lo que representan la primera generación de este tipo de medicamentos.

La EPO es una proteína endógena de tipo hormonal, con un grado de glicosilación alto, que estimula la proliferación celular de precursores hematopoyéticos. Se indica principalmente en el tratamiento de la anemia secundaria a Enfermedad Renal Crónica (ERC), anemia en ciertos procesos infecciosos como VIH y procesos cancerosos, cuya incidencia es alta en sectores vulnerables de la población.

Nomenclatura de las eritropoyetinas

La Denominación Común Internacional (DCI, en inglés *International Nonproprietary Name*: INN) designada por la Organización Mundial de la Salud para Eritropoyetina humana recombinante es “Epoetin”.

Esta DCI “Epoetin”, es aplicable para EPOrh que tenga la misma secuencia de aminoácidos y los mismos sitios de glicosilación que la EPO endógena. Cuando hay cambios en la secuencia de aminoácidos este debe ser indicado con un prefijo – por ejemplo “darbepoetina” y los cambios en la glicosilación se denotan con letras griegas- por ejemplo EPO alfa y EPO beta, que se describen más adelante (Jelkmann, 2009).

2.2.1. Estructura química

La EPO es una glicoproteína con un peso molecular de 30.4 kDa, constituida por 165 aminoácidos, cuya estructura está definida por cuatro hélices antiparalelas. La porción glicosilada de la proteína es responsable de la unión a los receptores, con unión a través de fuerzas electrostáticas (Miyake y cols., 1977).

Tiene 4 sitios de glicosilación característicos: tres N-glicosilaciones en residuos de Asparagina (Asp 24, 38, 83) y una O-glicosilación en una Serina (Ser 126) (Egrie y cols., 1986), sitios

constituidos por los carbohidratos: N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, ácido N-acetilneuramínico y ácido siálico (un 11%) (Watson y cols., 1994; Dordal y cols., 1985). La molécula tiene puentes disulfuro entre las cisteínas 29 y 33 así como en cisteínas 7 y 161 (Wang y cols., 1985).

En la Figura 1 se muestra la estructura química general de la eritropoyetina.

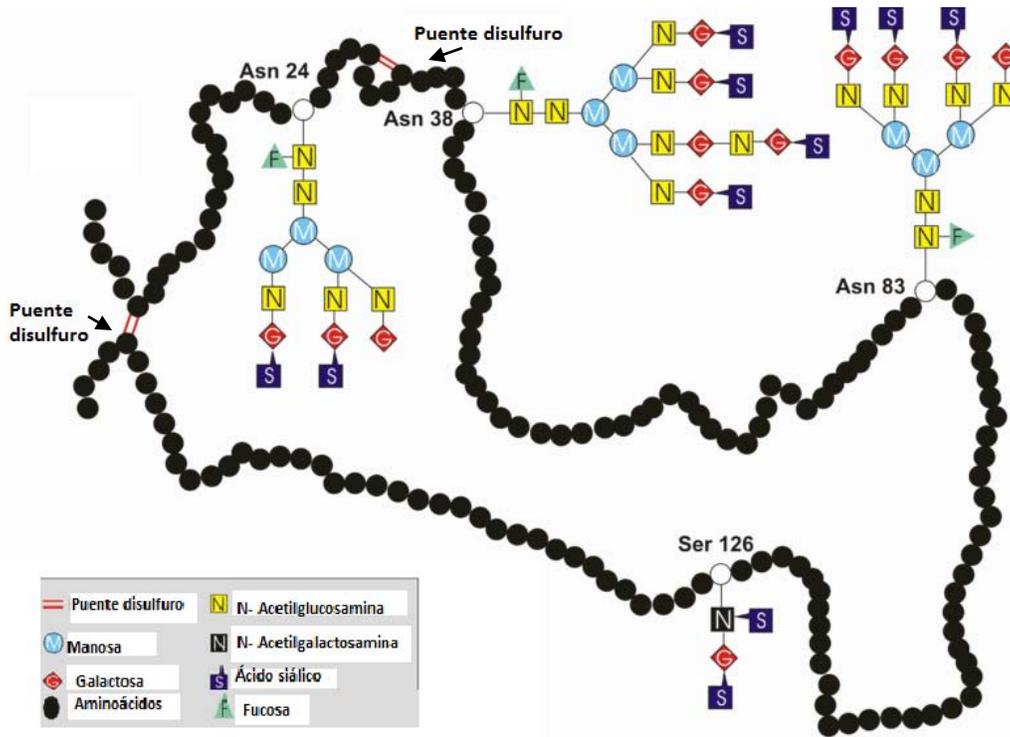


Figura 1. Estructura de la eritropoyetina. Modificada de <http://www.eritropoyetina.com> / 2015

La síntesis de la EPO endógena se efectúa en el riñón en la etapa adulta, en las células intersticiales peritubulares de las nefronas (Powell y cols., 1986). Estas células están localizadas por fuera de la membrana basal de los túbulos renales, específicamente en la corteza renal y la parte más externa de la médula renal (Koury y cols., 1988). En las primeras etapas de vida, en cambio, es el tejido hepático el principal productor de esta hormona.

El gen que codifica su expresión está en el cromosoma 7 (Shanks y cols., 1996), específicamente en la región q 11-q 22 del genoma. Este gen posee 5 exones y 4 intrones y codifica una proteína de 193 aminoácidos, de los cuales los primeros 27 representan la secuencia hidrofóbica líder y los 166 restantes la proteína madura. Existe una elevada homología entre el

gen que codifica a la EPO del mono (90 %) y del ratón (80 %) con el gen humano (Powell y cols., 1986).

La EPO producida por tecnología recombinante, tiene la misma estructura proteica que la endógena; sin embargo la composición de los carbohidratos depende del cultivo celular y de los procedimientos de purificación empleados (Jelkmann, 2009).

Algunos reportes indican que los residuos de ácido siálico presentes en los sitios de glicosilación, así como los puentes disulfuro son importantes para la actividad biológica *in vivo*, pero no *in vitro* de la molécula (Tsuda y cols., 1988).

2.2.2. **Farmacodinamia**

2.2.2.1. *Eritropoyesis: mecanismo de acción de EPO*

La EPO actúa controlando la producción de células eritroides a través de la promoción de la sobrevivencia, proliferación y diferenciación de progenitores eritroides en la médula ósea, por lo que funciona como el principal regulador de la eritropoyesis (Krantz, 1991).

La eritropoyetina (EPO) es secretada en respuesta a diversos factores como hipoxia celular (Jelkmann, 2013; Krantz, 1991), por disminución de la hemoglobina en la sangre, hipoglucemia, disminución de la presión arterial, aumento del calcio intracelular y liberación de insulina (Jelkmann, 2003).

Cuando aumenta el ritmo de síntesis de la EPO, las células intersticiales peritubulares del riñón reciben la información a través de una cascada de señalización y aumentan la producción de EPO. El factor inducible por hipoxia 1α (HIF-1 α), se une a la región facilitadora inducible por hipoxia del gen de la EPO, activando así la transcripción de este gen (Eaves y Eaves, 1992).

Todas las líneas celulares hematopoyéticas se originan en una célula madre, llamado "stem cell" troncal o célula progenitora troncal totipotencial (ver Figura 2). Este da origen a progenitores eritroides como el CSF-GEMM, Unidad formadora de Colonias de Granulocitos-Eritrocitos-Megacariocitos-Macrófagos, y este a su vez origina a los progenitores bipotenciales CSF-EMeg (Unidad formadora de colonias eritroidemegacariocítica), CSF-EEo (eritroideeosinófilos) y CSF-EP (eritroide-células plasmáticas) (Eaves y Eaves, 1992).

Los progenitores bipotenciales generan finalmente los progenitores comprometidos hacia una línea celular. Estos progenitores se llaman así porque tienen capacidad proliferativa y de diferenciación hacia una única línea celular, que puede ser de granulocitos, macrófagos, megacariocitos, linfocitos o eritrocitos (Eaves, 1992); así se forman las Unidades Formadoras de Colonias Eritroides Tempranas (BFU-E).

Las BFU-E tempranas, carecen en un principio de receptores para EPO y dependen principalmente de otros factores de proliferación hematopoyéticos, como IL-3 y del CSF-GM que inducen progresivamente su diferenciación. Es a medida que maduran estas células que van expresando receptores de EPO, así, en su etapa tardía, estas células se diferencian en Unidades Formadoras de Colonias Eritroides Tardías (CFU-E) (Goldwasser, 1983).

Las CFU-E son altamente dependientes de la EPO, de manera que son las células que expresan mayormente a los receptores (Gregory y Eaves, 1978). Las CFU-E dan origen a los pronormoblastos (también llamados proeritroblastos), estos a los eritroblastos basófilos y a medida que continúa la diferenciación celular a eritroblastos policromáticos, ortocromáticos, reticulocitos, que pasan a la circulación y finalmente a los glóbulos rojos maduros de la sangre (Gregory y Eaves, 1978).

En la etapa de eritroblasto basófilo las células captan grandes cantidades de ferritina e inicia la síntesis de hemoglobina (Hb). En la etapa de eritroblastos policromáticos culmina la síntesis de hemoglobina. Cuando estos maduran a eritroblastos ortocromáticos el núcleo celular es fagocitado por macrófagos y a medida que pierden el material genético remanente, se diferencian en reticulocitos. El proceso de diferenciación de CFU-E a reticulocitos, dura alrededor de 4-5 días. Un reticulocito en circulación tarda de 2 a 4 días en madurar a eritrocito (Miyajima y Kinoshita, 1999).

Factores de crecimiento como Interleucina 3 (IL-3), Interleucina 9 (IL-9), Trombopoyetina (TPO), Factor de células seminales (SCF), Somatomedina C (IGF-1) y el Ligando de la Tirosina Fetal 3 (FLT-3L) también participan en la eritropoyesis, actuando incluso de forma sinérgica con la EPO (Miyajima y Kinoshita, 1999).

En la Figura 2 se muestra el mecanismo de acción de la EPO.

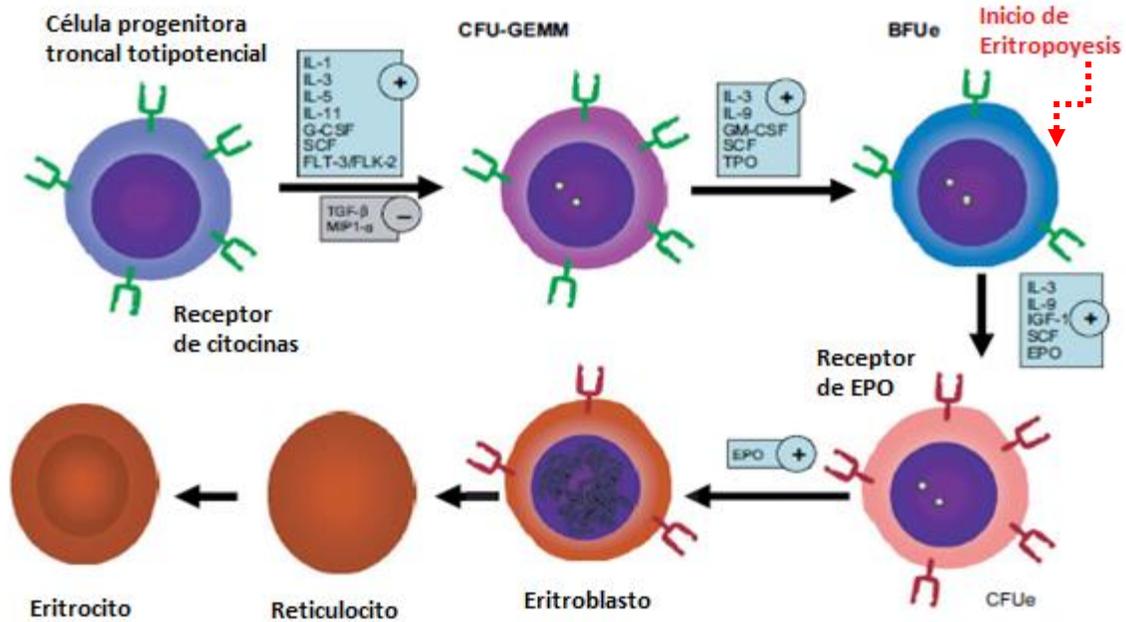


Figura 2. Mecanismo de acción de EPO (Modificada de Rodak, 2005)

2.2.2.2. Receptor de EPO

La eritropoyetina interactúa con receptores específicos, presentes en la membrana de células progenitoras eritroides de la médula ósea (Cabrera- García y cols. 2009).

El receptor de EPO (EPOR) es un polipéptido de 507 aminoácidos, con un peso de 66kDa. Posee 5 cisteínas y un "motif" triptofan-serina- X-triptofan-serina (WSXWS), en el que X es un aminoácido cualquiera, en el dominio exoplasmático. La cola citoplasmática del receptor de EPO posee 2 regiones de funciones opuestas. Una región próxima a la membrana de 103 aminoácidos, que transduce las señales proliferativas, y una región carboxi-terminal de 40 aminoácidos, que las inhibe o regula a la baja (Yousoufian y cols., 1993).

Este EPOR pertenece a la familia de receptores de citoquinas tipo 1, que se caracterizan por estar conformados por tres secciones bien diferenciadas: una porción extracelular, una región transmembranal y finalmente una porción intracelular (Jelkmann, 2003).

La fosforilación del receptor de EPO, que a su vez induce otras fosforilaciones de proteínas de membrana y citoplasmáticas, es el mecanismo inicial de los eventos bioquímicos desencadenados por la hormona (Barber y De Andrea, 1992).

El primer paso es la formación de un complejo entre una molécula de EPO y su receptor; por lo que este sufre un cambio conformacional y se forma un dímero estable en la superficie de la célula. Debido a esto, se generan interacciones proteína-proteína y se desencadenan reacciones entre proteínas cinasas JAK2 que se encuentran asociadas a cada unidad del receptor en la región citoplasmática y se activan por transfosforilación. Así mismo se fosforilan los residuos de tirosina de la región citoplasmática del EPOR (Jelkmann, 2003; Barber y De Andrea, 1992).

Las proteínas STAT (Transductoras y Activadoras de Transcripción) se unen a los residuos de tirosina que se fosforilaron, posteriormente estas proteínas STAT son fosforiladas por las proteínas JACK, tras esta fosforilación las proteínas STAT se dimerizan y así se puedan translocar al núcleo de la célula, activando la transcripción de los genes relacionados con proliferación y diferenciación de las células eritroides (Leu, 2001).

En la Figura 3, se observa la cascada de señalización que se desencadena cuando la eritropoyetina se une al receptor.

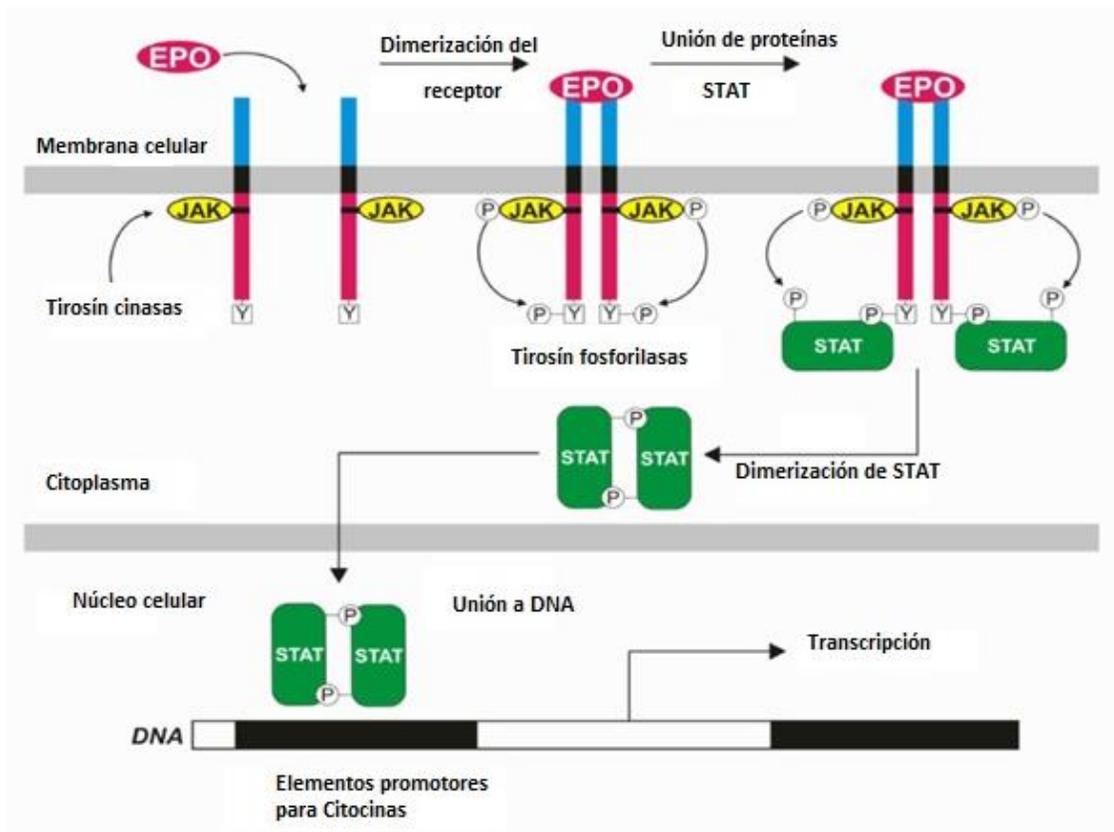


Figura 3. Cascada de señalización EPO- receptor (Modificada de Alegre 2005)

En cultivos, las células eritroides expresan de 300 a 1000 sitios de unión por célula, de los cuales 20% son receptores de alta afinidad y 80 % de baja afinidad. Este porcentaje depende de cada tipo de célula eritroide, la máxima expresión de los receptores de alta afinidad se da en las CFU-E (Noguchi y cols., 1991).

Hay evidencia de que la afinidad por el receptor puede variar por diversos factores, entre ellos, la cantidad de ácido siálico de la eritropoyetina. En particular, la abundancia en residuos de ácido siálico disminuye la afinidad al receptor, pero aumenta la actividad de la EPO al prolongarse el tiempo de vida media debido a que disminuye su degradación (Egrie y Browne, 2001).

2.2.3. Efecto terapéutico

La eritropoyetina está indicada en estados de anemia secundaria a la enfermedad renal crónica (SSA GRR, 2015; Eschbach y cols., 1989). Aunque su uso terapéutico no se limita sólo a la anemia renal, sino también a anemias asociadas a patologías no renales: en procesos cancerosos, pacientes con VIH y cuando los niveles de EPO endógena son menores de 500mU/L (Cabrera-García y cols., 2009).

En 2014, La OMS, reportó que para 2015, alrededor de 200 millones de personas en el mundo padecerían diabetes, lo que los convierte en próximos candidatos a Enfermedad Renal Crónica (ERC). Además la incidencia desde 2013 de ERC en adultos mayores a 65 años es 1 de cada 10, lo que representa 165 millones de personas en el mundo (OPS OMS, 2014).

Por otra parte, cada año se registran 14 millones de nuevos casos de cáncer según reportes de la OMS de 2012 (OMS, 2012). La incidencia de anemia asociada al cáncer, ocurre en un 80-90% de pacientes adultos y en un 80% en pediátricos (Michon, 2002). El origen de la anemia puede deberse a factores intrínsecos como anemia por enfermedad crónica, infiltración tumoral en médula ósea, déficit nutricional y factores extrínsecos como hemólisis, sangrado o mielosupresión secundaria. El objetivo principal de

El tratamiento de pacientes oncológicos es el alivio de síntomas, más que la corrección de los niveles de hemoglobina (Cabrera-García y cols., 2009).

La anemia asociada a hepatitis C, es un efecto relacionado con el tratamiento combinado de interferón y ribavirina (Sulkowski y cols., 2010).

En pacientes con VIH hay prevalencia de anemia en un 50-75% en adultos, siendo incluso un factor de mortalidad. Una de las causas principales del signo, ha sido la administración de altas dosis de AZT, (Sullivan y cols., 1998; Mocroft y cols., 1999). Se estima que hay alrededor de 35 millones de personas en el mundo infectadas con VIH (OMS, 2015).

Todos estos sectores de la población requerirán en alguna etapa de su enfermedad, de un tratamiento con algún agente estimulante de eritropoyesis, como eritropoyetina.

En la Tabla 4, se resumen las indicaciones terapéuticas de las eritropoyetinas disponibles en el mercado nacional.

Tabla 4. Indicaciones de la eritropoyetina comercial

Medicamentos con EPO rh de venta en México						
Marca	Roche	Pisa	Probiomed	Landsteiner-Scientific	Cryopharma	Janssen- Cilag
Nombre comercial	Recormon (innovador)	Exetin-A (innovador)	Bioyetin	Erlan	Epocryn / Epomax	Eporex
Tipo de EPO	EPO beta	EPO (no especificado como alfa o beta)	EPO (no especificado como alfa o beta)	EPO (no especificado como alfa o beta)	EPO (no especificado como alfa o beta)	EPO alfa
Indicación	-Anemia asociada a IRC, -Pacientes en Quimioterapia y/o Radioterapia, -Anemia x deficiencia de EPO, -Prevención de anemia en prematuros, -Aumento de producción de sangre autóloga	-Sustitutivo en deficiencia de EPO endógena, -Anemia asociada a IRC	-Anemia secundaria a IRC, -Quimioterapia, -Anemia por deficiencia de EPO, -Pacientes con afectación en la producción de eritrocitos	-Anemia sintomática o que requiere transfusión en ICR, -Anemias secundarias con EPO endógena baja, -Anemias secundarias a procesos infecciosos (VIH), -Anemia de procesos neoplásicos malignos, excepto mieloides	-IRC sintomática o dependiente de transfusión, -Niveles bajos de EPO, -Anemia secundaria a infección por VIH o condiciones malignas, etc.	-Anemia asociada a IRC, -Pacientes en Quimioterapia, -Anemia por deficiencia de EPO, -Aumento de producción de sangre autóloga
Dosis disponibles	5000, 50 000UI multidosis	2000, 4000UI	1000, 2000, 4000, 10000 multidosis, 50000UI multidosis	1000, 2000, 4000, 10000UI multidosis	2000, 4000UI	2000, 4000, 10000UI multidosis

Modificada de IPP de medicamentos (www.drugs.com/, www.medicamentosplm.com, www.medicamentos.com.mx).

2.2.4. *Farmacocinética*

Se han realizado estudios farmacocinéticos de la eritropoyetina en diversas especies y se ha encontrado que la vida media del fármaco es variable.

En un estudio hecho en ratas Sprague - Dawley se encontró que la $t_{1/2}$ fue de 2.5h, con un aclaramiento renal de 15-20 mL/ kg-h. En este mismo estudio hecho en perros Beagle, la vida media de la EPO fue de 7.2 h, con un aclaramiento de 8.4 mL/ kg-h (Egrie y cols., 2003).

En voluntarios sanos y pacientes urémicos, la vida media de la eritropoyetina es de unas 4 -10 o 12 horas, luego de 5 a 24 horas se producen las mayores concentraciones plasmáticas (Hillman, 1991). Resultados similares se han encontrado en ratas urémicas o normales (IPP Recormon Roche, 2015).

La biodisponibilidad de la vía subcutánea es teóricamente del 100%, pero puede verse afectada por factores como, el sitio de inyección, la vascularización de la capa muscular contigua y alteraciones patológicas locales en el sitio de inyección (Honorato, 2007), resultando en un 42 % de la alcanzada por vía iv. Esta gran diferencia en biodisponibilidad se debe al mecanismo de absorción de EPOrh.

Los biofármacos de menor peso molecular a 16kDa, administrados por vía subcutánea pasan al sistema circulatorio preferentemente atravesando la pared de los capilares sanguíneos (Honorato, 2007), mientras que la mayor absorción de biofármacos de mayor peso como la EPOrh se realiza a través del sistema linfático y alcanza la sangre por el conducto torácico (Swartz, 2001). El transporte por el sistema linfático es lento y el biofármaco está sujeto a degradación importante que puede disminuir significativamente su biodisponibilidad (Porter y cols., 2000), también hay degradación por las peptidasas de los tejidos cuando el biofármaco permanece durante algún tiempo en el sitio de la inyección antes de pasar a la circulación (Honorato, 2007).

El volumen de distribución de la EPO es pequeño (una o dos veces superior al volumen plasmático), la unión a otras proteínas es baja y se limita al espacio extracelular. La vida media aumenta por disminución del aclaramiento renal, debido a que la molécula es más estable a las enzimas encargadas de su degradación dando lugar a un incremento en las concentraciones séricas en función del tiempo (Honorato, 2007).

2.2.5. *Efectos secundarios*

Los principales efectos secundarios reportados para la EPOrh son: náusea, vómito y dolor de cabeza. Como efectos secundarios de mayor magnitud: complicaciones cardiovasculares, hipercalcemia, trombosis del acceso vascular en pacientes con IRC en diálisis (Tae-Eun y cols., 2010).

El margen terapéutico de la Eritropoyetina es muy amplio. Una sobredosis podría producir efectos que son derivados de los efectos farmacológicos de la hormona: por ejemplo, un hematocrito muy elevado y por consiguiente una concentración excesivamente alta de hemoglobina, en estos casos se tendría que realizar una flebotomía en el paciente y hacer un ajuste a la baja en el tratamiento con EPO (EPAR, 2007).

Existe un riesgo con relación al uso de Eritropoyetina y que también es causa de resistencia al tratamiento con EPOrh, el desarrollo de una aplasia pura de células rojas, mediada por anticuerpos neutralizantes anti-eritropoyetina, lo que se describe a detalle en el apartado de inmunogenicidad (Casadevall y cols., 2002).

2.2.6. *Inmunogenicidad*

El problema más importante de seguridad de este tipo de medicamentos es su potencial carácter inmunogénico. Los factores que más influyen en la generación de inmunogenicidad por administración de eritropoyetina son:

- La naturaleza de la proteína: al ser una proteína endógena, es menos inmunogénica que las proteínas exógenas.
- La vía de administración: la vía subcutánea es más inmunogénica que la vía intravenosa.
- Duración del tratamiento: la probabilidad de inmunogenicidad aumenta con la duración del tratamiento.
- Particularidades del sistema inmune de cada individuo (sistema HLA).

(Schellekens, 2008)

La mayoría de las proteínas terapéuticas -entre ellas eritropoyetina- están asociadas a la inducción de anticuerpos. Esta inmunogenicidad se basa en una alteración de la tolerancia inmune

(tolerancia debido a células B) a antígenos propios, aunque el mecanismo en este caso particular no es todavía bien entendido (Schellekens, 2008).

Se estima que la alteración de la tolerancia de células B es lento, por ejemplo, con eritropoyetina los anticuerpos aparecen después de un tratamiento largo, generalmente mayor a un año. Los anticuerpos neutralizantes reaccionan con la EPO exógena impidiendo la unión de la misma con su receptor, lo que explica la pérdida de efectividad del tratamiento.

El efecto neutralizante es más dramático cuando estos anticuerpos reaccionan con un factor endógeno que tiene una función biológica esencial, tal es el caso de los anticuerpos inducidos por eritropoyetina, provocando Anemia Pura de Células Rojas (APCR), que amenaza la vida (Casadevall y cols., 2002).

Entre 1998-2002 el número de casos de APCR (Pure Red Cell Aplasia -PRCA- en inglés), aumentó bruscamente tras tratamiento con Eprex (Eritropoyetina alfa) por vía sc. La APCR se incrementó en Europa y se asoció con un cambio en la formulación de Eprex, que se introdujo en 1998, cuando se cambió la albúmina sérica humana como agente estabilizador, por Polisorbato 80 (Schellekens, 2006). Ante este problema, la farmacéutica afirmó que los tapones de goma de los viales que contenían el medicamento, actuaron como coadyuvantes, no obstante no existe mucha evidencia experimental al respecto. La única explicación consistente con los datos epidemiológicos es la tendencia a la formación de agregados causada por el cambio en la formulación descrito (Schellekens y Jiskoot, 2006).

La APCR, se manifiesta por una repentina pérdida de eficacia al tratamiento con Eritropoyetina (la Hb disminuye 1-2g/dL) (Cabrera-García, y cols. 2009), por lo que las personas que la padecen cruzan con periodos de anemia grave, requerimiento de transfusiones y ninguna respuesta a dosis grandes y crecientes de EPO_{rh} (Casadevall y cols., 2002).

El cuadro clínico que se presenta es una resistencia repentina al tratamiento, que conduce a una anemia severa y que no responde a dosis crecientes de EPO y aplasia, es decir, ausencia de precursores hematopoyéticos o niveles bajos.

El diagnóstico se confirma a través de un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), por la presencia de anticuerpos neutralizantes anti EPO y en un hemograma el hematocrito y la hemoglobina están a la baja (Cases y cols., 2003).

El tratamiento es inmunosupresor, con corticoides y si no hay una respuesta adecuada, se continúa con ciclosporina o ciclofosfamida (Cases y cols., 2003).

Aunque la APCR no es un padecimiento con alta incidencia, los casos en que se presenta son graves. La incidencia está entre 0.2-26.7 casos/100000 pacientes por año (Cournoyer y cols., 2004).

2.2.7. Posología

El tratamiento con eritropoyetina consta de 2 fases, una fase de corrección y una fase de mantenimiento. La dosis en cada etapa está en función del peso corporal del paciente.

- Fase de corrección

Se recomienda la dosis de 50-100UI/ kg peso corporal, 3 veces por semana por vía intravenosa o subcutánea, aunque en pacientes con IRC en hemodiálisis, se sugiere la vía iv.

El rango incluso puede extenderse hasta 50 -150UI/ kg peso corporal, dependiendo de la severidad de la anemia, sólo con prescripción médica. En pacientes con IRC, por ejemplo, la dosis recomendada justo es de 50 -150UI/ kg peso corporal.

Si transcurren 8 semanas y no se ha corregido el nivel de Hb, puede incrementarse la dosis en 25 UI/ kg peso corporal.

Por el contrario, si el hematocrito aumenta a más del 36%, debe suspenderse la administración de la EPO. Cuando el hematocrito alcanza el nivel deseado (30-33%), el tratamiento puede reanudarse con una dosis reducida en 25 UI/ kg peso corporal, respecto a la dosis utilizada previamente (IPP Exetin-A PISA, 2015).

- Fase de mantenimiento

La dosis de mantenimiento se da cuando se ha alcanzado el nivel deseado de hematocrito y/o hemoglobina.

Por ejemplo para un paciente con IRC, el rango de hemoglobina que se recomienda alcanzar es 11-12g/dL, por lo que las dosis que se recomiendan para la etapa de mantenimiento es de 40UI/kg (Jabs y cols., 1994).

En general se hacen ajustes de dosis cada cuatro semanas, con promedios de 25UI/kg peso corporal (IPP Exetin-A PISA, 2015), por lo que es importante dar un seguimiento oportuno al tratamiento.

En adultos, se pueden reducir las dosis de EPO, cuando se asocia con andrógenos, ya que potencian el efecto de la misma (Cusumano y cols., 1996).

En ambas etapas, se recomienda que no se exceda la dosis a 300UI/ kg peso corporal, por el riesgo asociado a eventos trombóticos e hipertensión. De igual forma, el tratamiento con EPO para la anemia sintomática, se acompaña con una corrección en las cantidades de Hierro, requeridas para la síntesis de Hb.

2.2.8. Tipos de EPO

Existen diferentes tipos de eritropoyetina, los cuales se han clasificado como de primera, segunda y tercera generación.

Primera Generación

- Alfa. La eritropoyetina alfa es una forma de eritropoyetina humana recombinante, producida en células de ovario de hámster chino. Esta eritropoyetina al igual que la beta y que la hormona endógena, tiene 3 sitios de glicosilación (Elliott y cols., 2000), con un máximo de 14 moléculas de ácido siálico.

Fue el primer tipo de EPO sintetizada (a partir de su clonación en 1985). Esta eritropoyetina tiene una vida media relativamente corta, de unas 8h en promedio, aunque oscila entre 4-12 horas y su esquema de administración es de 3 veces por semana. Como agente hematopoyético, se indica en el tratamiento de anemia secundaria a Enfermedad renal, procesos cancerosos y procesos infecciosos (IPP Eprex Janssen- Cilag, 2015).

- Beta. La eritropoyetina beta es producida en células de ovario de hámster chino. La estructura primaria de la proteína es la misma que la eritropoyetina alfa y que la EPO natural (endógena), con cambios menores en su estructura y más importantes en la formulación de estabilizadores (EMA Neorecormon, 2015).

Respecto a los cambios en la composición de isoformas, la EPO beta tiene estructuras más básicas respecto a la EPO alfa, lo que supone menor afinidad por su receptor y la posibilidad de que tenga una mayor vida media, no obstante hay mucha discrepancia entre si esto le confiere una mayor actividad biológica (Jelkmann, 2009).

En general la EPO alfa y beta comparten las mismas indicaciones, la posología e incluso el precio también llegan a ser muy similares (IPP Recormon Roche, 2015).

- Omega. La EPO Omega es una molécula con menor cantidad de glicósidos en la O-glicosilación, que la EPO alfa y beta, por lo que es menos ácida y con diferente hidrofiliidad (Sikole y cols., 2002). Se produce en células de riñón de hámster bebé y

tiene la misma indicación que la EPO alfa, en la corrección de la anemia en pacientes en hemodiálisis.

Segunda Generación

En el año 2002 inició la comercialización de la segunda generación de EPO: darbepoetina alfa- un análogo hiperglicosilado de la EPO. Así mismo se autorizó la comercialización de la EPO delta y EPO zeta (Cabrera-García y cols., 2009).

- Darbepoetina. La darbepoetina fue aprobada para su comercialización en 2002, esta molécula consiste en una glicoproteína análoga a la EPOrh, que contiene 2 sitios de N-glicosilación adicionales en posiciones 30 y 88 (5 N- glicosilaciones en total), a diferencia de la EPOrh con 3 sitios (Elliott y cols., 2000). La Darbepoetina tiene tres veces la vida media de la EPOrh, por ello, puede ser administrada con menor frecuencia que la EPOrh y conseguir el mismo efecto (Egrie y Browne, 2001). El gen es codificado en Células de ovario de Hámster Chino y la patente la tiene Amgen.

En un estudio hecho en ratas Sprague Dawley, tras administración iv de EPOrh y/o darbepoetina, encontraron que la depuración renal de la EPOrh fue 3.7 veces mayor en comparación con su análogo hiperglicosilado y por ende la vida media de la EPOrh fue casi tres veces menor (2.5 horas vs 6.9 horas, respectivamente) (Egrie y cols., 2003). En el mismo estudio, realizado en perros Beagle los resultados fueron consistentes, con una depuración renal para Darbepoetina de 2.4mL/kg-h y 8.4mL/kg-h para EPOrh y la vida media fue 3.5 veces mayor en la Darbepoetina que en la EPOrh (7.2 horas vs 25 horas, respectivamente). Estos parámetros farmacocinético tuvieron diferencias estadísticas significativos ($p < 0.01$) para ambas especies animales (Egrie y cols., 2003).

En el caso de pacientes anémicos, sometidos a diálisis, se encontró que la vida media de darbepoetina en relación a la EPOrh tras administración iv de 100U/kg, fue de 26.3 h y 8.5 horas respectivamente.

Estos estudios entre darbepoetina y EPOrh demuestran que las isoformas con alto contenido de ácidos siálicos, permiten aumentar el intervalo de dosificación; debido principalmente a un mayor peso molecular de la darbepoetina respecto a la EPOrh,

además de la carga negativa adicional, que es considerado como la causa por la que disminuye la afinidad por el receptor (Egrie y cols., 2003).

- Delta. La EPO delta, fue producida por Transkariotic Therapies en cultivo de células humanas y su registro y comercialización se dio por Shire Pharmaceuticals con el nombre de Dynepo®. Esta última destaca un especial parecido en composición de azúcares a la EPO humana natural.

Comparte indicaciones y posología con los otros tipos de EPO. Obtuvo su registro sanitario en 2002 y en 2009, a petición de la compañía, se retiró del mercado por razones comerciales (EMA Dynepo, 2015).

- Zeta. La EPO zeta se produce en células CHO, tiene la misma secuencia de aminoácidos que EPO alfa. Tiene la misma indicación que EPO alfa y se desarrolló como biosimilar, empleando Eprex /Erypo como referencia. Es comercializada por Hospira y Stada (Retacrit y Silapo, respectivamente).

Tercera Generación

- CERA. En 2007 surge como agente estimulante de eritropoyesis, la metoxipolietilenglicol epoetina beta, conocida como CERA, por sus siglas en inglés (*Continuous Erythropoietin Receptor Activator*) y cuyo nombre comercial es Mircera® patentado por ROCHE (Cabrera-García y cols., 2009). Esta molécula es más grande que la eritropoyetina, pesando alrededor de 60 kDa, ya que se le adicionó una cadena de metoxi-polietilenglicol (Macdougall y Eckardt, 2006). A esta conjugación de proteínas con una o varias cadenas de polietilenglicol (PGE) se le conoce como “pegilación” y es uno de los mecanismos empleados para modificar propiedades farmacocinéticas con impacto en la posología de los medicamentos (Honorato, 2007). Su vida media supera las 130 h y su acción sobre el receptor de la EPO es la más prolongada.

Unidades de EPO

Las cantidades de un medicamento biotecnológico generalmente se expresan en unidades (U), ya que suele presentarse como una mezcla de isoformas con diferente bioactividad (Storring y cols., 1998).

Una unidad (U) de EPO se define como la cantidad que produce la misma respuesta de eritropoyesis en roedores que 5 μ moles de cloruro de cobalto. El término unidad internacional (UI) de EPO fue introducido cuando el Estándar A de EPO fue reemplazado por el Estándar B, estableciéndose como la Primer Preparación de Referencia Internacional (Cotes y Bangham, 1966). La implementación de esta preparación internacional se hizo en primer lugar porque se estaban agotando las reservas del Estándar A, que era con el que se calibraban los estándares de los laboratorios, además este estándar no era de EPO humana, sino de plasma de oveja. El estándar B en cambio se preparó a partir de EPO_{rh} extraída de orina humana y demostró ser adecuada para considerarse como referencia internacional (WHO, 1964).

Los niveles de EPO sólo se expresan en unidades internacionales (UI) ya que el resultado se obtiene por un ensayo *in vivo* utilizando un estándar de EPO previamente calibrado *in vivo* contra un estándar internacional (Jelkmann, 2003), de manera que las unidades indicadas en marbete son siempre unidades internacionales (UI) y no unidades de masa.

Las unidades de darbepoetina alfa y metoxi polietileno glicol eritropoyetina beta (metoxi-PEG eritropoyetina) son μ g y no UI, ya que los bioensayos para EPO no son adecuados en estas eritropoyetinas de vida media larga y por lo tanto no se pueden estandarizar respecto a un estándar de EPO (Sasu y cols., 2005).

2.3. Medicamentos innovadores (de referencia) de EPOrh

El primer registro sanitario de EPOrh, se dio en los años 80s bajo los lineamientos de la Agencia Europea de Medicamentos. Este medicamento fue Eprex de Janssen-Ortho como subsidiaria de Johnson & Johnson.

Actualmente hay una vasta lista de eritropoyetinas disponibles en el mercado nacional e internacional. En la Tabla 5 se muestran una lista de eritropoyetinas innovadoras.

Tabla 5. EPOrh innovadoras disponibles en el mercado nacional e internacional

Eritropoyetinas innovadoras			
Marca	INN	Compañía farmacéutica	Línea celular
Procrit Epogen Eprex / Erypo	epoetin alfa	Ortho Biotech (USA) Amgen (USA) Janssen-Cilag (EU)	CHO
Recormon NeoRecormon	epoetin beta	Roche - Boehringer Roche	CHO
Epo omega Repotin	epoetin omega	Baxter Bioclones	BHK
Dynepo	epoetin delta	Shire Pharmaceuticals	Human Fibrosarcoma cell line HT- 1080
Eporatio	epoetin teta	Ratiopharm	CHO
Aranesp	darbepoetin alfa	Amgen	CHO
Mircera	Continuous Erythropoietin Receptor Activator (CERA)	Roche	CHO

Modificado de Harazono (2013)

En México, en la Lista de Medicamentos de Referencia actualizada el 07 de enero de 2015 por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS, 2015) el medicamento de referencia que se indica para eritropoyetina alfa es Eprex de Janssen-Cilag, aunque el producto ya no se comercializa en el país. El 20 de julio de 2015 se actualizó la lista y se

eliminó este medicamento de referencia. En el caso de la eritropoyetina beta la lista indica que es Recormon de Roche.

En la práctica clínica, se usa indistintamente EPOrh alfa y beta, ya que la indicación es la misma para ambos.

2.4. Biosimilares de EPOrh

A partir del año 2006 venció la patente de la primer EPOrh comercial en la Unión Europea, por lo que para el año 2007 se autorizó la comercialización del primer medicamento biosimilar de EPOrh: Binocrit (Sandoz GmbH), Epoetin alfa Hexal (Hexal Biotech Forschungs GmbH) y Abseamed (Medice Arzneimittel Potter GmbH) (EPAR, 2007), aunque es el mismo producto, comercializado por tres compañías distintas.

Esta eritropoyetina alfa, designada como HX575, contiene más manosa y menos ácido N-glicolilneuramínico y ácido neuramínico diacetilado que el medicamento innovador de EPO alfa (Eprex/Erypo) (EPAR, 2007). El producto fue comparado en 5 estudios farmacológicos, evaluando farmacocinética, farmacodinamia en dosis única y múltiple por vía subcutánea e intravenosa en voluntarios sanos. La comparación en cuatro de los estudios se hizo usando Eprex (EPO alfa) o NeoRecormon (EPO beta) como medicamentos de referencia. Los perfiles farmacocinéticos fueron similares bajo las condiciones de estudio. Y los perfiles farmacodinámicos también fueron similares, produciendo el mismo incremento en hemoglobina por vía sc e iv (Schellekens, 2008).

La lista de biocomparables de EPOrh ha ido creciendo. En nuestro país, se comercializan diferentes marcas de eritropoyetina, destacándose: Erlan (Landsteiner-Scientific), Bioyotin (Probiomed), Exetin-A (Pisa), Yepotin (Teva), Epocryn (Cryopharma), EPOrh (AMSA), entre otras. Todas ellas obtuvieron su registro antes de que se definiera el marco regulatorio y de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana 257, para renovar su registro tendrán que presentar Estudios de Biocomparabilidad.

A la fecha, no se ha definido las pruebas requeridas para dicho biotecnológico- es decir, no existe una guía nacional disponible-, aunque COFEPRIS, como autoridad competente, ya ha hecho recomendaciones para la renovación de registros sanitarios.

En la Tabla 6 se enlistan las eritropoyetinas no innovadoras disponibles en México.

Tabla 6. EPOrh no innovadoras disponibles en el mercado nacional e internacional

Biosimilares (biosimilares)			
Epoetin-alfa (HX575)	Abseamed	Medice Arzneimittel Putter	CHO
	Binocrit	Sandoz	
	Epoetin alfa Hexal	Hexal Biotech	
Epoetin-zeta SB309	Retacrit	Hospira	CHO
	Silapo	STADA	
No innovadoras en proceso de regularización			
Epoetin alfa	Erlan	Landsteiner-Scientific	CHO
	Exetin-A	Pisa	
	Bioyetin	Probiomed	
	Epocryn, Epomax	Cryopharma	
	Yepotin	Teva	
	EPO rh	Amsa	

2.5. Pruebas farmacopeicas para EPOrh como biomedicamento

La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 11° edición (2014), presenta una monografía para eritropoyetina humana recombinante donde se describen las pruebas que se deben hacer al biomedicamento para demostrar pureza e identidad y otras características particulares. Las pruebas y criterios de aceptación para producto terminado se indican en la Tabla 7.

Tabla 7. Pruebas farmacopeicas para EPOrh como biomedicamento

CARACTERÍSTICAS	PRUEBAS	DETERMINACIÓN	CRITERIO DE ACEPTACIÓN
IDENTIDAD	ELECTROFORESIS CAPILAR	% ISOFORMAS (1-8) EN ELECTROFEROGRAMA	1:0-15% 2:0-15% 3:1-20% 4:10-35% 5:15-40% 6:10-35% 7:5-25% 8:0-15%
	SDS PAGE	BANDA ÚNICA DE LA PROTEÍNA	MISMA POSICIÓN E INTENSIDAD ENTRE PRUEBA Y REFERENCIA
	MAPEO PEPTÍDICO	PICOS CROMATOGRÁFICOS	CORRESPONDENCIA CUALITATIVA ENTRE PRUEBA Y REFERENCIA
	SECUENCIA AMINO TERMINAL	MISMA SECUENCIA	MISMA SECUENCIA
POTENCIA	ENSAYO EN RATONES POLICITÉMICOS	INCORPORACIÓN DE Fe RADIATIVO EN ERITROCITOS	80-120 % DEL MARBETE; 64-156 % LÍMITES DE CONFIANZA
	ENSAYO EN RATONES NORMOCITÉMICOS	% DE RETICULOCITOS	80-120 % DEL MARBETE; 64-156 % LÍMITES DE CONFIANZA
OTRAS	CONTENIDO DE PROTEÍNA	ABSORBANCIA	80-120 % DEL MARBETE;
	ÁCIDOS SIÁLICOS	CANTIDAD DE ÁCIDO SIÁLICO	10mol DE ÁCIDO SIÁLICO POR MOL DE EPO
	DÍMEROS Y SUSTANCIA DE ALTO PESO MOLECULAR	POR CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN	MENOS DEL 2.0% EMIGRAN ANTES QUE LA EPO
	ENDOTOXINAS BACTERIANAS	TECNICA DE LISADO DE AMEBOCITO DE LIMULUS	≤20UI/100000UI EPO

FEUM 11° edición (2014)

Existe evidencia de que las eritropoyetinas disponibles en el mercado mundial, no han cumplido con criterios de potencia biológica propuestos para el biomedicamento (Schmidt y cols., 2003; Ramos y cols., 2013), por lo que esta prueba es un foco rojo en la determinación de calidad y por ello podría ser una de las pruebas determinantes en la evaluación de Biocomparabilidad.

La **potencia biológica** se define como la actividad biológica que se ejerce por cantidad de medicamento. El principio que se aplica para la evaluación de potencia de Eritropoyetina u otro biotecnológico, es la comparación de una preparación de referencia para establecer cuánto de la muestra que se prueba produce el mismo efecto biológico que una cantidad dada de la preparación de referencia (o patrón) (FEUM, 2014).

Algunas condiciones que se deben considerar para el ensayo de potencia son:

- Que el ensayo biológico para la preparación de prueba y referencia, se haga al mismo tiempo y bajo condiciones estrictamente comparables.
- Que se estime la precisión con la que la potencia se ha determinado y para ello se calculan límites de confianza.
- La respuesta biológica debe definirse sin ambigüedad y estar relacionada con el uso terapéutico del fármaco.
- Por la variabilidad inherente a las respuestas biológicas, se debe recurrir a métodos estadísticos para la mejor estimación de potencia.
- Los diseños de experimentos que se aplican son: Diseños completamente al azar, Diseños en bloques al azar, Diseños en cuadrado latino y Diseños cruzados, entre otros.
- El diseño de experimentos que se elija deben cumplir las ciertas condiciones:
 - o Se debe usar el mismo número de dosis para cada tratamiento.
 - o Entre dosis adyacentes debe haber un factor de dilución constante, por ejemplo 30, 60, 90 UI, etc.
 - o Debe haber un número igual de unidades de prueba (animales, etc.) para cada tratamiento. Si se perdiera alguna respuesta, esta se debe estimar por algún método.
- El análisis de resultados se hace por el **Método / Modelo de Líneas Paralelas**, mismo que para poder aplicarse debe cumplir requisitos como:
 - o Que los diferentes tratamientos se asignen al azar a las unidades de prueba y a su vez que las unidades de prueba (animales de experimentación, etc.) sean asignadas por aleatorización a las diferentes condiciones del ensayo, por ejemplo la asignación de jaulas, el orden de administración de los medicamentos, etc.
 - o Que tengan distribución normal las respuestas.

- Que la desviación estándar de la respuesta a cada tratamiento sea independiente a la media aritmética, es decir, que los resultados sean homocedásticos.
- Que haya una relación lineal entre el logaritmo de la dosis y la respuesta, en el intervalo evaluado.
- Que haya relación de paralelismo entre la respuesta de la muestra y la referencia.

Este último supuesto es el que da nombre al método: ya que una de las bases es que hay una relación lineal entre la respuesta (y) y el logaritmo de la dosis (x):

$$y = a + bx$$

Si se hiciera una dilución del tratamiento, cada valor de x en la relación, disminuye en igual magnitud al logaritmo del factor de dilución. Si por ejemplo se diluyera el tratamiento 1:2, la relación sería:

$$y = a + b(x - \log 2) = (a - b \log 2) + bx$$

Por lo que toda respuesta disminuye en una cantidad constante $b \log 2$, así que la línea de regresión se desplaza hacia abajo, paralela a sí misma.

Ya que se ha establecido la validez del ensayo por cumplimiento de todas las condiciones anteriores, se calcula la potencia relativa de la prueba, respecto a la referencia; el resultado puede expresarse como una razón de potencias o transformarse a unidades.

Para la EPO la potencia biológica se traduce en % de reticulocitos producidos por dosis, otra alternativa es el incremento de la cantidad de Hemoglobina o incremento en Hematocrito, entre otras evidencias de actividad hematopoyética, en seguida se describen los métodos farmacopeicos propuestos.

2.5.1. *Métodos farmacopeicos para evaluar potencia de EPOrh*

Son dos los métodos farmacopeicos propuestos:

- *Método A*

El Método A evalúa la potencia de preparaciones de eritropoyetina, determinando el efecto que tiene en la estimulación de la incorporación de ^{59}Fe , en los eritrocitos de ratones con inducción de policitemia, por exposición a presión atmosférica reducida.

La inducción de policitemia conlleva unos 14 días y debe hacerse con una cepa de ratones validada para hipoxia, además de implicar el uso de cloruro férrico radioactivo.

- *Método B*

El Método B, se basa en la medición de la producción de reticulocitos en ratones normocitémicos de la cepa B6D2F1 u otra de respuesta adecuada.

La n mínima es de 8 ratones, por grupo experimental (3 grupos para la referencia y 3 grupos para la prueba).

Se preparan por lo tanto 3 soluciones de la prueba y 3 de la referencia, en diluciones seriadas; con contenido de 40, 20 y 10UI de EPOrh para la cepa de ratones B6D2F1; las cantidades se pueden modificar, dependiendo de la respuesta de los animales que se empleen.

La administración es por vía subcutánea, con 500uL de cada tratamiento y posterior a la administración se debe hacer una aleatorización de tal forma que haya en cada jaula, 1 ratón de cada uno de las 3 dosis de cada tratamiento (3 de prueba y 3 de referencia).

A los cuatro días post - administración, se colectan muestras de sangre y se tiñen con Naranja de Tiazol para la determinación de reticulocitos por Citometría de Flujo. Se calcula la potencia por el Método de Líneas Paralelas.

Los dos métodos farmacopeicos propuestos son de alta sensibilidad, aunque el método B es el de elección, ya que presenta la ventaja de no utilizar material radioactivo, el modelo animal no requiere una preparación previa a la administración del medicamento y la administración es unidosis con resultados hematopoyéticos a corto plazo.

2.5.2. *Otros modelos de evaluación de potencia*

La evaluación de potencia para EPO, se basaba anteriormente en ratas normales Sprague Dawley, por multidosis, con recuento de hematocrito, volumen de eritrocitos y número de reticulocitos como biomarcadores (Eder, 1989). Posteriormente iniciaron los estudios con el modelo de ratones policitémicos, con ventajas y desventajas, siendo más empleados en la actualidad los modelos normocitémicos (Choi y cols., 1996; Barbone y cols., 1994).

Algunos estudios realizados en Brasil, han empleado ratones CF1, bajo el esquema propuesto en la FEUM (2014) y en la Farmacopea Europea (2011) para ratones normocitémicos, con diferencias en la dosis y el método de cuantificación de reticulocitos (Schmidt y cols., 2003).

En la cepa de ratones CD1 (ICR) se ha ensayado potencia, por administración de dosis múltiples de eritropoyetina (tratamientos de una 1 a 4 semanas), con evaluación de aumento de hematocrito y hemoglobina, como marcadores de actividad hematopoyética (Egrie y cols., 2003).

También se ha evaluado eritropoyetina en otras cepas de ratones como NIH, Swiss Webster, BALB/C y C57BL/6, con dosis específicas por cepa, encontrando que la cepa BALB/C es la más parecida en respuesta biológica a los ratones normocitémicos B6D2F1 indicados en la FEUM (2014) y en la EP (da Silva y cols., 2013; Barth y cols., 2008).

La cepa de ratones B6D2F1 propuesta es de importación y alto costo, por lo que es conveniente que en nuestro país se hagan estudios en cepas alternativas.

Los ratones BALB/C son una cepa consanguínea, de menor talla que los B6D2F1, de amplio uso en investigación, con un patrón hematológico bien caracterizado, de menor costo que la cepa propuesta y de amplia disponibilidad en México.

En la Tabla 8 se presenta una comparación de las características de las cepas B6D2F1 y la cepas BALB/C.

Tabla 8. Comparación entre cepa BALB/C y cepa B6D2F1

CEPA	B6D2F1	BALB/C
GENÉTICA	Híbrida	Consanguínea
PESO (7-8 semanas de edad)	18-22 g hembra 25-28 g macho	16- 20 g hembra 22-25 g macho
USO EN INVESTIGACIÓN	Bioquímica, Bioensayo de nutrientes, Hormonas. Farmacología	Farmacología, Toxicología, Teratología
PRUEBA DE POTENCIA	FEUM 2014, EP 2013	Da Silva, 2013
PAÍSES DONDE LOS PRODUCEN	USA, Corea	México, USA, Corea, Italia
COSTO	\$ 30 USD + Importación (60-120USD)	\$15 USD

Harlan (2012)

Por lo tanto fue de interés emplear las condiciones establecidas por el método farmacopeico, para evaluar la potencia biológica de EPOrh comercial, en una cepa de ratones alternativa como la BALB/C y evaluar esta característica de calidad en las EPOrh biocomparables disponibles en el mercado y en el medicamento de referencia.

3. HIPÓTESIS

La potencia biológica de eritropoyetina humana recombinante contenida en cuatro medicamentos producidos por diferentes compañías farmacéuticas será igual que la del medicamento de referencia, de acuerdo a la determinación en una cepa de ratones BALB/C, con base en el método descrito en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 11° edición.

4. OBJETIVOS

4.1. *Objetivo general*

- Determinar potencia biológica de 4 productos farmacéuticos que contienen EPO humana recombinante en un modelo *in vivo*.

4.2. *Objetivos específicos*

- Reproducir el método farmacopeico para la determinación de Potencia de EPOrh en cuatro productos comerciales en ratones BALB/C.
- Hacer la evaluación de una curva dosis-respuesta en ratones BALB/C para determinar las dosis a administrar en las comparaciones de los medicamentos.
- Validar resultados de % de reticulocitos producidos por administración de EPOrh, de acuerdo a las pruebas requeridas por el Método de Líneas Paralelas.
- Comparar potencias de EPOrh biocomparables disponibles en el mercado nacional, respecto a la potencia de la EPOrh innovadora (de referencia).
- Determinar estadísticamente si las potencias de los medicamentos de prueba cumplen con el requisito farmacopeico de potencia y límites de confianza.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. *Reactivos*

Material para administración de medicamento, toma y preparación de muestras

- Éter dietílico Meyer, Lote Z1212486
- Naranja de Tiazol BD Retic-Count™ Cat. 349204, Lotes 4178854 y 5076849
- Fosfato dibásico de sodio JT. Baker, Lote L46C26
- Cloruro de sodio JT. Baker, Lote L47C20
- Albúmina bovina Sigma Aldrich, Lote 95H01781
- Solución diluyente para blancos BD FACSFlow™ Cat. 342003
- Ácido fosfórico JT. Baker, Lote L47C71
- Hidróxido de sodio JT. Baker, Lote L45C42

5.2. *Materiales*

- Jeringas hipodérmicas para insulina BD 1mL, 27 x 13mm Cat. 326716, Lote 657390
- Tubos capilares sin heparina Kimble-Chase ID 1.1 – 1.2mm Longitud 75mm Cat. 063014, Lote 40.B.502
- Tubos para colección de sangre BD Microtainer® MAP K2 EDTA 1.0mg, 500uL - 13 x 75mm Cat. 363706, Lote 5044944
- Tubos para citometría Falcon® 5mL Tubo de fondo redondo de poliestireno 12 x 75mm Cat. 352054, Lote 07915016

5.3. *Equipos e instrumentos*

- Balanza Sartorius Praxum, Calibración 30-oct-2014
- Balanza Scout PRO OHAUS BS-EA-01, Calibración Nov, 2014
- Potenciómetro Thermo Scientific Orion Star A211
- Citómetro FacScalibur BD Biosciences Calibración Mar 25, 2015

-Filtro 488nm

-Láser 530nm

-Software Cell Quest Pro

- Vortex Science Med MX-S
- Micropipetas Pipet-line Rainin 0.5-10UI
- Micropipeta Eppendorf Research Plus 100-1000uL

5.4. *Modelo experimental*

El modelo animal empleado fue de ratones con las siguientes características:

- Especie: *Mus musculus*
- Cepa BALB/C
- Sexo: hembras
- Edad: 7-8 semanas
- Peso: 16-18g
- Procedencia: Harlan Laboratories (Certificado Harlan y Reporte de Monitoreo de Salud)

Los experimentos se llevaron a cabo en la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA) de la Facultad de Química UNAM. Los animales fueron mantenidos con agua y alimento *ad libitum*, en ciclos de 12h luz / oscuridad y bajo barrera microbiológica. Los ratones tuvieron un periodo mínimo de adaptación de 48 horas. Se emplearon 310 animales de experimentación.

El protocolo experimental fue aprobado por el Comité Interno de Cuidado Animal (CICUAL) de UNEXA Facultad de Química UNAM, con apego a la NOM-062-ZOO-1999 (Ver en Anexo A la Carta de aceptación por el CICUAL).

5.5. **Medicamentos**

Para el estudio se seleccionaron 4 productos comerciales de prueba los cuales fueron comparados con el producto de referencia Eprex Janssen-Cilag (10000UI EPOrh alfa / vial), caducidad jun-2015.

. Los medicamentos de prueba fueron codificados como medicamentos A, B, C y D.

- Medicamento A 4000UI EPOrh/vial, caducidad may-2015
- Medicamento B 50000UI EPOrh/vial, caducidad jun-2016
- Medicamento C 4000UI EPOrh/ vial, caducidad jun-2016
- Medicamento D 10000UI EPOrh beta/vial, caducidad feb-2016

Cada comparación se llevó a cabo en un día diferente.

Las siglas asignadas para el medicamento de referencia para la primera, segunda, tercera y cuarta comparación respectivamente, fueron R1, R2, R3, R4.

Para cada bioensayo los ratones se pesaron, se enumeraron con un código de muescas en orejas y se asignaron por aleatorización manual en grupos de 9 ratones, formándose 7 grupos (nombrados como grupos 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7).

5.6. *Desarrollo experimental*

Curva dosis- respuesta biológica

Se realizó una curva dosis- respuesta biológica empleando las siguientes dosis: 10, 20, 40, 80, 160UI /250uL EPOrh del medicamento de referencia Eprex Janssen-Cilag así como un grupo control (0UI, n= 9 por dosis).

La evaluación de las dosis se hizo a través del bioensayo general propuesto para potencia de EPOrh en FEUM 11° edición 2014: el día 1 de experimentación se administró el medicamento por vía subcutánea. A las 96 horas (día 5) se tomó una muestra de sangre de 100uL por el plexo ocular, la sangre se analizó empleando la técnica de Citometría de Flujo (el bioensayo se describe a detalle en el apartado correspondiente).

- Preparación del medicamento

El medicamento se almacenó en refrigeración a temperatura de 2-8°C, con base en las especificaciones de marbete hasta el momento de su preparación. El día de administración se llevaron a cabo esquemas específicos de diluciones seriadas del medicamento, para obtener las concentraciones de 10UI, 20UI, 40UI, 80UI y 160UI / 250uL, como se indica en la Tabla 9.

Como diluyente, se empleó una solución amortiguadora de fosfatos - salina - albúmina pH 7.2, de reciente preparación, de acuerdo al apartado farmacopeico correspondiente. Durante la preparación del medicamento y hasta su administración, la temperatura de refrigeración se mantuvo con geles refrigerantes.

Tabla 9. Diluciones seriadas para preparación de la curva dosis-respuesta

	Solución	(UI / mL)	Alícuota (uL)	Volumen por preparar (uL)	Concentración final (UI / mL)	Concentración final (UI / 250 mL)
Curva dosis- respuesta	Sol. A	10000	320 del medicamento Eprex	5000	640	160
	Sol. B	640	2500 de Sol. A	5000	320	80
	Sol. C	320	2500 de Sol. B	5000	160	40
	Sol. D	160	2500 de Sol. C	5000	80	20
	Sol. E	80	2500 de Sol. D	5000	40	10

Determinación de la potencia de los medicamentos de prueba y de referencia

- Preparación de medicamentos

El día de la administración se llevaron a cabo diluciones seriadas de los medicamentos, para obtener las concentraciones de 10UI, 20UI y 40UI / 250uL, como se indica en la Tabla 10. Las especificaciones de la preparación son las mismas de la preparación del medicamento para la curva dosis-respuesta.

Tabla 10. Diluciones seriadas para preparación de medicamentos

	Solución	(UI / mL)	Alícuota (uL)	Volumen por preparar (uL)	Concentración final (UI / mL)	Concentración final (UI / 250 mL)
Medicamento de referencia	Sol. A1	10000	160 del medicamento de referencia	10000	160	40
	Sol. B1	160	5000 de sol A1	10000	80	20
	Sol. C1	80	2500 de sol B1	5000	40	10
Medicamento de prueba A, C	Sol. A2	4000	400 del medicamento concentrado A, C	10000	160	40
	Sol. B2	160	5000 de sol A2	10000	80	20
	Sol. C2	80	2500 de sol B2	5000	40	10
Medicamento de prueba B	Sol. A3	5000	320 del medicamento concentrado B	10000	160	40
	Sol. B3	160	5000 de sol A3	10000	80	20
	Sol. C3	80	2500 de sol B3	5000	40	10
Medicamento de prueba D	Sol. A4	16666.67 (5000/0.3mL)	96 del medicamento concentrado D	10000	160	40
	Sol. B4	40	5000 de sol A4	10000	80	20
	Sol. C4	20	2500 de sol B4	5000	40	10

- Administración de medicamentos

El día 1 de la comparación, se les administró a los ratones de los grupos 2, 4 y 6, una dosis de 10, 20 y 40 UI /250uL del medicamento de referencia Eprex (n = 9 ratones por dosis), mientras que a los ratones de los grupos 3, 5 y 7 se les administraron 250uL del medicamento de prueba (medicamentos A, B, C o D), de acuerdo al día de estudio. A los ratones del grupo 1 (grupo control, n = 9) se les administraron 250uL de la solución amortiguadora de fosfatos-salina-albúmina pH 7.2, empleada para la dilución de medicamentos.

En la Tabla 11 se indica el esquema de dosificación empleado por grupo experimental:

Tabla 11. Dosis de EPOrh por grupo experimental

Grupo	Dosis y medicamento
1	Control
2	10 UI Referencia
3	10 UI Prueba
4	20 UI Referencia
5	20 UI Prueba
6	40 UI Referencia
7	40 UI Prueba

La vía de administración fue subcutánea, en el plexo interescapular de cada ratón, en dosis única.

El orden de administración de medicamentos intergrupos fue secuencial, tal como se indica en la Tabla 11 (grupo 1, 2, 3 y así sucesivamente). Y el orden de administración intragrupo fue aleatorizado con una hoja de cálculo de Microsoft Excel.

Una vez administrado el medicamento, los animales fueron reasignados aleatoriamente a diferentes grupos y reunidos en jaulas limpias de tal manera que hubiera por jaula un ratón administrado con cada dosis de cada medicamento y un ratón del grupo control, por lo que se formaron 9 grupos (Grupo A a I, n = 7 por grupo), como se indica en la Tabla 12. Así el Diseño de experimentos que se siguió fue un diseño de Bloques al Azar.

Tabla 12. Reasignación de grupos post-administración de medicamentos

Grupos (9)	Ratones que conforman cada grupo (n=7)	
A a I	1 Ratón control	
	1 Ratón 10UI medicamento de referencia	1 Ratón 10UI medicamento de prueba
	1 Ratón 20UI medicamento de referencia	1 Ratón 20UI medicamento de prueba
	1 Ratón 40UI medicamento de referencia	1 Ratón 40UI medicamento de prueba

- Toma de muestras

A las 96 horas (día 5) posteriores a la administración del medicamento, se colectaron muestras de aproximadamente 100uL de sangre por el plexo ocular, previa anestesia por inhalación con éter dietílico. Las muestras se colectaron en tubos con anticoagulante EDTA y se mantuvieron a temperatura ambiente, hasta la preparación de las muestras para citometría.

- Análisis por Citometría de Flujo

La determinación de reticulocitos en sangre por citometría de flujo, fue el indicador de la actividad hematopoyética ejercida por el medicamento administrado.

Para el análisis de muestras por citometría, se empleó Naranja de Tiazol BD Retic-Count™, que tiñe el RNA presente en los reticulocitos.

Los requerimientos y especificaciones de las muestras para recuento de reticulocitos fueron:

- Muestras de sangre total, no hemolizadas.
- Muestras frescas, con un tiempo de colección no mayor a 48 horas, mantenidas a temperatura ambiente previo a la tinción.
- Muestras con un tiempo de tinción no mayor a 3-4 horas, bajo protección de la luz.
- El equipo empleado fue un FacScalibur con las siguientes características:
 - Filtro (láser) 488nm
 - Emisión 530nm
 - Software Cell Quest Pro

- Calibración vigente
- Se adquirieron 50000 eventos, a flujo bajo

Las muestras se prepararon como se describe a continuación:

- 1) En tubos de poliestireno para citometría se adicionó 1.0mL de colorante Naranja de Tiazol y se protegió de la luz.
- 2) Se depositó 5uL de sangre en la pared del tubo con colorante.
- 3) Se mezcló la sangre y el colorante, protegiendo la mezcla de la luz.
- 4) Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente.
- 5) Se homogenizaron las muestras y se analizaron por citometría de flujo.

Para el cálculo del % de reticulocitos de cada muestra se generó un dot plot FSC vs SSC (tamaño vs granularidad) para identificar la población celular de interés (eritrocitos, reticulocitos). La población de eritrocitos en diferentes estadios se enmarcó e identificó como R1, tal como se muestra en la Figura 4.

A partir de R1 se generó un histograma biparamétrico FL1 (canal de emisión) vs # de eventos para cada muestra. Se colocaron marcadores para delimitar la población negativa para fluorescencia (eritrocitos, ubicados en M1) y la población positiva (reticulocitos y falsos positivos, ubicados en M2, ver Figura 5).

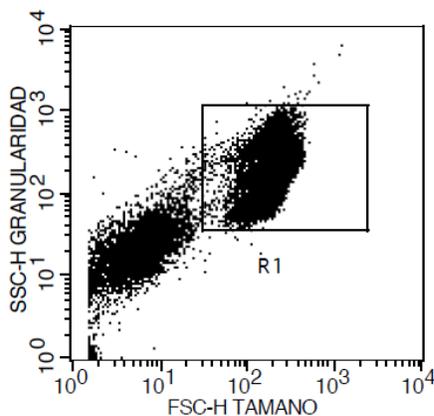


Figura 4. Población de células rojas: área R1. Delimita la población de eritrocitos de la muestra analizada.

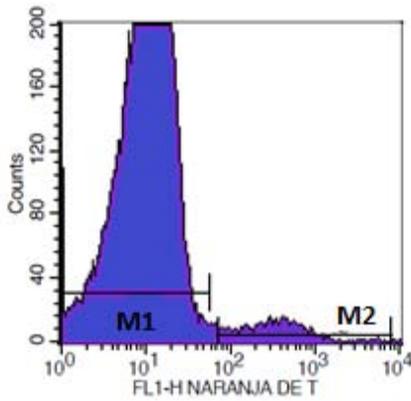


Figura 5. Histograma biparamétrico fluorescencia vs eventos. En M1 se marca la población negativa para fluorescencia y en M2 la población positiva (reticulocitos).

Se obtuvieron tablas de resultados en el software Cell Quest Pro con relaciones porcentuales entre las regiones marcadas:

- El número de eventos en M2 equivale al número de reticulocitos en la muestra, por lo que la relación porcentual entre M2 y M1 dio como resultado el % de reticulocitos.
- El % de reticulocitos se corrigió por la respuesta obtenida en muestras blanco (sin teñir), que presentaron auto fluorescencia (es decir, fluorescencia como falsos positivos).

Con los % de reticulocitos estimados, se hicieron cálculos estadísticos como se indica a continuación.

5.7. Análisis estadístico

- Anova de una vía para la curva dosis-respuesta

Para la curva dosis-respuesta se empleó Análisis de Varianza de una vía, con el objetivo de evaluar diferencias estadísticas significativas en el % de reticulocitos producido por dosis de EPOrh de referencia.

Las hipótesis estadísticas para una $p < 0.05$ fueron:

Hipótesis nula

Ho: No hay diferencias estadísticas en el % de reticulocitos producido por dosis de EPOrh de referencia en la curva dosis-respuesta.

Hipótesis alterna

Hi: Hay diferencias estadísticas en el % de reticulocitos producido por dosis de EPOrh de referencia en la curva dosis-respuesta.

- Anova de dos vías para cada comparación

Para las comparaciones entre medicamentos de prueba y referencia se empleó Análisis de Varianza de dos vías, con el objetivo de determinar si hubo diferencias estadísticas significativas en el % de reticulocitos producido por **tipo de medicamento** (prueba y referencia, de manera global con las tres dosis).

Las hipótesis estadísticas ($p < 0.05$) fueron:

Factor medicamento

Hipótesis nula

Ho: No hay diferencias en % de reticulocitos producido entre el medicamento de prueba y el medicamento de referencia.

Hipótesis alterna

Hi: Hay diferencias en % de reticulocitos producido entre el medicamento de prueba y el medicamento de referencia.

Así mismo se evaluó si hubo diferencias estadísticas en la respuesta en % de reticulocitos por **dosis para cada tipo medicamento**, con el objetivo de confirmar que la respuesta biológica fuera dependiente de la dosis administrada. Las hipótesis estadísticas para $p < 0.05$ fueron:

Factor dosis intramedicamento

Hipótesis nula

Ho: No hay diferencias en % de reticulocitos producido entre dosis del medicamento de prueba. Tampoco hay diferencia en el % de reticulocitos producido entre dosis del medicamento de referencia.

Hipótesis alterna.

Hi: Hay diferencias en % de reticulocitos producido entre dosis del medicamento de prueba. Así mismo hay diferencia en el % de reticulocitos producido entre dosis del medicamento de referencia.

- Cálculo de potencia

La potencia biológica se determinó a partir del % de reticulocitos producido por el medicamento de prueba (A, B, C, D), relativo al % de reticulocitos producidos por el medicamento de referencia (Eprex), por lo que a esta potencia también se le nombra en algunos tratados como **“potencia relativa”**.

El cálculo de potencia se realizó con base en el **Método de Líneas Paralelas**. Y como es requisito, previo al cálculo los resultados fueron validados empleando las siguientes pruebas estadísticas:

- Para cada comparación, se evaluaron a través del Análisis de Varianza los siguientes parámetros, con un nivel de significancia del 95%:

Regresión lineal- Se determinó que el logaritmo de la dosis de EPO_{rh} tuviera un efecto lineal sobre la respuesta en % de reticulocitos.

Regresión cuadrática- Se determinó que no hubiera relación cuadrática entre el logaritmo de la dosis y el % de reticulocitos.

Paralelismo- Se determinó que las rectas log dosis- respuesta entre el medicamento de prueba y referencia fueran paralelas.

Diferencia en la regresión cuadrática- Se determinó que las curvas log dosis-respuesta fueran semejantes.

-PRUEBA DE NORMALIDAD- Se aplicó la Prueba de Shapiro Wilk, para demostrar que la respuesta en % de reticulocitos se distribuyó normalmente.

-HOMOCEASTICIDAD- Se determinó la igualdad en las varianzas de los tratamientos, por la Prueba de Hartley.

-DETERMINACIÓN DE DATOS ABERRANTES O ERRÁTICOS- Para descartar valores erráticos por alguna falla durante el bioensayo (error del analista, ratón en mal estado, etc.) y dar sesgo de los resultados durante la evaluación estadística, se aplicaron 2 procedimientos:

Intervalo máximo- Con este procedimiento se determinó si algún tratamiento tenía algún valor potencialmente aberrante.

Distancia mínima- Si algún tratamiento resultaba positivo para el Intervalo máximo, con este procedimiento se identificaba el valor errático o aberrante dentro del tratamiento.

- VALORES PERDIDOS- Esta prueba se aplicó sólo en los casos en que se llegó a perder alguna respuesta, por muerte de algún animal de experimentación, inadecuada administración del tratamiento, etc.

Una vez validados los resultados, se hizo el cálculo de potencia en Hojas de Cálculo de Microsoft Excel con fórmulas matemáticas validadas, de acuerdo al apartado de Estadística para Bioensayos FEUM 11° edición 2014.

Las hipótesis estadísticas para la evaluación de potencia biológica con $p < 0.05$ fueron:

Hipótesis nula

Ho: No hay diferencias entre la potencia biológica de EPOrh de cuatro medicamentos de prueba y la potencia del medicamento de referencia, de acuerdo a la determinación en una cepa de ratones BALB/C, con base en el método descrito en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 11° edición.

Hipótesis alterna.

Hi: Hay diferencias entre la potencia biológica de EPOrh de cuatro medicamentos de prueba y la potencia del medicamento de referencia, de acuerdo a la determinación en una cepa de ratones BALB/C, con base en el método descrito en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 11° edición.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Curva Dosis-Respuesta

Los resultados para OUI y las dosis 10, 20, 40, 80 y 160 UI de EPOrh del medicamento de referencia Eprex fueron 4.69 ± 0.86 , 6.90 ± 0.90 , 8.05 ± 1.01 , 9.17 ± 0.81 , 11.68 ± 1.20 y 14.31 ± 1.28 % de reticulocitos (promedio \pm DE), respectivamente, como se presenta en la Tabla 13.

Como estimador de precisión, el % de CV máximo que se obtuvo por dosis fue 18.24%, por lo que se concluyó que los resultados fueron precisos. Cabe mencionar que la FEUM no establece especificaciones para % de CV en este tipo de bioensayos, sin embargo en este estudio se definió que % de CV menores a 25 % eran adecuados.

Tabla 13. Resultados en curva dosis-respuesta

	Curva dosis-respuesta Eprex					
DOSIS (UI)	Control	10.0	20.0	40.0	80.0	160.0
Log Dosis	NA	1.00	1.30	1.60	1.90	2.20
% retic. promedio	4.69	6.90	8.05	9.17	11.68	14.31
DE	0.86	0.90	1.01	0.81	1.20	1.28
%CV	18.24	13.04	12.49	8.83	10.31	8.92

En la Figura 6 se presenta la curva dosis-respuesta obtenida. La línea con cuadros representa la respuesta a las dosis evaluadas: 10, 20 y 40 UI; mientras que la línea con triángulos representa la respuesta obtenida para las dosis 40, 80 y 160 UI de EPOrh.

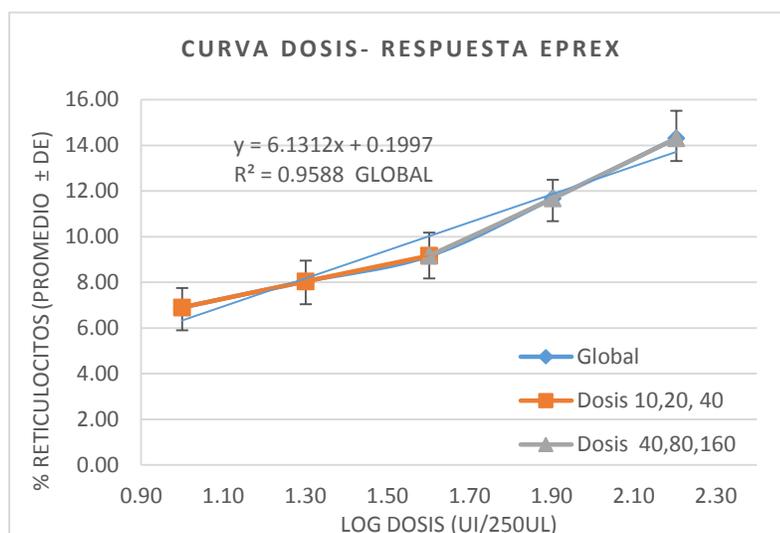


Figura 6. Curva dosis-respuesta

De la gráfica se concluyó que a medida que aumentó la dosis, aumentó la respuesta en % de reticulocitos; demostrándose por ANOVA de una vía que este aumento tuvo diferencias estadísticas significativas con un 95.0% de nivel de confianza ($p=0.00$); de igual forma con la prueba *post hoc* LSD de Fisher se demostró que todas las medias fueron diferentes entre si.

En otras investigaciones, se han evaluado curvas dosis-respuesta con rangos que oscilan entre 2.5 y 270UI de EPOrh (da Silva y cols., 2013; Ramos y cols., 2003; Barth y cols., 2008; Schmidt y cols., 2003). Un estudio de Brasil (da Silva y cols., 2013) evaluó la curva dosis respuesta a las concentraciones de 10, 30, 90 y 270 UI de EPOrh empleando las siguientes cepas de ratones: BALB/S, NIH, C57BL/6 y Swiss Webster, encontrando que a la dosis de 10UI hubo mayor variabilidad en la respuesta por lo que se eligieron las 3 dosis mayores para la determinación de la potencia (da Silva y cols., 2013). En otro estudio, las dosis seleccionadas para ratones CF1 fueron 10, 30 y 90UI, elegidas a partir de una curva dosis respuesta de 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 y 160UI de EPOrh (Ramos y cols., 2003). Mientras que Barth y colaboradores (2008), optaron por una curva de 1 - 64UI de EPOrh. Por su parte, Yang y colaboradores emplearon ratones BALB/C, con las dosis 7.5 , 15 y 30 UI de EPOrh (Yang, 2014).

La FEUM 11° ed. (2014) y la EP 7° ed. (2010) proponen para el ensayo biológico en ratones normocitémicos B6D2F1 las dosis 20, 40 y 80UI de EPOrh / mL, con volumen de inyección de 500uL por ratón, por lo que las dosis sugeridas son 10, 20 y 40UI / ratón.

En concordancia con la bibliografía y los resultados experimentales, las dosis que se eligieron para la comparación entre medicamentos con la cepa de ratones BALB/C fueron: 10, 20 y 40UI, ya que la relación dosis-respuesta fue lineal, además de coincidir con las dosis para la cepa farmacopeica sugerida.

6.2. Comparación del medicamento de prueba A vs medicamento de referencia

Las medias de % de reticulocitos para el medicamento de referencia en esta primer comparación, fueron 4.62 ± 0.53 , 6.11 ± 1.11 y 8.03 ± 1.10 % de reticulocitos (promedio \pm DE) para las dosis 10, 20 y 40UI de EPOrh. Para el medicamento de prueba A las medias fueron 4.55 ± 0.78 , 5.44 ± 0.68 y 6.70 ± 1.11 % (promedio \pm DE) para 10, 20 y 40UI de EPOrh respectivamente. El % de CV intradosis máximo fue menor a 19.5, por lo que la precisión fue adecuada.

En la Figura 7, se puede observar que las curvas de dosis respuesta del medicamento de referencia (línea con rombos) y del medicamento de prueba A (línea con cuadros), parten de un mismo nivel de respuesta para la dosis de 10UI de EPO y empiezan a diverger a las dosis mayores, siendo mayor la respuesta para el medicamento de referencia. Con estos datos se hace evidente una diferencia en la respuesta del medicamento de prueba A y el de referencia, por lo que se realizó un ANOVA multifactorial para determinar si existía diferencia estadística significativa.

En las Tablas 14 y 15 se presentan las medias de los resultados de esta comparación.

Tabla 14. Medicamento de referencia R1

Referencia EPREX R1 ^A				
DOSIS (UI) Control	10.0	20.0	40.0	
Log Dosis	NA	1.00	1.30	1.60
% retic.				
Promedio	4.11	4.62	6.11	8.03
DE	0.80	0.53	1.11	1.10
%CV	19.44	11.51	18.23	13.65

Tabla 15. Medicamento de prueba A

Prueba A ^B				
DOSIS (UI) Control	10.0	20.0	40.0	
Log Dosis	NA	1.00	1.30	1.60
% retic.				
Promedio	4.11	4.55	5.44	6.70
DE	0.80	0.78	0.68	1.11
%CV	19.44	17.15	12.41	16.62

Diferencia estadística denotada con superíndices diferentes $p = 0.0184$

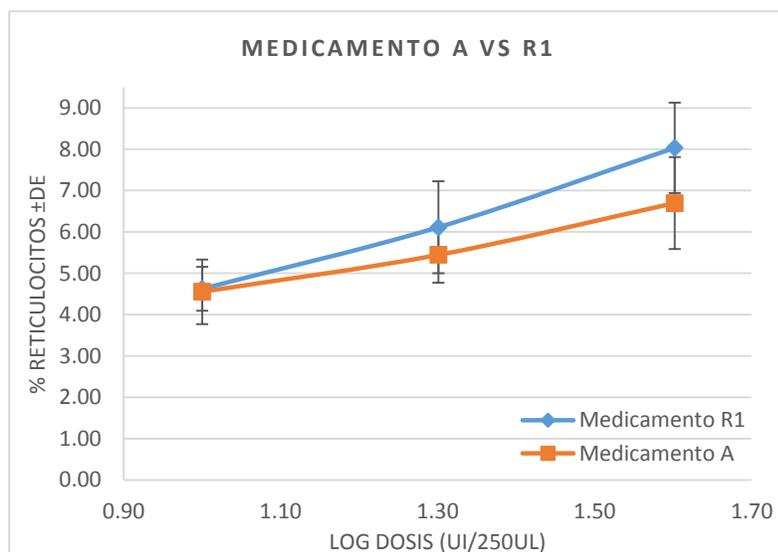


Figura 7. Gráficas medicamento A vs R1

Los resultados mostraron que hubo diferencias estadísticamente significativas sobre el % de reticulocitos producido entre el medicamento de referencia y el medicamento de prueba A, con un 95.0% de nivel de confianza ($p=0.0184$). Así mismo hubo diferencia estadística significativa en el % de reticulocitos producido por dosis para cada medicamento ($p=0.00$ medicamento de prueba y $p= 0.00$ medicamento de referencia); con la prueba *post hoc* LSD de Fisher se determinó que todas las medias fueron diferentes entre si.

6.3. Comparación del medicamento de prueba B vs medicamento de referencia

Las medias de % de reticulocitos para el medicamento de referencia fueron 5.10 ± 0.77 , 6.53 ± 0.69 y 7.61 ± 0.90 % (promedio \pm DE) para las dosis 10, 20 y 40UI y 6.31 ± 0.64 , 7.20 ± 0.92 y 9.24 ± 1.63 % (promedio \pm DE) para el medicamento de prueba B, como se observa en las Tablas 16 y 17, respectivamente. De manera general los resultados intradosis fueron precisos, con % de CV menores a 17.6, con una n de 9 en cada grupo experimental.

La respuesta en % de reticulocitos fue mayor para el medicamento de prueba B en comparación con el de referencia a las tres concentraciones evaluadas, de ahí que la curva del medicamento de prueba B (línea con cuadros) se sitúa por encima de la curva del medicamento de referencia (línea con rombos), como se observa en la Figura 8.

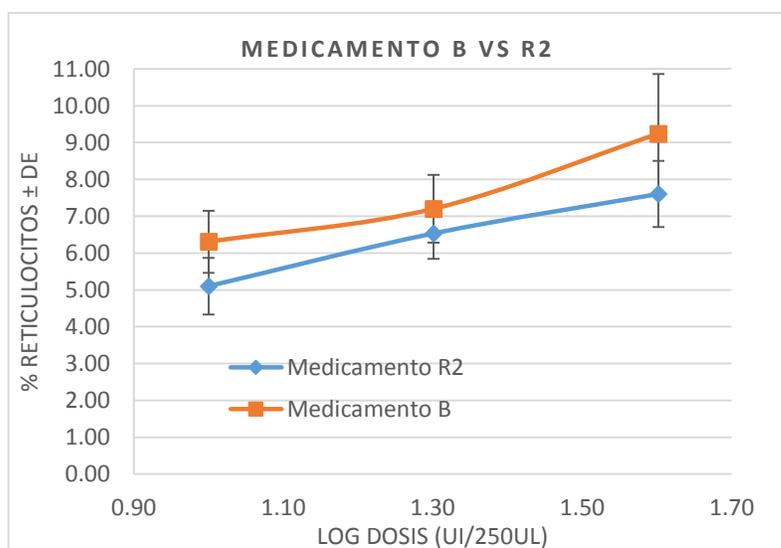


Figura 8. Gráficas medicamento B vs R2

Tabla 16. Medicamento de referencia R2

	Referencia EXPREX R2 ^A			
DOSIS (UI)	Control	10.0	20.0	40.0
Log Dosis	NA	1.00	1.30	1.60
% retic.				
Promedio	4.14	5.10	6.53	7.61
DE	0.64	0.77	0.69	0.90
%CV	15.37	15.06	10.53	11.77

Tabla 17. Medicamento de prueba B

	Prueba B ^B			
DOSIS (UI)	Control	10.0	20.0	40.0
Log Dosis	NA	1.00	1.30	1.60
% retic.				
Promedio	4.14	6.31	7.20	9.24*
DE	0.64	0.84	0.92	1.63
%CV	15.37	13.34	12.78	17.59

Diferencia estadística denotada con superíndices diferentes $p = 0.0446$

La diferencia en la respuesta producida entre el medicamento de prueba y referencia fue estadísticamente significativa ($p=0.0446$, indicada con superíndices diferentes en las Tablas 16 y 17), con un 95.0% de nivel de confianza. El % de reticulocitos producido fue dependiente de la dosis evaluada para cada tipo de medicamento con diferencias estadísticas significativas ($p=0.00$ y $p = 0.00$, prueba y referencia respectivamente); la prueba *post hoc* LSD de Fisher demostró que todas las medias fueron diferentes entre si.

6.4. Comparación del medicamento de prueba C vs medicamento de referencia R

Las medias de % de reticulocitos para el medicamento de referencia fueron de 6.43 ± 0.68 , 7.38 ± 0.90 y 8.64 ± 0.81 % para las dosis 10, 20 y 40UI. Para el medicamento de prueba C, las medias de % de reticulocitos fueron 5.98 ± 1.06 , 7.00 ± 0.97 y 8.46 ± 0.99 % (promedio \pm DE) para las dosis indicadas. Las medias fueron muy semejantes entre estos productos, habiendo una respuesta ligeramente mayor para el medicamento de referencia. Los % de CV intradosis fueron menores a 23.2, por lo que la precisión fue adecuada.

En la Figura 9 se observa que las curvas de respuesta del medicamento de referencia (línea con rombos) y del medicamento de prueba C (línea con cuadros) tuvieron respuestas muy semejantes, siendo ligeramente mayor la respuesta para el medicamento de referencia, por lo que su curva se sitúa por encima.

Tabla 18. Medicamento de referencia R3

	Referencia EPREX R3 ^A			
DOSIS (UI)	Control	10.0	20.0	40.0
Log Dosis	NA	1.00	1.30	31.60
% retic. Promedio	4.75	6.43	7.38	8.64
DE	1.10	0.68	0.90	0.81
%CV	23.12	10.60	12.19	9.40

Tabla 19. Medicamento de prueba C

	Prueba C ^A			
DOSIS (UI)	Control	10.0	20.0	40.0
Log Dosis	NA	1.00	1.30	1.60
% retic. Promedio	4.75	5.98	7.00	8.46
DE	1.10	1.06	0.97	0.99
%CV	23.12	17.70	13.92	11.65

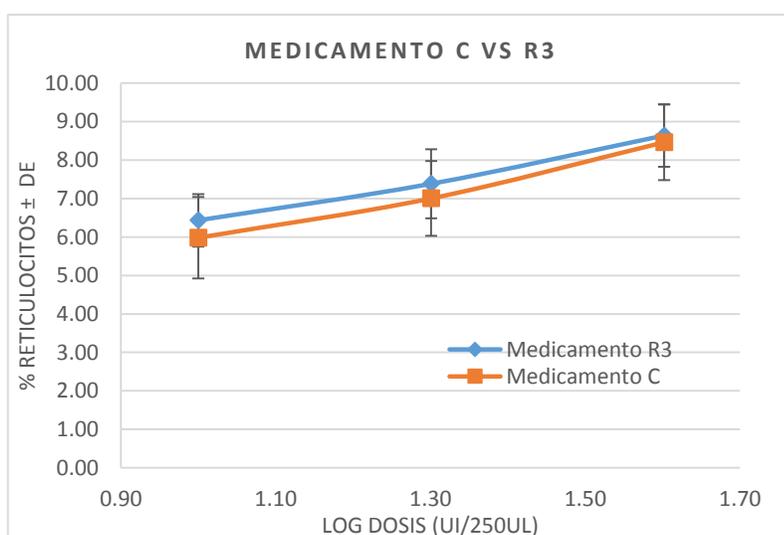


Figura 9. Gráficas medicamento C vs R3

El ANOVA de dos vías demostró que no se presentó un efecto estadísticamente significativo sobre el % de reticulocitos entre el medicamento de referencia y el medicamento de prueba C, con un 95.0% de nivel de confianza ($p=0.2809$). Por otra parte el % de reticulocitos si fue dependiente de la dosis evaluada para cada tipo de medicamento con diferencias estadísticas significativas ($p=0.00$ medicamento de prueba y $p=0.00$ medicamento de referencia); y la prueba *post hoc* LSD de Fisher demostró que todas las medias fueron diferentes entre si.

6.5. Comparación del medicamento de prueba D vs medicamento de referencia

Como se muestra en las Tablas 20 y 21, las medias de % de reticulocitos para el medicamento de referencia fueron 6.09 ± 0.78 , 6.74 ± 0.34 y 8.81 ± 0.81 % para las dosis 10, 20 y 40UI y 5.64 ± 1.01 , 7.04 ± 0.91 y 8.59 ± 0.60 % (promedio \pm DE) para el medicamento de prueba D. Los resultados intradosis fueron precisos, con % de CV menores a 19.9, con una n de 9 en cada grupo experimental.

Como se observa en la Figura 10 las respuestas en % de reticulocitos fueron muy parecidas entre ambos medicamentos, con curvas prácticamente superpuestas.

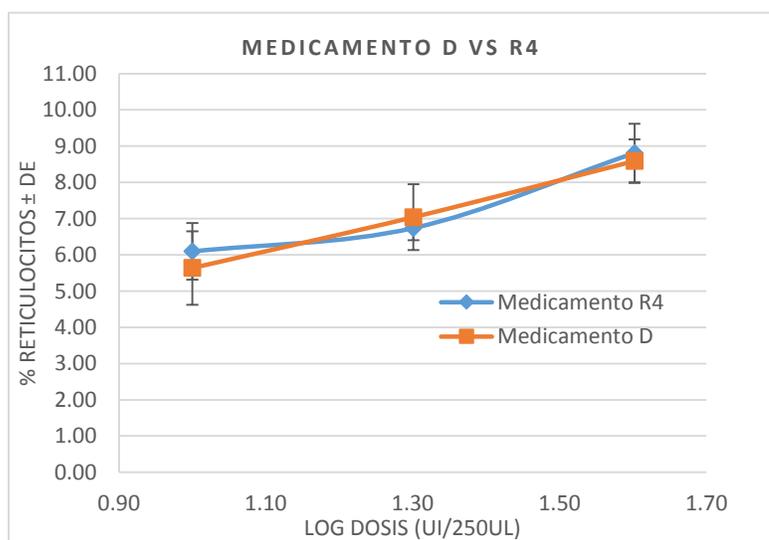


Figura 10. Gráficas medicamento D vs R4

Tabla 20. Medicamento de referencia R4

Referencia EPREX R4 ^A				
DOSIS (UI)	Control	10.0	20.0	40.0
Log Dosis	NA	1.00	1.30	1.60
% retic.				
Promedio	4.44	6.09	6.74	8.81
DE	0.88	0.78	0.34	0.81
%CV	19.89	12.82	5.02	9.18

Tabla 21. Medicamento de prueba D

Prueba D ^A				
DOSIS (UI)	Control	10.0	20.0	40.0
Log Dosis	NA	1.00	1.30	1.60
% retic.				
Promedio	4.44	5.64	7.04	8.59
DE	0.88	1.01	0.91	0.60
%CV	19.89	17.98	12.85	6.99

Diferencia estadística denotada con superíndices diferentes $p = 0.6107$

No se encontraron diferencias estadísticas significativas sobre el % de reticulocitos entre el medicamento de referencia y el medicamento de prueba D con un 95.0% de nivel de confianza ($p=0.6107$). El % de reticulocitos fue dependiente de la dosis evaluada para cada tipo de medicamento con diferencias estadísticas significativas ($p=0.00$ y $p=0.00$ prueba y referencia respectivamente); con la prueba *post hoc* LSD de Fisher todas las medias fueron diferentes entre sí.

- **Análisis de Varianza**

En la Tabla 22, se resumen los resultados ya descritos del ANOVA de dos vías que se aplicó para determinar si existía o no un efecto estadísticamente significativo sobre el % de reticulocitos entre el producto de referencia Eprex y cada uno de los productos de prueba (A, B, C y D), con un 95.0% de nivel de confianza, referida en la tabla como **Diferencia Estadística Intermedicamentos**. Así mismo se resumen resultados descritos de la determinación de diferencias estadísticas por dosis para cada medicamento, indicado en la tabla como **Diferencia Estadística por dosis para cada medicamento**.

Tabla 22. ANOVA de dos vías

	Med. A vs Eprex	Med. B vs Eprex	Med. C vs Eprex	Med. D vs Eprex
Dif. Estadística Intermedicamentos $\alpha = 0.05$	$p = 0.0184$	$p = 0.0446$	$p = 0.2809$	$p = 0.6107$
Dif. Estadística por dosis para cada medicamento $\alpha = 0.05$	Prueba $p = 0.00$ Referencia $p = 0.00$			

Con base en lo anterior, se concluyó que los medicamentos de prueba A y B presentaron diferencias significativas en la respuesta producida en % de reticulocitos respecto al medicamento de referencia, es decir, los medicamentos A y B tuvieron una respuesta biológica diferente a la del medicamento de referencia. Mientras que en la comparación para los medicamentos de prueba C y D, no hubo diferencias estadísticas significativas en el % de reticulocitos, respecto al medicamento de referencia.

En todos los casos la respuesta biológica en % de reticulocitos fue dependiente de la dosis administrada.

- **Potencia y límites de confianza**

Para validar el cálculo de potencia se verificó el cumplimiento de criterios como: Regresión lineal, Regresión cuadrática, Paralelismo, Normalidad, Homocedasticidad, Valores aberrantes y Valores perdidos, como lo requiere el **Modelo de Líneas Paralelas**. La Tabla 23 muestra los resultados de estos y la regla de decisión.

Tabla 23. Parámetros estadísticos para validez de resultados

PRUEBA Y PARÁMETROS	CRITERIO / REGLA DE DECISIÓN (3 DOSIS)	1er COMPARACIÓN Med. A vs Eprex		2da COMPARACIÓN	3er COMPARACIÓN	4ta COMPARACIÓN
		3 dosis	2 dosis	Med. B vs Eprex	Med. C vs Eprex	Med. D vs Eprex
ANOVA			F tab 4.260			
	para Ftab (1,40) = 4.085 ($\alpha = 0.05$)	F cálc	F cálc	F cálc	F cálc	F cálc
Regresión lineal	F cálc \geq Ftab Hay relación lineal	105.376	30.515	72.705	67.527	138.448
Regresión cuadrática	F cálc \leq Ftab No hay relación cuadrática	0.712	NA	0.378	0.485	2.925
Paralelismo	F cálc \leq Ftab Las rectas son paralelas	5.454	1.350	0.244	0.358	0.155
Diferencia en la regresión	F cálc \leq Ftab Las curvas log dosis-respuesta son semejantes	0.006	NA	1.637	0.039	3.184
PRUEBA DE HARTLEY			Ftab 7.18			
	para Ftab (6,8) = 9.03 ($\alpha = 0.05$)	F cálc	F cálc			
Homocedasticidad	F cálc \leq Ftab Varianzas homogéneas	4.391	2.720	5.161	2.407	6.82
PRUEBA DE SHAPIRO-WILK						
	t cálc < 1.96 Distribución normal	0.751	-0.843	-1.688	-3.573	-0.469
VALORES ABERRANTES						
	R tab (9,6) = 0.273		R tab (9,4) = 0.389			
Intervalo máximo	R cálc \geq Rtab Hay posible dato aberrante	0.243	0.324	0.292	0.173	0.230
	G tab = 0.725	Sin aberrantes	Sin aberrantes	Posibles aberrantes	Sin aberrantes	Sin aberrantes
Distancia mínima	G cálc < G tab No se elimina el dato	NA	NA	y = 6.13 0.436 y = 11.41 0.447	NA	NA
VALORES PERDIDOS						
	Cálculo específico	NA	NA	8.15 Med. B 40UI	8.09 Eprex 40UI	9.22 Eprex 40UI 7.81 Med. D 20UI
VALIDEZ DEL ENSAYO Cumplimiento de las pruebas	SE ESTABLECE POR CUMPLIMIENTO DE TODAS LAS PRUEBAS ANTERIORES	NO VÁLIDO PARA 3 DOSIS	VÁLIDO	VÁLIDO	VÁLIDO	VÁLIDO

Una vez que se validaron los cálculos, se llevó a cabo la estimación de la Potencia en una Hoja de cálculo de Microsoft Excel, previa validación de las fórmulas matemáticas.

El criterio de aceptación para **Potencia** de EPOrh de acuerdo a la FEUM 11° ed. 2014 es **80-120%** respecto a la referencia y **Límites de confianza** de **64-156%**.

- *Medicamento de prueba A*

Los resultados de la comparación entre el medicamento de prueba A y referencia, cumplieron con parámetros de Regresión lineal, Regresión cuadrática, Homocedasticidad y Normalidad; sin embargo no se cumplió con el criterio de Paralelismo, por lo que los resultados no fueron válidos para el cálculo de potencia. La desviación de resultados en el criterio de paralelismo, se debió a que no hubo diferencia en la respuesta entre el medicamento de prueba y referencia a la dosis de 10UI.

El ensayo de potencia se puede validar también empleando dos dosis, -siempre y cuando se haya demostrado relación lineal entre el log de la dosis y la respuesta-, por lo que se decidió analizar los resultados para las dosis de 20 y 40UI. El ensayo a dos dosis cumplió con todos los parámetros, incluyendo Paralelismo, por lo que en esta condición el cálculo de potencia fue válido. Como resultado, **la potencia del medicamento de prueba A fue del 65%** respecto al medicamento de referencia.

Se llevó a cabo también el cálculo de potencia relativa con las tres dosis, con fines informativos, encontrándose que **el medicamento de prueba A presentó una potencia de 71%** respecto al medicamento de referencia.

Al comparar la potencia estimada a tres dosis de 71% y la potencia a dos dosis de 65%, hay una diferencia aproximada del 10%. No obstante con ninguna de las estimaciones se cumple el criterio farmacopeico de potencia del 80-120%, estando en ambos casos por debajo del criterio de aceptación.

Al hacer el cálculo de los **límites de confianza** para tres dosis el resultado fue **55-87%** y para dos dosis **43-84%**, en ambos casos, fuera de criterios de aceptación.

- *Medicamento de prueba B*

Los resultados para la estimación de potencia fueron válidos, ya que se cumplieron los parámetros estadísticos requeridos.

Los resultados de potencia relativa del **medicamento de prueba B** mostraron que la potencia fue de **180%** respecto al medicamento de referencia. Este resultado excedió el criterio de aceptación para potencia, con un **límite de confianza de 137-255 %** por lo que no se cumplieron con los criterios de aceptación.

- *Medicamento de prueba C*

Los resultados para la estimación de potencia fueron válidos, ya que se cumplieron los parámetros estadísticos requeridos.

Al calcular la potencia relativa, se encontró que el **medicamento de prueba C fue potente en un 83 %** respecto a la potencia del medicamento de referencia, por lo que se cumplió el criterio de aceptación. Los **límites de confianza** fueron **61-109 %**, aunque muy cercano al criterio de aceptación, no se cumplió para el límite inferior (64-156 %).

Se concluye que el lote del medicamento C evaluado, cumplió el criterio de potencia, pero no los límites de confianza, por lo que la precisión con que se hace la estimación de potencia no es adecuada, por lo tanto se incumple criterios farmacopeicos.

- *Medicamento de prueba D*

Los resultados para la estimación de potencia, fueron válidos, ya que se cumplieron los parámetros estadísticos requeridos.

Al calcular la potencia relativa, se encontró que el **medicamento de prueba D presentó una potencia de 95%** respecto al medicamento de referencia, por lo que se cumplió el criterio de aceptación. El resultado de los **límites de confianza** fue **78-115 %** por lo que se cumplió el criterio.

En la Tabla 24 se muestran un resumen de los resultados de Potencia y Límites de confianza .

Tabla 24. Resumen de resultados del Método de Líneas Paralelas

PRUEBA Y PARÁMETROS	1er COMP. Med. A vs Eprex		2da COMP. Med. B vs Eprex	3er COMP. Med. C vs Eprex	4ta COMP. Med. D vs Eprex
	2 dosis	3 dosis			
ANOVA					
Regresión lineal	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE
Regresión cuadrática	NA	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE
Paralelismo	CUMPLE	NO CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE
Diferencia en la regresión	NA	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE
PRUEBA DE HARTLEY					
Homocedasticidad	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE
PRUEBA DE SHAPIRO-WILK					
Normalidad	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE	CUMPLE
VALIDEZ DEL ENSAYO Cumplimiento de las pruebas	VÁLIDO	NO VÁLIDO PARA 3 DOSIS	VÁLIDO	VÁLIDO	VÁLIDO
POTENCIA RELATIVA 80-120%	65% NO CUMPLE	71% NO CUMPLE	180% NO CUMPLE	83% CUMPLE	95% CUMPLE
LÍMITES DE CONFIANZA 64-156 %	43 - 84 % NO CUMPLE	55 - 87 % NO CUMPLE	137 - 255 % NO CUMPLE	61 - 109 % NO CUMPLE L. INF	78 - 115 % CUMPLE

En conclusión, de los cálculos de potencia y límites de confianza se encontró que:

El medicamento A no cumplió con el criterio de paralelismo, mientras que los demás si cumplieron con este criterio.

De las 4 marcas comerciales evaluadas, sólo los medicamentos C y D cumplieron con criterios de potencia sin embargo sólo el medicamento D cumple criterios para límites de confianza, por lo que el lote evaluado tiene una potencia adecuada y semejante al medicamento de referencia.

No se puede concluir que el lote del medicamento C deba rechazarse por incumplimiento de límites de confianza ya que sí cumple con la potencia; sin embargo no hay criterios definidos para este tipo de resultados.

El medicamento A, no cumplió con criterios de aceptación por estar debajo del nivel de potencia y debajo de límites de confianza. El medicamento B estuvo por arriba del nivel de potencia y límites de confianza. Con estos resultados, los lotes de estos medicamentos deberían rechazarse al estar incumpliendo con el parámetro de calidad establecido en la FEUM (11° ed., 2014). No obstante estos resultados corresponden a un solo lote de cada medicamento por lo que son resultados preliminares, ya que es necesaria la evaluación de 3 lotes por marca para obtener resultados contundentes, de acuerdo a la NOM-257-SSA1-2014.

Cabe mencionar que el criterio de potencia ya especificado de 80-120%, indicado en la monografía de EPOrh en la FEUM 11° ed. 2014, es diferente del criterio definido en otras farmacopeas como la Farmacopea Europea 7° ed. 2011 (EP) y la Farmacopea Brasileña 5° ed. 2010, cuyo criterio es más amplio 80-125%. Sin embargo, esta diferencia no afectó en la decisión de cumplimiento o incumplimiento de los medicamentos evaluados.

Estos resultados son las primeras evidencias de evaluación de potencia de EPOrh en marcas comerciales disponibles en el país y son semejantes a observaciones hechas en otros países con metodologías similares empleando ratones normocitémicos de diversas cepas (Schmidt y cols, 2003; Singh, 2008; Ramos y cols., 2003; da Silva y cols., 2013).

En Brasil, un estudio de 12 eritropoyetinas reportó que la potencia variaba entre 68% y 119% de lo especificado en marbete (Schmidt y cols., 2003). Otro estudio dio resultados equivalentes (Singh, 2008), ya que la actividad *in vivo* osciló entre el 71% y 226%.

Es importante definir las implicaciones clínicas que pueden tener estos resultados en potencia y así proponer criterios y requisitos para evaluaciones *in vivo* en fase preclínica:

- Para un medicamento con potencia elevada para EPOrh, administrado en multidosis, se podría esperar, una actividad hematopoyética aumentada, lo que se traduciría en un hematocrito elevado y por consiguiente una concentración excesivamente alta de hemoglobina. La ocurrencia de eventos trombóticos en estos casos -como los que se asocian con efectos secundarios a la EPOrh- no se podría predecir, sino por los estudios experimentales correspondientes.

- Por otra parte, una mayor potencia sugeriría que el medicamento podría administrarse en menor volumen (y por lo tanto dosis) y ejercer el mismo efecto biológico. No obstante se

deben considerar los riesgos ante lotes que incumplen criterios, antes que los posibles beneficios, sobre todo si no hay estudios que sustenten esta posible mejora de un medicamento de prueba respecto al medicamento de referencia.

- Por el contrario un medicamento con una potencia disminuida implicaría que el efecto terapéutico no se ejercería en el tiempo e intensidad previsto, lo que también afectaría la salud de los consumidores.

En diversos estudios las desviaciones del criterio de potencia biológica de EPO_{rh}, se han atribuido principalmente a cambios en el patrón de glicosilación de la molécula, específicamente por la cantidad de ácidos siálicos (Tsuda y cols., 1988; Cabrera-García y cols., 2009).

Se ha reportado que la estructura y composición de los carbohidratos de la EPO influyen en su mantenimiento en circulación. El ácido siálico es necesario para el mantenimiento de la actividad biológica *in vivo*, de acuerdo a Lukowsky y Painter (1972). La remoción química o enzimática del ácido siálico (llamada desialilación) expone un residuo galactosílico y este se liga a receptores de galactosa en los hepatocitos, lo que conlleva a un metabolismo acelerado en el hígado (Cabrera-García y cols., 2009). Así, la EPO desialidada es eliminada a una velocidad 20 veces mayor que la hormona inalterada. Esta remoción de ácido siálico, sin embargo, no interfiere con su actividad *in vitro*, ya que en cultivos celulares de células progenitoras eritroides, la actividad eritropoyética se mantiene. Otros reportes indican que los residuos de ácido siálico presentes en los sitios de glicosilación son importantes para la actividad biológica *in vivo*- pero no *in vitro* de la molécula (Tsuda y cols., 1988).

Por otra parte, la glicosilación de la EPO también influye en su transporte plasmático, inclusive para que la hormona pueda pasar desde la sangre a la médula ósea a través de las células endoteliales de la barrera sangre-médula ósea (Dubé y cols., 1988).

Egrie y colaboradores (1993) aseveran que no sólo hay una relación directa entre el contenido de ácido siálico y la actividad biológica, sino también entre la vida media, pero la relación es inversa con la afinidad al receptor; aunque los autores afirman que es la depuración renal y no la afinidad por el receptor, el determinante primario de la actividad biológica.

Los puentes disulfuro de la molécula de EPO también son importantes para el mantenimiento de la actividad biológica; como se ha demostrado en casos de alquilación de los grupos sulfhidrilos, lo que produce una pérdida irreversible de la actividad (Wang y cols., 1985).

Es importante destacar que el criterio de potencia biológica y límites de confianza, no es el único determinante de biocomparabilidad, sino que es sólo una de las pruebas de calidad que se hacen para este tipo de medicamentos. Por lo que estos resultados deben ser evaluados junto con una caracterización fisicoquímica exhaustiva además de otras pruebas de calidad, seguridad y eficacia.

- ***Ventajas y desventajas del modelo experimental utilizado***

Se ha reportado que el modelo de ratones normocitémicos B6D2F1 sugerido por la EP y la FEUM, es de manera general robusto y confiable, aunque especialistas reconocen que es necesario mejorar su precisión y variabilidad (WHO, 1997). En Brasil se han realizado numerosos estudios para evaluar potencia de EPO_{rh}, con el objetivo de refinar los bioensayos farmacopeicos (Schmidt y cols., 2003; da Silva y cols., 2013; Ramos y cols., 2003). Así en 2003 se realizó la comparación entre diferentes cepas de ratones y la cepa farmacopeica y se encontró que la cepa de ratones BALB/C tuvo resultados semejantes a la cepa farmacopeica en términos de reticulocitos en respuesta a las dosis 30, 90 y 270 UI de EPO_{rh} (da Silva y cols., 2013).

Aunque es difícil implementar pruebas alternativas con fines de regulación, los resultados muestran que el ensayo con ratones de la cepa BALB/C es útil para evaluar la potencia, además fue capaz de discernir entre diferentes dosis de EPO y diferentes marcas comerciales, por lo que la cepa podría ser una alternativa potencial al uso de los ratones B6D2F1; sin embargo sólo con un bioensayo comparativo entre cepas se podría llegar a esta conclusión.

Las ventajas del uso de la cepa BALB/C son:

- Resultados precisos en % de reticulocitos, con % CV adecuados.
- Reducción de costos y tiempos de importación en comparación con la cepa farmacopeica.
- Es una cepa de alta disponibilidad en los laboratorios nacionales y de fácil manejo.

Las limitaciones de nuestro estudio incluyen:

- Al sólo se evaluarse un lote por medicamento, no se pueden considerar resultados definitivos, sino que deben evaluarse al menos tres lotes de cada medicamento.
- Hubiera sido necesaria la evaluación de potencia no sólo respecto al medicamento de referencia, sino también respecto al estándar de EPOrh.
- No se comparó la respuesta biológica entre la cepa propuesta de ratones BALB/c y la cepa farmacopeica B6D2F1.

7. CONCLUSIONES

- Al emplear la cepa de ratones BALB/C, se encontró una relación lineal entre las dosis administradas y el porcentaje de reticulocitos.
- El modelo permitió determinar diferencias entre lotes comerciales conteniendo eritropoyetina humana recombinante.
- El producto D cumplió con las especificaciones que marca la FEUM 11° edición.
- Los productos A, B y C no cumplieron con las especificaciones de la FEUM .
- El modelo es económico, sencillo y puede ser útil para la evaluación de la potencia de productos que contienen este biofármaco.

8. PERSPECTIVAS

- Evaluar de 3 lotes de cada una de las marcas, con el fin de conocer el comportamiento interlotes.
- Realizar la comparación experimental entre la cepa sugerida B6D2F1 y la cepa propuesta en este estudio BALB/C.
- Comparar la potencia de los medicamentos de prueba y referencia relativa al estándar de EPOrh.

9. REFERENCIAS

- Aguilar J (2010). El reto de los medicamento biosimilares. *Diagnóstico*; 49 (4): 173 - 176.
- Alegre A (2005). Eritropoyetina en Hematología. Ed. Médica Panamericana; 1 - 235.
- Barber DL, De Andrea AD (1992). The erythropoietin receptor and the molecular basis of signal transduction. *Seminars in Hematology*; 29: 293 - 304.
- Barbone AG, Aparicio B, Anderson DW, Natarajan J & Ritchie DM (1994). Reticulocyte measurements as a bioassay for erythropoietin. *J Pharm Biomed Anal*; 12 (4): 515 - 522.
- Barth T, Oliveira PR, D'Avila FB, Dalmora SL (2008). Validation of the Normocythemic mice Bioassay for the potency evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical formulations. *J AOAC Int*; 91 (2): 285 - 91.
- Cabrera-García L, Ruiz Antorán B, Sancho López A (2009). Eritropoyetina: revisión de sus indicaciones. *Inf Ter Sist Nac Salud*; 33: 3 - 9.
- Casadevall N, Nataf J, Viron B (2002). Pure red cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N Engl J Med*; 346: 469 - 475.
- Cases A, Esforzado N, Mas M, Ricart MJ, Cruzado JM (2003). Aplasia pura de la serie roja asociada a anticuerpos neutralizantes frente a eritropoyetina inducida por epoetina alfa: una nueva forma de eritroblastopenia adquirida en pacientes urémicos. *Nefrología*; XXIII (3): 266 - 270.
- Harlan (2012). Harlan Laboratories Models, S.L. Tarifa de Precios, Modelos de Investigación y Servicios. Disponible en: <http://www.harlan.com/> revisión en enero de 2015.
- Choi D, Kim M & Park J (1996). Erythropoietin: physico- and biochemical analysis. *Journal of Chromatography. B*; 687: 189 -199.
- COFEPRIS (2015). *Lista de Medicamentos de Referencia*. Revisión en febrero de 2015.
- Cotes PM, Bangham D (1996). The international reference preparation of erythropoietin. *Bull World Health Organ*; 35: 751-760.
- Cournoyer D, Toffelmire EB, Wells GA (2004). Anti-erythropoietin antibody-mediated pure red cell aplasia after treatment with recombinant erythropoietin products: recommendations for minimization of risk. *J Am Soc Nephrol*; 15: 2728 - 2734.
- Cusumano A, Rendo P, Macheroni C, Sánchez Avalos JC (1996). Tratamiento de los pacientes en hemodiálisis crónica (HDC) con dosis bajas de eritropoyetina recombinante (r.Hu EPO) asociada o no a andrógenos. *Nefrología*; 16: 374 - 378.
- da Silva J, Dick P, Antunes K, Santos A, Gonçalves R, Akemi D, Roma F (2013). Potency assay of epoetin alpha: Comparison of Swiss Webster, NIH, C57BL/6, BALB/c mice with the hybrid B6D2F1. *Vigilância Sanitária em Debate*; 1 (3): 49 - 58.
- De Mora F (2010). Medicamentos derivados de la biotecnología: ¿Qué son? Una perspectiva farmacológica e histórica. *Journal of Generic Medicines*; 7: 145 - 157.

DOF (2009). Artículo 222 *Bis*: Ley General de Salud. Disponible en:
http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5094117&fecha=11/06/2009

Dordal MG, Wang FF, Goldwasser E (1985). The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology*; 116: 2293 - 2299.

Dubé S, Fisher JW, Powell JS (1988). Glycosylation at specific sites of erythropoietin is essential for biosynthesis, secretion and biological function. *J. Biol. Chem*; 263: 1751 - 1752.

Eaves CJ, Eaves AC (1992). Fundamental Control of Hematopoiesis. En J.W. Fisher (Ed.) *Biochemical Pharmacology of Blood and Bloodforming Organs. Handbook of Experimental Pharmacology*; 101: 5 - 31.

Eder H, Roblenbroich B, Failing K (1989). A dose-dependent effect of recombinant erythropoietin on the reticulocyte population of rats. *Blut*; 59: 184-187.

Egrie JC, Strickland TW, Lane J, Aoki K, Cohen AM, Smalling R, Trail G, Lin FK, Browne JK and Hines DK (1986). Characterization and biological effects of recombinant human erythropoietin. *Immunobiology*; 172: 213 - 224.

Egrie JC, Grant JR, Gillies DK, Aoki KH and Strickland TW (1993). The role of carbohydrate on the biological activity of erythropoietin. *Glycoconjugate J*; 10: 263 – 268.

Egrie JC, Browne JK (2001). Development and characterization of novel erythro-poiesis stimulating protein (NESP). *Br. J. Cancer*; 84 (1): 3 - 10.

Egrie JC, Dwyer E, Browne JK, Hitz A, Lykos MA (2003). Darbepoetin alfa has a longer circulating half life and greater in vivo potency than recombinant human erythropoietin. *Experimental hematology*; 31: 290 -299.

Elliott SG, Lorenzini T, Strickland T, Delorme E, Egrie JC (2000). Rational design of novel erythropoiesis stimulating protein (ARANESP): a super-sialated molecule with increased biological activity [abstract]. *Blood*; 96: 82 - 83.

EPAR (2007). Abseamed. International non-proprietary name/Common name: epoetin alfa Procedure No. EMEA/H/C/727/II/0006. Disponible en:
http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_Product_Information/human/000727/WC500020661.pdf revisado en julio de 2015.

Eschbach JW, Kelly MR, Haley NR (1989). Treatment of the anemia of progressive renal failure with recombinant human erythropoietin. *N Engl J Med*; 321: 158 - 163.

EMA (2012). Definición de biosimilares. Disponible en:
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/q_and_a/q_and_a_detail_000125.jsp&mid=WCOB01ac0580533e0c revisado en julio de 2015.

EMA *Guías para biocomparabilidad* (2015). Disponible en:
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000408.jsp revisado en julio de 2015.

EMA (2015). Biosimilar: Human Regulatory. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000408.jsp&mid=WC0b01ac058002958c revisado en julio de 2015.

EMA Dynepo (2015). Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPARProduct_Information/human/000372/WC50054477.pdf revisado en julio de 2015.

EMA Neorecormon Roche (2015). Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_Product_Information/human/000116/WC500024979.pdf revisado en agosto de 2015.

FEUM (2014), undécima edición. Secretaría de Salud 2014.

Goldwasser E (1983). The effects of Interleukin-3 on hemopoietic precursor cells. Normal and Neoplastic hematopoiesis; 301 - 309.

Gregory CJ, Eaves AC (1978). Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. Blood; 51: 527 - 537.

SSA GRR (2015). Gobierno Federal México, Evaluación, diagnóstico y tratamiento de Anemia Secundaria a Enfermedad Renal Crónica. Disponible en: http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/335_IMSS_09_Enfermedad_Renal_Cronica_Temprana/EyR_IMSS_335_09.pdf revisado en julio de 2015.

Hillman RS (1991). Las bases farmacológicas de la terapéutica. MacGraw-Hill; 8a ed.: 123.

Honorato J (2007). Diferencias entre medicamentos de síntesis química y de origen biotecnológico. Revista Española de Economía de la Salud; 6 (6): 334 - 338.

IPP Bioyetin Probiomed (2015). Disponible en: http://www.medicamentosplm.com/Home/productos/bioyetin_solucion_inyectable/136/101/36769/162 revisada en agosto de 2015.

IPP Epocryn Cryopharma (2015). Disponible en: http://www.medicamentosplm.com/Home/productos/epocryn_liofilizado_para_solucion_inyectable/45/101/33559/105 revisada en agosto de 2015.

IPP Eprex Janssen-Cilag (2015). Disponible en: <http://www.drugs.com/uk/eprex-10-000-iu-ml-solucion-for-injection-in-pfs-leaflet.html> revisada en agosto de 2015.

IPP Erlan Lansteiner- Scientific (2015). Disponible en: <http://www.medicamentos.com.mx/DocHTML/30391.htm> revisada en agosto de 2015.

IPP Exetin-A PISA (2015). Disponible en: http://www.medicamentosplm.com/Home/productos/exetin_a_solucion_inyectable/134/101/7608/162 revisada en agosto de 2015.

IPP Recormon Roche (2015). Disponible en: http://www.medicamentosplm.com/home/productos/recormon_solucion_inyectable/154/101/9516/162 revisada en agosto de 2015.

- Jabs K, Alexander S, McCabe D (1994). Primary results from the U.S. multicenter pediatric recombinant erythropoiein (epo) study. *J Am Soc Nephrol*; 5: 456 – 491.
- Jelkmann W (2003). Biochemistry and assays of Epo. *Erythropoietin: Molecular Biology and Clinical Use*. FP Graham Publishing; 35 - 63.
- Jelkmann W (2009). Efficacy of recombinant erythropoietins: is there unity of international units? *Nephrol Dial Transplant*; 24: 1366 - 1368.
- Jelkmann W (2013). Physiology and Pharmacology of Erythropoietin. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*; 40 (5): 302-309.
- Koury ST, Bondurant MC, Koury MJ (1988). Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridation. *Blood*; 71: 524 - 529.
- Krantz SB (1991). Erythropoietin. *Blood*; 77: 419 - 434.
- Leu M, Crissey A, Leu J, Ciliberto G, Taub R (2001). Interleukin-6-Induced STAT3 and AP-1 Amplify Hepatocyte Nuclear Factor 1-Mediated Transactivation of Hepatic Genes, an Adaptive Response to Liver Injury. *Mol. Cell. Biol*; 21: 414 - 424.
- López Silva C (2012). México retoma un liderazgo regulatorio sobre medicamentos biotecnológicos y biocomparables. *Gaceta Médica de México*; 148; 1 - 2.
- Lukowsky WA, Painter, RH (1972). Studies on the role of sialic acid in physical and biological properties of erythropoietin. *Can. J. Biochem. Cell. Biol*; 50: 909 - 917.
- Macdougall IC, Eckardt KU (2006). Novel strategies for stimulating erythropoiesis and potential treatments for anaemia. *Lancet*; 368: 947 - 953.
- Martos-Rosa A, Martínez-de la Plata, Morales-Molina JA, Fayet-Pérez A, Acosta-Robles PJ (2015). Biosimilares, el camino ha comenzado. *Farm Hosp*; 39(2): 114 - 117.
- Michon J (2002). Incidence of anemia in pediatric cancer patients in Europe: results of a large, international survey. *Med Pediatr Oncol*; 39: 448 - 450.
- Miyajima A, Kinoshita T (1999). Cytokine Signaling for Proliferation, Survival and Death in Hematopoietic Cells. *International Journal of Hematology*; 69: 137 - 146.
- Miyake T, Kung CK, Goldwasser E (1977). Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem*; 252: 5558 - 5564.
- Mocroft A, Kirk O, Barton SE (1999). Anaemia is an independent predictive marker for clinical prognosis in HIV-infected patients across Europe. *AIDS*; 13: 943 - 950.
- Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwell VW (2001). *Bioquímica de Harper*. Ed El Manual Moderno; 15ª edición: 1-793.
- Noguchi CT, Bae SK, Chin K, Wada Y, Schechter AN, Hankins D (1991). Cloning of the human erythropoietin receptor gene. *Blood*; 78: 2548 - 2556.

SSA (2013). Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-201. "Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad". Publicada en el DOF el 20-sep-2013.

SSA (2014). Norma Oficial Mexicana NOM.257-SSA1-2014. "En materia de medicamentos biotecnológicos". Publicada en el DOF el 11-dic-2014.

OMS (2012). Datos y cifras sobre el cáncer. Página web <http://www.who.int/cancer/about/facts/es/> revisada en agosto de 2015.

OMS (2015). Diez datos sobre el vih/sida. Página web <http://www.who.int/features/factfiles/hiv/facts/es/> revisada en julio de 2015.

OPS OMS (2014). Crece el número de enfermos renales entre los mayores de 60 años con diabetes e hipertensión. Página web http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9379%3A2014-kidney-disease-rising-among-seniors-diabetes-hypertension&Itemid=1926&lang=es revisada en agosto 2015.

Página web <http://www.eritropoyetina.com/> revisada en abril de 2015.

Porter JH, Edwards GA, Charman S.A (2000). Lymphatic transport of proteins after s.c. injection: Implications of animal selection. *Adv Drug Deliv Rev*; 50: 157 - 171.

Powell J, Berkner K, Lebo R, Adamson J (1986). Human erythropoietin gene: high level expression in stably transfected mammalian cells and chromosome localization. *Proc Natl Acad Sci USA*; 83: 6465 - 6459.

PROBIOMED (2013). México, país líder en materia de medicamentos biotecnológicos. Disponible en: <http://www.probiomed.com.mx/prensa/liderenmedbio/> revisado en agosto de 2015.

Singh (2008). "Quality and safety of Epoetin biosimilars from developing countries" Brigham and Women's Hospital Harvard Medical School.

Ramos AS, Schmidt CA, Andrade SS, Fronza M, Rafferty B, Dalmora SL (2003). Biological evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical products. *Braz J Med Biol Res*; 36: 1561-1569.

SSA RIS (1998). Reglamento de Insumos para la Salud Art. 81 14-03-2014. Publicado en el DOF el 4 de febrero de 1998. Última reforma publicada en el DOF el 14 de marzo de 2014.

Rodak B (2005). *Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas*. Ed. Méd. Panam; 1- 838.

Roger S (2006). Biosimilars: How similar or dissimilar are they? *NEPHROLOGY*; 11: 341 - 346.

Rosen M (2004). The Coming of Biotech Generic Pharmaceuticals. Disponible en: <http://wtnnews.com/articles/533/> revisado en agosto de 2015.

Sasu BJ, Hartley C, Schultz H (2005). Comparison of epoetin alfa and darbepoetin alfa biological activity under different administration schedules in normal mice. *Acta Haematol*; 113: 163 -174.

- Schellekens H (2005). Follow-on biologics: challenges of the “next generation”. *Nephrol Dial Transplant*; 20 (4): iv31 - iv36.
- Schellekens H, Jiskoot W (2006). Eprex-associated pure red cell aplasia and leachates. *Nat Biotechnol*; 24: 613 - 614.
- Schellekens H (2008). The First Biosimilar Epoetin: But How Similar Is It? *Clin J Am Soc Nephrol*; 3: 174 - 178.
- Schellekens H (2009). Biosimilar therapeutics- what do we need to consider? *NDT Plus*; 2 (1): i27-i36.
- Schmidt CA, Ramos AS, da Silva JE, Fronza MF, Dalmora SL (2003). Activity evaluation and characterization of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical products. *Arq Bras Endocrinol Metab*; 47/2: 183 - 189.
- Shanks JH, Hill C, Miz TR, Lappin AP (1996). Localization of erythropoietingene expression in proximal renal tubular cells detected by digoxigenin-labelled oligonucleotide probes. *J Pathol*; 179: 283 - 287.
- Sikole A, Spasovski G, Zafirov D, Polenakovic M (2002). Epoetin omega for treatment of anemia in maintenance hemodialysis patients. *Clin Nephrol*; 57 (3): 237- 245.
- Sulkowski M, Shiffman M, Afdhal N, Rajender R, McCone J, Lee W, Herrine S, Harrison S, Poordad F, Koury K, Deng W, Noviello S, Pedicone L, Brass C, Albrecht J, McHutchison J (2010). Hepatitis C Virus Treatment-Related Anemia Is Associated With Higher Sustained Virologic Response Rate-IDEAL Study Team. *Gastroenterology*; 139 (5): 1602 - 1611.
- Sullivan PS, Hanson DL, Chu SY (1998). Epidemiology of anemia in human immunodeficiency virus (HIV)-infected persons: results from the multistate adult and adolescent spectrum of HIV disease surveillance project. *Blood*; 91: 301 - 308.
- Swartz MA (2001). The physiology of the lymphatic system. *Adv Drug Deliv Rev*; 50: 3-20.
- Tae-Eun K, Kyu-Pyo K, Bo-Hyung K, Sang-Goo S, In-Jin Jang, Kyung-Sang Y (2010). Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Comparison of Two Recombinant Human Erythropoietin Formulations After Single Subcutaneous Administration: An Open-Label, Sequence-Randomized, Two-Treatment Crossover Study in Healthy Korean Male Volunteers. *Clinical Therapeutics*; 32 (11): 1968 - 1978.
- Tsuda E, Goto M, Murakami A, Akai K, Ueda M, Kawanishi G, Takahashi N, Sasaki R, Chiba H, Ishihara H (1988). Comparative structural study of N-linked oligosaccharides of urinary and recombinant erythropoietins. *Biochemistry*; 27: 5646 - 5654.
- Voet D, Voet JG, Pratt C (2007). *Fundamentos de Bioquímica*. Editorial Médica Panamericana; 2da ed.: 1-1260.
- Wang FF, Kung CK, Goldwasser E (1985). Some chemical properties of human erythropoietin. *Endocrinology*; 116: 2286 -2292.
- Watson E, Bhide A, van Halbeek H (1994). Structure determination of the intact major sialylated oligosaccharide chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells. *Glycobiology*; 4: 227 - 237.

Woodcock J, Griffin J, Behrman R, Cherney B, Crescenzi T, Fraser B, Hixon D, Joneckis C, Kozlowski S, Rosenberg A, Schrager L, Shacter E, Temple R, Webber K, Winkle H (2007). The FDA's assessment of follow-on Protein products: A historical perspective. *Nat Rev Drug Discov*; 6: 437 - 442.

WHO (1964). Expert Committee on Biological Standardization. *Wld Hlth Org. techn. Report series 274*; 5 - 92.

WHO (1997). A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: 69 - 73.

Yang Y, Zhou Y, Yub L, Lia X, Shi X, Qin X, Rao C, Wang J (2014). A novel reporter gene assay for Recombinant Human Erythropoietin (rHuEPO) pharmaceutical products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 100: 316 – 321.

Youssofian H, Longmore G, Neumann D, Yoshimura A, Lodish H (1993). Structure, function and activation of the erythropoietin receptor. *Blood* 81: 2223 - 2236.

iv. **Anexo A**

Carta de aprobación del CICUAL



**FACULTAD DE QUÍMICA
COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO
Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO
OFICIO/FQ/CICUAL/105/15
ASUNTO: Aprobación de Protocolo**

**DRA. HELGI JUNG COOK
FARMACIA
*Presente***

Por medio de la presente le informamos que el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL), de la Facultad de Química, UNAM, ha revisado el Protocolo con el título:

“Evaluación de potencia de productos farmacéuticos que contienen Eritropoyetina humana recombinante en un modelo in vivo”

De acuerdo a lo establecido en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (edición 11), para evaluar la Potencia de EPO rh.

Emite el dictamen de: **APROBADO**

Sin más por el momento le enviamos un cordial saludo.

Atentamente
“POR MÍ RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, D. F. a 09 de Abril del 2015

**M. en C. Ma. Isabel Gracia Mora
Presidenta del CICUAL**

c.c.p. CICUAL