UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIOS BIOFARMACÉUTICOS DE PRODUCTOS CONTENIENDO FILGRASTIM. UNA PROPUESTA PARA EVALUAR SU BIOCOMPARABILIDAD

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
M. en C. Karina Lizbet Mendoza Macedo

TUTORA: Dra. Helgi Helene Jung Cook
Facultad de Química

COMITÉ TUTOR:
Dr. Enrique R. Ángeles Anguiano
FES Cuautitlán
Dr. Rafael Castillo Bocanegra
Facultad de Química

CIUDAD DE MÉXICO. MAYO 2017

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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. Rafael Castillo Bocanegra
VOCAL	Dra. María Estela Meléndez Camargo
VOCAL	Dra. Adela Rodríguez Romero
VOCAL	Dra. Rosa María Ventura Martínez
SECRETARIO	Dr. Andrés Navarrete Castro

Lugar donde se realizó el trabajo de tesis:

Laboratorio 112, Edificio E, Departamento de Farmacia
Universidad Nacional Autónoma de México

Cruce de carreteras Acatzingo-Zumpahuacán, Tenancingo Edo. de México
PROBIOMED, Planta Tenancingo

ARTÍCULO

Karina Mendoza-Macedo, Alexis J. Romero-Díaz, Mariana P. Miranda-Hernández, Víctor R. Campos-García, Nancy D. Ramírez-Ibañez, L. Carmina Juárez-Bayardo, Karen Moreno-Duran, Miriam S. Cedillo-Robles, Nestor O. Pérez, Helgi Jung-Cook, Luis F. Flores-Ortiz, Emilio Medina-Rivero. **Characterization and comparability of biosimilars: A filgrastim case of study and regulatory perspectives for Latin America.** Electronic Journal of Biotechnology. (2016), 19 (5) 63-69.

CONGRESOS

Reunión Anual del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Cartel: **Implementación de estudios Fisicoquímicos y Biológicos para evaluar la biocomparabilidad de productos conteniendo Filgrastim**. Mayo 2014. Ciudad de México, México.

Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas. Cartel: **Desarrollo y comparación de dos metodologías para determinar la potencia de Filgrastim *in vivo*.** Octubre 2014. Puerto Vallarta, Jalisco, México

AAPS National Biotechnology Conference. Cartel: **Biocomparabilidad fisicoquímica de Filgrastim**. Junio 2015. San Francisco, California, EUA.

Día de la investigación en la Faculta de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Cartel: **Evaluación fisicoquímica y biológica de medicamentos de origen biotecnológico: Filgrastim y Eritropoyetina**. Septiembre 2015, Ciudad de México, México.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que a través del Posgrado en Ciencias Químicas, me permitió continuar y enriquecer mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado para realizar mis estudios de doctorado (becario No 211330).

Al financiamiento aportado por el proyecto CONACyT 179118 para la realización del presente proyecto de investigación.

A PROBIOMED, S.A. de C.V., por el apoyo tecnológico y científico para poder realizar este trabajo.

A la Dra. Helgi Helene Jung Cook mi más profundo agradecimiento por el apoyo constante, las enseñanzas científicas, éticas y de vida. Además de ser siempre un ejemplo de superación constante.

Al M en C Luis Francisco Flores Ortíz por el apoyo técnico y la constante asesoría brindada para llevar a cabo este proyecto.

A los miembros del jurado asignado, por tomarse el tiempo necesario para emitir observaciones y comentarios al presente escrito.

ÍNDICE

1. RESUMEN **7**

1.1. ABSTRACT **8**

2. INTRODUCCIÓN **9**

3. GENERALIDADES **11**

3.1. Fármacos Biotecnológicos **11**

3.1.1. Características 13

3.2. Medicamentos biotecnológicos en el mercado **14**

3.3. Medicamentos Biosimilares **16**

3.4. Biosimilares. Legislación internacional **18**

3.5. Legislación en México **27**

3.6. Factores Estimuladores de Colonias **29**

3.6.1. Filgrastim (rhu-G-CSF) 30

3.6.1.1. Actividad Farmacológica 31

3.6.1.2. Farmacocinética 32

3.6.1.3. Indicaciones terapéuticas 33

3.6.1.4. Efectos adversos 34

3.6.1.5. Dosis y vía de administración 36

3.7. Impacto económico de medicamentos biotecnológicos *vs* biosimilares **37**

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA **39**

5. HIPÓTESIS **40**

6. OBJETIVOS **40**

6.1. Objetivo General **40**

6.2. Objetivos Específicos **40**

7. PARTE EXPERIMENTAL **41**

7.1. Productos bajo estudio **41**

7.2. Pruebas fisicoquímicas y biológicas **41**

7.2.1. Pruebas fisicoquímicas 43

7.2.1.1. Pureza 43

7.2.1.1.1. Detección de proteínas con masa molecular diferente a filgrastim.. 43
7.2.1.1.2. Determinación de proteínas relacionadas 44
7.2.1.1.3. Determinación de oligómeros 44
7.2.1.2. Estructura Primaria 45
7.2.1.2.1. Determinación de masa molecular 45
7.2.1.2.2. Mapeo peptídico 46
7.2.1.2.3. Verificación de la secuencia de aminoácidos 47
7.2.1.2.4. Determinación del punto isoeléctrico. Electroforesis capilar 47
7.2.1.3. Estructura Secundaria 47
7.2.1.3.1. Dicroísmo Circular 47
7.2.1.4. Estructura terciaria 48
7.2.1.4.1. Fluorescencia 48
7.2.1.4.2. Calorimetría Diferencial de Barrido 48
7.2.2. Pruebas Biológicas, estudios *in vitro* 49
7.2.2.1. Potencia 49
7.2.2.2. Bioensayo de unión al receptor de colonias de estimulador de granulocitos (G-CSFR) 50

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 52
8.1. Pruebas fisicoquímicas 53
8.1.1. Pureza 53
8.1.1.1. SDS-PAGE 53
8.1.1.2. Proteínas Relacionadas 55
8.1.1.3. Oligómeros 58
8.1.2. Estudios de Identidad 60
8.1.2.1. Estructura primaria 60
8.1.2.1.1. Determinación de la masa molecular por Masas (ESI-TOF) 60
8.1.2.1.2. Mapeo peptídico 61
8.1.2.1.3. Verificación de la secuencia de aminoácidos 64
8.1.2.1.4. Punto isoeléctrico 66
8.1.2.2. Estructura secundaria 68
8.1.2.2.1. Dicroísmo Circular 68

8.1.2.3. Comparación de la estructura terciaria 70
8.1.2.3.1. Fluorescencia..... 70
8.1.2.3.2. Calorimetría diferencial de barrido 72
8.2. Actividad Biológica 74
8.2.1. Potencia..... 74
8.2.2. Unión al receptor..... 75
8.3. Discusión global de resultados 77
8.4. Consideraciones finales 79
9. CONCLUSIONES 82
10. BIBLIOGRAFÍA 83
11. ARTÍCULO..... 97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Inserción de material genético en organismos vivos para la producción de fármacos biotecnológicos 11
Figura 2. Medicamentos de origen biotecnológicos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) en el 2013 [10] 12
Figura 3. Algunos de los países que ya cuentan con regulación para el registro de medicamentos biosimilares 19
Figura 4. Ruta para evaluar la biocomparabilidad 21
Figura 5. Secuencia de aminoácidos de filgrastim [66] 30
Figura 6. Modelo teórico de filgrastim obtenido mediante cristalografía de rayos X [70] 31
Figura 7. Efecto terapéutico de filgrastim 34
Figura 8. Técnicas utilizadas para evaluar las propiedades fisicoquímicas de productos conteniendo filgrastim 42
Figura 9. Gel correspondiente al producto 1 (A) y al producto 2 (B) empleando el método farmacopeico 54
Figura 10. Electroforesis en gel para diferentes productos conteniendo filgrastim. 1 y 2: Neupogen de distintos lotes. 3-7: Diferentes lotes del producto a prueba. 8: estándar de pesos moleculares. Imagen tomada de Pérez N., 2014 [91] 55
Figura 11. Determinación de proteínas relacionadas (forma oxidada 1, forma oxidada 2 y forma desaminada) contenidas en el producto 1 (A) y el producto (6), empleando cromatografía en fase reversa 56
Figura 12. Cromatografía de exclusión molecular para la determinación de oligómeros en el producto 1 (A) y el producto 6 (B) 59
Figura 13. Mapeo peptídico de filgrastim. En la parte superior el producto 1 y 6 (A y B respectivamente) y en la parte inferior Neupogen® 63
Figura 14. Verificación de la secuencia de aminoácidos para uno de los lotes del producto 1 (A) el cual presenta un 100 % de cobertura con respecto a la secuencia teórica y para uno de los lotes del producto 6 (B) el cual posee un 98.3 % de cobertura en la secuencia 65

Figura 15. Electroferogramas correspondientes al producto 1 (A) y al producto 6 (B). El punto isoeléctrico de 6.2, corresponde a filgrastim 67
Figura 16. Espectro de dicroísmo circular de Neupogen®, en rojo y el producto 1 (A) y el producto 6 (B) en azul 69
Figura 17. Espectro de Dicroísmo Circular para diferentes productos conteniendo filgrastim. Tomado de Levi M., 2013 [96] 70
Figura 18. Tiempo de vida obtenido por fluorescencia de los productos bajo estudio 72
Figura 19. Temperatura de transición para el Producto 2, en rojo se observa Neupogen® y en azul el producto 1 74
Figura 20. Curvas de unión a receptor para los productos 1 (superior) y 6 (inferior) 76

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Fármacos biotecnológicos y enfermedades a las que se encuentran dirigidos.15
Cuadro 2. Diferencias entre medicamentos producto de síntesis química y biotecnológicos....18
Cuadro 3. Atributos fisicoquímicos de fármacos biotecnológicos y las herramientas analíticas utilizadas para su evaluación....21
Cuadro 4. Normatividad en Latinoamérica para medicamentos biosimilares....25
Cuadro 5. Resultados de los parámetros farmacocinéticos de filgrastim (SD)....33
Cuadro 6. Productos utilizados en las pruebas de biocomparabilidad....41
Cuadro 7. Valores promedio de proteínas relacionadas, en los productos conteniendo filgrastim....57
Cuadro 8. Suma total de proteínas relacionadas en los productos conteniendo filgrastim....57
Cuadro 9. Valores promedio de formas truncas y oligómeros de los productos bajo estudio....59
Cuadro 10. Valores de peso molecular de los productos bajo estudio conteniendo filgrastim....60
Cuadro 11. Porcentaje de cobertura de secuencia de aminoácidos de los productos conteniendo filgrastim....65
Cuadro 12. Resultados de punto isoeléctrico de los productos bajo estudio conteniendo filgrastim....68
Cuadro 13. Valores promedio de tiempo de vida de los medicamentos conteniendo filgrastim....71
Cuadro 14. Temperatura y entalpía de transición para cada producto evaluado....74
Cuadro 15. Resultados de la potencia relativa *in vitro* para filgrastim....75
Cuadro 16. Porcentaje de afinidad relativa el receptor de filgrastim....77
Cuadro 17. Parámetros críticos de calidad para compuestos conteniendo filgrastim y su impacto en la seguridad y eficacia....77
Cuadro 18. Resultados de las pruebas farmacopeicas aplicadas a los productos conteniendo filgrastim....80
Cuadro 19. Resultados de las pruebas complementarias aplicadas a los productos conteniendo filgrastim....81

1. RESUMEN

Objetivo: El objetivo del presente trabajo fue establecer la comparabilidad fisicoquímica y biológica de productos biotecnológicos conteniendo factor estimulante de colonias de granulocitos (rhG-CSF/ filgrastim).

Métodos: Se evaluaron diferentes lotes de seis productos comerciales diferentes conteniendo filgrastim y el producto de referencia Neupogen®. Se emplearon las pruebas establecidas en la Farmacopea, para determinar la pureza, identidad y la potencia de los medicamentos bajo estudio. Para comparar la estructura primaria secundaria y terciaria de los productos, se utilizaron técnicas novedosas, como espectrometría de masas (MS), dicroísmo circular (DC) y espectroscopia de fluorescencia (TCSPC). La estabilidad termodinámica de los productos se evaluó mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC). La determinación de la actividad biológica se llevó a cabo empleando la prueba de unión al receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos.

Resultados: No se encontraron diferencias en la identidad, pureza, potencia y estabilidad termodinámica de los productos bajo estudio en relación al producto de referencia. Las metodologías complementarias permitieron definir otros atributos críticos de calidad como estructura, estabilidad en el medio que la contiene e identidad de alto orden, demostrando en todos los casos ser semejantes al Neupogen®. Sin embargo, al realizar el estudio *in vitro* de unión al receptor, dos de los productos presentaron una efectividad biológica diferente al producto innovador.

Conclusión: Los resultados mostraron que el perfil fisicoquímico y biológico de cuatro de los productos comerciales conteniendo filgrastim, fue semejante al del producto innovador. Estos productos pueden ser una opción costo-efectivo útil para pacientes que requieren este tipo de tratamiento.

1.1. ABSTRACT

Objective: The objective of the present work was to establish the physicochemical and biological comparability of biotechnological products containing granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF / filgrastim).

Methods: Different batches of six commercial products containing filgrastim and the reference product Neupogen® were evaluated. The tests established by the Pharmacopoeia were used to determine the purity, identity and potency of the drugs under study. New techniques such as mass spectrometry (MS), circular dichroism (DC) and fluorescence spectroscopy (TCSPC) were used to compare primary, secondary and tertiary structure of the products. The thermodynamic stability of the products was evaluated using differential scanning calorimetry (DSC). Determination of the biological activity was carried out using the receptor-ligand binding assay for granulocyte colony stimulating factor receptor.

Results: No differences were found in identity, purity, potency and thermodynamic stability of the products under study in relation to the reference product. Complementary methodologies allowed to define other critical quality attributes such as structure, stability in the medium containing the protein and high order identity, showing in all cases to be similar to Neupogen®. However, for the *in vitro* receptor-ligand binding study, two of the products had a different biological response regarding the innovative product.

Conclusion: The results showed that the physicochemical and biological profile of four commercial products containing filgrastim was similar to that of the innovative product. These products could be a cost-effective option for patients who require this type of treatment.

2. INTRODUCCIÓN

Los medicamentos obtenidos por biotecnología constituyen una nueva perspectiva y representan el futuro de la terapéutica médica.

La información acerca de la investigación de nuevas moléculas terapéuticas indica que el 30 % de ellas corresponde a este tipo de medicamentos, los cuales ocupan un lugar destacado en el tratamiento más avanzado de enfermedades crónico degenerativas como cáncer, diabetes, hepatitis C, artritis reumatoide e infarto de miocardio, entre otras.

A principios del 2004, las patentes de la primera generación de medicamentos biotecnológicos comenzaron a expirar, dejando las puertas abiertas a otros fabricantes para producirlos. En Europa a estos productos se les denominó "productos biológicos similares" o "biosimilares," ya que al ser productos sintetizados de forma biológica y por la complejidad de su estructura no pueden ser idénticos al producto original [1].

La Agencia Europea de Medicamentos (EMA) ha desarrollado guías para determinar la biosimilitud de estos medicamentos. Estas guías indican que primeramente es necesario llevar a cabo un ejercicio exhaustivo de caracterización fisicoquímica, por lo que es de importancia contar con técnicas de vanguardia que permitan identificar aquellas diferencias entre los productos, que pudieran tener impacto sobre su seguridad, eficacia e inmunogenicidad. Es un hecho que mientras mayor sea la similitud del producto a prueba con respecto al producto innovador, aumenta la probabilidad de que sea comparable en su seguridad y eficacia. Es así que, entre más caracterizado se encuentre el producto menor evidencia preclínica y clínica se requiere.

En México, antes del 2012, existía un vacío regulatorio que llevó al registro de varias copias de medicamentos biotecnológicos, entre ellos a productos conteniendo filgrastim.

El filgrastim se obtiene por técnicas de biotecnología a partir de una cepa de laboratorio de la bacteria *Escherichia coli,* genéticamente modificada mediante adición de un gen que codifica el factor estimulador de las colonias de granulocitos.

Este compuesto es ampliamente utilizado para reducir la duración de la neutropenia en pacientes con cáncer que reciben terapia mielosupresora, en pacientes con cáncer sometidos a trasplante de médula ósea y en pacientes con neutropenia crónica severa [2].

La patente del filgrastim venció en el año 2006, por lo que otros laboratorios ya comercializan este producto [3]. En la actualidad existen en México 6 productos conteniendo este fármaco.

Considerando su amplio uso y la falta de información acerca de la calidad de los productos en México, en el presente trabajo, se implementaron una serie de técnicas y se evaluaron las propiedades fisicoquímicas y biológicas de diferentes productos conteniendo filgrastim en dosis de 300 μg/mL.

3. GENERALIDADES

3.1. Fármacos Biotecnológicos

Los fármacos biotecnológicos son producidos mediante la implantación de material genético en organismos vivos como microorganismos o células eucariontes (Fig. 1). Una vez obtenida la proteína, ésta se aísla y purifica para su posterior preparación como medicamento.

Este grupo de medicamentos incluye a hormonas recombinantes, citocinas, anticuerpos monoclonales, factores de coagulación, proteínas de fusión y vacunas recombinantes [4].

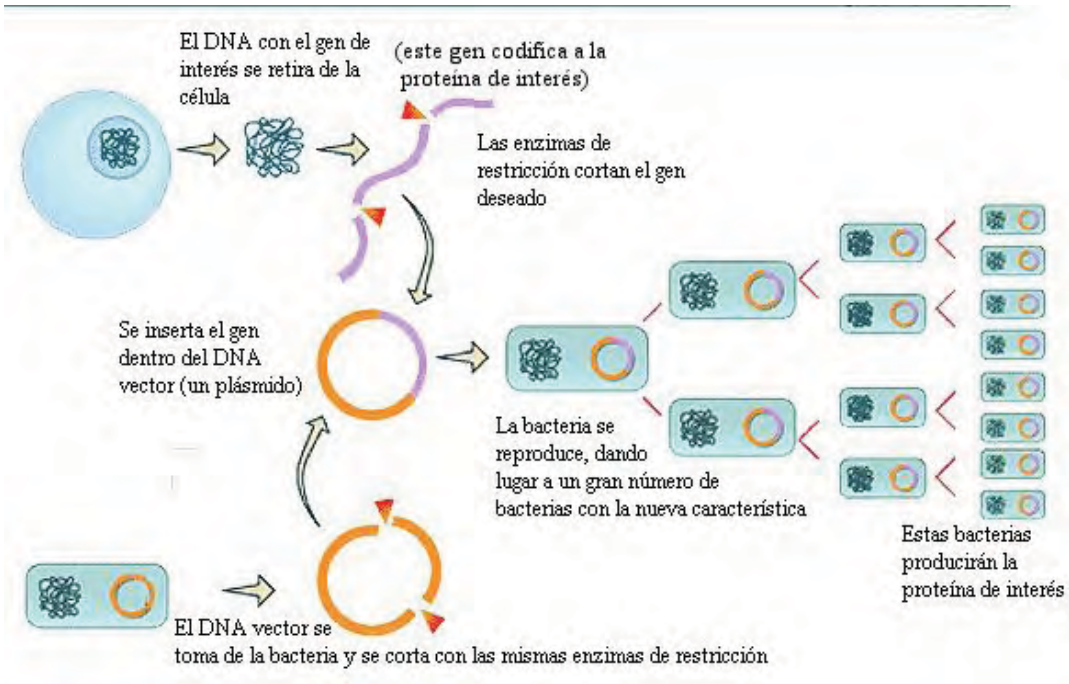


Figura 1. Inserción de material genético en organismos vivos para la producción de fármacos biotecnológicos

Estos medicamentos ocupan un lugar destacado para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades graves y crónicas (cáncer, hepatitis C, artritis reumatoide, infarto de miocardio, etc. (Fig. 2)) [5] para las que con frecuencia no hay tratamiento disponible,

por lo que reducen la mortalidad prematura, disminuyen la morbilidad y mejoran la calidad de vida de los pacientes.

En la década de los 80's inició la comercialización de este tipo de medicamentos, siendo la insulina el primero en salir al mercado [6]. Esta proteína fue sintetizada en 1978 por la primera empresa de biotecnología a nivel mundial, Genentech [7]. Posteriormente se comercializaron otras proteínas recombinantes como eritropoyetina, somatropina, interferón alfa, interferón beta y filgrastim. A estos medicamentos, que son proteínas homólogas a las endógenas producidas por el cuerpo humano se les denomina medicamentos biotecnológicos de primera generación [8]. Los medicamentos biotecnológicos de segunda generación incluyen a los anticuerpos monoclonales humanos y humanizados que son ampliamente utilizados en enfermedades autoinmunes y también en el tratamiento de cáncer [9].

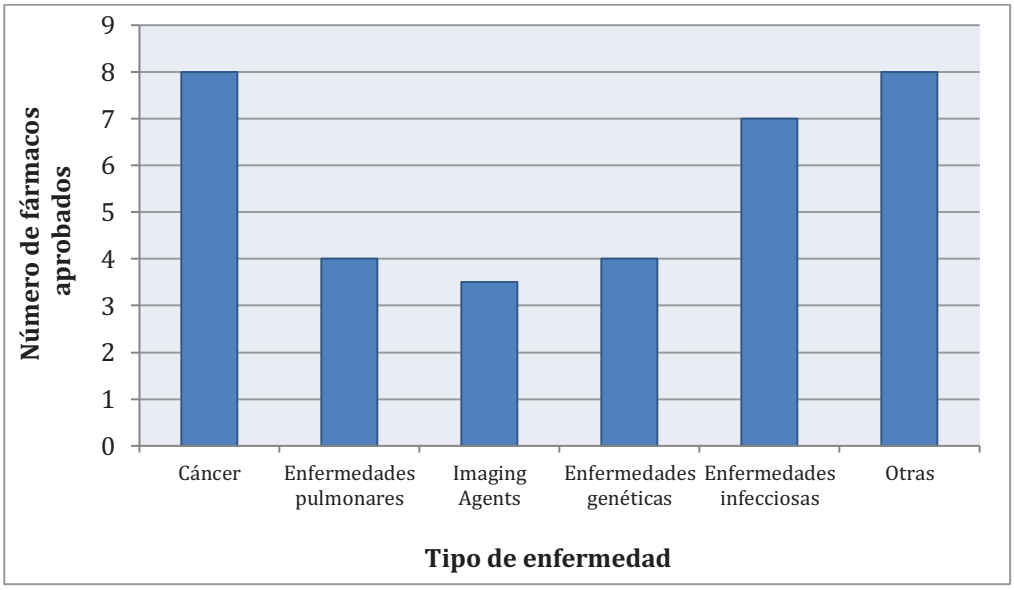


Figura 2. Medicamentos de origen biotecnológicos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) en el 2013 [10]

3.1.1. Características

Los fármacos biotecnológicos son moléculas complejas, de caracterización química difícil y, muchas veces, incompleta [11]. A continuación, se enlistan sus principales atributos:

- Los fármacos biotecnológicos son macromoléculas que por lo general tienen una masa molecular que oscila entre los 3.0 y 30.0 kDa.
- La actividad biológica de los mismos depende de que adopten la estructura tridimensional correcta.
- La relación estructura-actividad es desconocida o parcialmente conocida
- Son moléculas inestables y pueden sufrir cambios conformacionales debidos a la temperatura, al almacenamiento prolongado, a solventes orgánicos, al oxígeno, al cambio en el pH, lo que puede llevar a una reducción o pérdida de la actividad biológica [12,13].
- Su producción depende de dos factores, uno de ellos es la célula productora, la cual puede llevar a cabo la glicosilación, la acilación, fosforilación y proteólisis de la molécula. Y el otro factor son las condiciones del proceso, mediante las cuales el biofármaco puede ser oxidado, desaminado, o parcialmente desnaturalizado. Debido a todos estos factores es complicado que el producto sea una sola proteína pura, siendo el resultado una mezcla de especies molecularmente relacionadas. En referencia a la total dependencia de este tipo de medicamentos al proceso de fabricación, en biotecnología se dice que “el proceso es el producto” [14,15].
- La farmacocinética de un medicamento biotecnológico es más difícil de caracterizar

que uno de síntesis química debido a que al ser proteínas, pueden confundirse con las proteínas endógenas. Sin embargo, gracias al desarrollo de inmunoensayos, se ha facilitado esta tarea.

- Su biodisponibilidad oral es menor al 1% por lo que las vías de administración intravenosa y subcutánea son las de elección [16,17].
- La característica diferencial fundamental de las moléculas obtenidas por biotecnología es el riesgo de inmunogencidad ya que, al tratarse de moléculas biológicamente activas derivadas de células vivas, tienen el potencial de activar la respuesta inmune. Existen diferentes factores que contribuyen a la inmunogenicidad, entre los que se encuentran: a) tipo de proteína, las proteínas análogas a las proteínas endógenas son menos inmunogénicas que las exógenas; b) el grado o secuencia de glicosilación; c) factores que dependen del proceso: Después de la purificación de la proteína recombinante pueden permanecer impurezas proteicas o de polisacáridos, con el consiguiente efecto inmunogénico; d) la agregación en la formulación farmacéutica, por lo que es necesario prevenirla para minimizar este efecto [18-21].

3.2. Medicamentos biotecnológicos en el mercado

Los medicamentos biotecnológicos están dirigidos a un mercado donde las enfermedades no han podido ser combatidas por los fármacos de síntesis química [22,23]. En el cuadro 1 se presentan algunos de los fármacos biotecnológicos que se encuentran disponibles en el mercado, así como su uso terapéutico.

Cuadro 1. Fármacos biotecnológicos y enfermedades a las que se encuentran dirigidos

Principio Activo	Nombre comercial	Titular	Indicación
Rituximab **(Anticuerpo monoclonal)**	Mabthera®	Roche	Linfoma, leucemia, artritis reumatoide
Adalimumab **(Anticuerpo monoclonal)**	Humira®	Abbott	Artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, psoriasis, Artritis juvenil
Infliximab **(Anticuerpo monoclonal)**	Remicade®	Schering-Plough	Artritis reumatoide, Artritis psoriática, colitis ulcerativa
Trastuzumab **(Anticuerpo monoclonal)**	Herceptin®	Roche	Cáncer de mama, carcinoma gástrico
Somatropina **(Hormona)**	Genotropin C®	Pfizer	Deficiencia de la hormona de crecimiento
Filgrastim **(Citocina)**	Neupogen®	Amgen	Neutropenia, Leucemia mieloide
Eritropoyetina **(Citocina)**	Eprex®	Roche	Tratamiento de la anemia asociada a enfermedad renal
Insulina **(Péptido)**	Humulina®	Eli Lilly	Diabetes mellitus tipo 1
Etarnercept **(Anticuerpo monoclonal)**	Enbrel®	Pfizer	Para el tratamiento de la espondilitis anquilosante, antirreumático. Para el tratamiento de la psoriasis.
Interferón beta 1a **(Citocina)**	Rebif®	Merck	Esclerosis múltiple
Tenecteplasa **(Enzima)**	Metalyse®	Boehringer Ingelheim	Tratamiento trombolítico del infarto agudo al miocardio

Continuación cuadro 1. Fármacos biotecnológicos y enfermedades a las que se encuentran dirigidos

Principio Activo	Nombre comercial	Titular	Indicación
Denosumab **(Anticuerpo monoclonal)**	Prolia®	Amgen	Osteoporosis postmenopáusica establecida y para la pérdida ósea en pacientes con cáncer de mama y próstata
Basiliximab **(Anticuerpo monoclonal)**	Simeulet	Novartis Pharma AG	Profilaxis del rechazo en trasplante renal. Auxiliar en el tratamiento combinado con ciclosporinas y corticoesteroides
Belimumab **(Anticuerpo monoclonal)**	Benylstia IV	GlaxoSmithKline	Lupus Eritromatoso Sistémico (LES) activo con anticuerpos positivos.
Omalizumab **(Anticuerpo monoclonal)**	Xolair®	Novartis	Asma alérgica persistente moderada a grave

3.3. Medicamentos Biosimilares

Al vencer la patente de un fármaco biotecnológico, se abren las puertas para que otras farmacéuticas puedan producir el medicamento para su comercialización. Sin embargo, para su registro, se requiere presentar información especial, ya que el origen biológico de estos medicamentos les confiere una especificidad, que la normativa para los medicamentos genéricos no es capaz de abarcar. La regulación para productos genéricos (productos farmoquímicos) permite su aprobación por la autoridad sanitaria correspondiente basándose en la equivalencia terapéutica mediante estudios de

bioequivalencia [24]. Los productos genéricos no tienen que demostrar ni seguridad ni eficacia a través de costosos estudios clínicos, por lo que pueden ser vendidos a un menor costo en comparación al medicamento innovador. En el caso de los medicamentos biotecnológicos, pueden existir diferencias entre el medicamento innovador y el producido por otro laboratorio farmacéutico, en la secuencia de aminoácidos, la glicosilación, la pureza, la agregación y la inmunogenicidad, por lo que estos medicamentos no serán idénticos [25,26] y, por ende, el término «biogenérico» es inadecuado [27,28]. A nivel mundial se les han dado diferentes nombres a las copias de los medicamentos Biotecnológicos. En Europa se les llama "Productos Biológicos Similares" o "Biosimilares", en Japón "Follow-on proteins", en Estados Unidos se les llama "Follow-on biologics" en Canadá se les conoce como "Subsequent entry biologics (SEBs)" [29,30] y en México se les llama "Biocomparables" [31].

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), un biosimilar es la copia de un medicamento biotecnológico previamente autorizado, que ha demostrado calidad, seguridad y eficacia basado en un ejercicio dirigido de biocomparabilidad [32].

En el cuadro 2 se mencionan las principales diferencias entre los medicamentos de origen biotecnológico y los de síntesis química, lo que sustenta la necesidad de que estos últimos requieran otro tipo de pruebas para demostrar su biocomparabilidad [33].

Cuadro 2. Diferencias entre medicamentos producto de síntesis química y biotecnológicos

FARMOQUÍMICOS	BIOTECNOLÓGICOS
Producidos por síntesis química	Producidos por procesos biotecnológicos
Bajo peso molecular	Alto peso molecular
Propiedades fisicoquímicas bien definidas	Propiedades fisicoquímicas complejas
Estable	Sensible a la temperatura, pH, movimientos bruscos, etc.
Alta pureza	Mezcla heterogénea
Distribución a varios órganos y tejidos	Distribución limitada al plasma y/o fluido extracelular
Por lo general no es antigénica	Usualmente antigénica
Completamente caracterizado por métodos químicos	Difícil de caracterizar
Los contaminantes generados son fácilmente detectados	La detección de contaminantes es compleja
No se ve afectado por pequeños cambios en el proceso de fabricación	Altamente susceptible a pequeños cambios en el proceso de fabricación
Registro (ante la autoridad sanitaria correspondiente) mediante bioequivalencia	Registro (ante la autoridad sanitaria correspondiente) mediante pruebas de biocomparabilidad

3.4. Biosimilares. Legislación internacional

La entrada de medicamentos biosimilares obligó a las autoridades sanitarias a revisar los procedimientos de registro de medicamentos. Actualmente, existen muchos países que

publicaron los requerimientos para la aprobación y registro de los medicamentos biosimilares, los cuales se presentan en la figura 3 [34].

Figura 3. Algunos de los países que ya cuentan con regulación para el registro de medicamentos biosimilares

La primera agencia en establecer estos requerimientos fue la European Medicines Agency (EMA) [35], la cual, en el 2005 publicó dos documentos: "Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues" [36] y "Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues" [37]. Estos documentos contienen aspectos generales sobre los requisitos para el registro, entre ellos: evaluación pre-clínica, farmacocinética/farmacodinamia en humanos, evaluación de

la seguridad y eficacia, y aspectos de extrapolación [38,39]. Considerando las características particulares de cada uno de los fármacos biotecnológicos, es necesario elaborar una guía específica para cada uno de ellos para evaluar la biocomparabilidad. Actualmente, se han publicado difernentes guías, entre las que se encuentran: interferon alfa, somatropina, eritropoyetina, factor estimulador de colonias de granulocitos (filgrastim), insulina y análogos de insulina, anticuerpos monoclonales, interferon beta y hormona folículo estimulante humana [40-47].

El requerimiento de la EMA es un ejercicio completo de comparabilidad entre el producto de prueba y el producto innovador (Fig. 4), en donde la evaluación fisicoquímica es un paso crucial, debido a que estos atributos pueden modificar la seguridad y eficacia del producto. De hecho, entre mejor caracterizado a nivel fisicoquímico y biológico se encuentre el producto de prueba, menores serán los requerimientos preclínicos y clínicos. La forma en la que se lleva a cabo esta caracterización es mediante el uso de técnicas analíticas lo suficientemente sensibles, que permitan determinar aquellas diferencias entre los productos, que pudieran impactar en su seguridad o eficacia. En el cuadro 3 se presentan los principales atributos fisicoquímicos y biológicos para los medicamentos biotecnológicos y las técnicas y/o herramientas analíticas más utilizadas para su evaluación [48-51].

Figura 4. Ruta para evaluar la biocomparabilidad

Cuadro 3. Atributos fisicoquímicos de fármacos biotecnológicos y las herramientas analíticas utilizadas para su evaluación

ATRIBUTO	HERRAMIENTA O TÉCNICA ANALÍTICA
Peso molecular	Cromatografía de exclusión molecular acoplado a detección múltiple (SEC-MALS)
	Electroforesis en gel (SDS-PAGE)
	Masas, desorción-ionización láser asistida por matriz/Electrospray-Tiempo de vuelo (MALDI/ESI-TOF)
Estructura de alto orden	Tiempo de vida por fluorescencia (TCSPC)
	Análisis de tioles libres
	Calorimetría diferencial de barrido (DCS)
	Resonancia magnética nuclear
	Cristalografía por rayos X
	Dicroísmo circular (DC)
	Espectroscopia infrarroja por transformada de furier
	Intercambio de hidrógeno-deuterio
Heterogenicidad de Carga	Cromatografía de intercambio hidrofóbico
	Isoelectroenfoque capilar
	Electroforesis capilar de zona
	Isoelectroenfoque
	Cromatografía de intercambio iónico
	Cromatografía de fase reversa (HPLC-FR)

Continuación cuadro 3. Atributos fisicoquímicos de fármacos biotecnológicos y las herramientas analíticas utilizadas para su evaluación

ATRIBUTO	HERRAMIENTA O TÉCNICA ANALÍTICA
Secuencia de Aminoácidos	Mapeo peptídico por masas
	Mapeo peptídico por UV
	Secuenciación de N- y C- terminal por degradación de edmann
Agregación o Fragmentación	Cromatografía de exclusión molecular
	Electroforesis en gel (SDS-PAGE)
	SEC-MALS
	Field-flow fractionation (FFF)
	Centrifugación analítica
	SEC UV/Fluorescencia
Glicosilación	Light obscuration
	Microflow digital imaging
	Cromatografía de interacción hidrofílica
	Carbohidratos por electroforesis capilar de zona
Bioactividad	Potencia *in vivo*
	Potencia *in vitro*
Unión a Receptor	In vitro por ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)
	In vitro por citometría de flujo
	Unión *in vitro* mediante resonancia de plasmón de superficie
	Western blot

Japón es uno de los países que cuenta también con una guía propia, "Guideline for the quality, safety and effectiveness of biosimilar products" [52], en la cual, para la aprobación de un producto biosimilar, se deben realizar los siguientes estudios:

- Proceso de producción del producto de prueba claramente definido
- Caracterización fisicoquímica y funcional completa comparando el producto de prueba con el de referencia

- Estudios preclínicos comparativos incluyendo bioactividad y toxicidad
- Estudios clínicos comparativos, incluyendo farmacocinética
- Estudio comparativo de inmunogenicidad
- Farmacovigilancia

El criterio de aceptación es no que debe haber impacto negativo en la calidad, la seguridad y eficacia comparado con el original, a menos que haya mejoras demostrables, situación en que la ausencia de comparabilidad se aceptaría.

En 2010 Canadá emitió la guía denominada: "Guidance for sponsors: information and submission requirements for subsequent entry biologics", la cual fue revisada en el año 2016 [30]. De acuerdo a esta guía, las pruebas requeridas para aprobar a un medicamento biosimilar son:

- Proceso de manufactura del producto de prueba claramente establecido.
- Caracterización fisicoquímica completa, comparando el producto de prueba con el producto de referencia
- Estudios clínicos comparativos. El número de estudios clínicos a solicitar estará en función del producto
- Estudio comparativo de inmunogenicidad
- Mismo producto de referencia a lo largo del estudio de farmacovigilancia

Para esta guía la aprobación de un biosimilar no implica sustitución automática con el producto de referencia.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) también emitió una guía para la regulación de biosimilares (Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products) [32]. Esta

iniciativa ha sido apoyada por países como India, China y Rusia. Los requisitos generales de esta guía, para la aprobación de medicamentos biosimilares son los siguientes:

- Caracterización empleando técnicas fisicoquímicas, bioquímicas y biológicas avanzadas, comparando el producto de prueba con el de referencia
- Evaluación preclínica comparativa
- Evaluación clínica comparativa, que incluye: estudios farmacocinéticos, farmacodinámicos y estudios de eficacia
- Estudio comparativo de inmunogenicidad
- Farmacovigilancia

En Estados Unidos a partir del 2012, se empezaron a emitir los documentos guía para el registro de medicamentos biosimilares. Actualmente, se cuenta con tres documentos que además de los requerimientos establecidos por los otros países, incluyen los siguientes puntos:

Los patrocinadores pueden presentar datos con animales o datos clínicos utilizando un producto de referencia que no esté comercializado en el país. Sin embargo, los estudios de caracterización analítica y al menos un estudio de farmacocinética y un estudio farmacodinámico deben de emplear el producto de referencia autorizado por los Estados Unidos, a menos que pueda justificar científicamente que no es necesario un estudio de este tipo.

Los patrocinadores deben utilizar la metodología analítica apropiada que tenga la sensibilidad y especificidad para detectar y caracterizar las diferencias entre el producto de prueba y el de referencia. Dado que los productos biosimilares siempre van a presentar pequeñas diferencias con respecto a los productos de referencia, la FDA se basa

principalmente en el conocimiento y el análisis de cómo estas diferencias pueden impactar en la seguridad, eficacia, potencia y calidad del producto biosimilar [53,54].

En Latinoamérica también se han establecido normas para la aprobación de medicamentos biosimilares, las cuales se resumen en el cuadro 4 [55-60, 31].

Cuadro 4. Normatividad en Latinoamérica para medicamentos biosimilares

País	Norma o Ley	Caracterización fisicoquímica	Preclínica	Clínica	Notas
Argentina	Legislación número 7729	Comparabilidad fisicoquímica y biológica	Depende de la caracterización fisicoquímica	Depende de la caracterización fisicoquímica	Es un ejercicio de comparabilidad con el medicamento de referencia
Brasil	Resolución No 55/2010	Extensiva comparabilidad fisicoquímica y biológica	Estudios farmacodinámicos relevantes para la indicación terapéutica solicitada Estudios de toxicidad a dosis repetidas, caracterización de parámetros toxicocinéticos en especies relevantes	Estudios de farmacocinética/farma codinamia Estudios de eficacia y seguridad, si hay disponibles estudios fase IV deben presentarse	Es un ejercicio de comparabilidad con el medicamento de referencia
		Toda la caracterización fisicoquímica y biológica	La extensión de los estudios preclínicos podría reducirse considerando la caracterización del producto, el nivel de impurezas, el mecanismo de acción, la toxicidad y el intervalo terapéutico	Estudios clínicos de fase I y II , que no es obligatorio que sean comparativos Estudios de fase III de no inferioridad o equivalencia o superioridad Si hay disponibles estudios fase IV deben presentarse	Desarrollo individual
Chile	Norma técnica de registro sanitario de productos biotecnológicos derivados de técnicas de ADN recombinantes	Extensiva comparabilidad fisicoquímica y biológica	Estudios *in vitro* e *in vivo* Estudios de toxicidad y tolerancia	Estudios farmacocinéticos, farmacodinámicos Estudios de seguridad y eficacia Depende de la caracterización fisicoquímica Inmunogenicidad	Es un ejercicio de comparabilidad con el medicamento de referencia
			Estudios preclínicos completos	Estudios clínicos fase I, II y III Inmunogenicidad	Desarrollo individual

Continuación cuadro 4. Normatividad en Latinoamérica para medicamentos biosimilares

País	Norma o Ley	Caracterización fisicoquímica	Preclínica	Clínica	Notas
Colombia	Decreto 1782	Extensiva comparabilidad fisicoquímica y biológica	Estudios preclínicos completos	Eficacia: indicaciones terapéuticas, contraindicaciones, interacciones Farmacocinética y Farmacodinamia Seguridad: efectos adversos e inmunogenicidad	Dossier completo
			Estudios de comparabilidad	Estudios de comparabilidad	Es un ejercicio de comparabilidad con el medicamento de referencia
		Extensiva comparabilidad fisicoquímica y biológica con metodologías de vanguardia	Aplica cuando: la sustancia activa se encuentra bien caracterizada, el perfil de seguridad y eficacia bien definido y altamente documentado. También se considera la experiencia clínica y la robustez de la farmacovigilancia		Comparabilidad abreviada
Costa Rica	Decreto No. 37006-s	Comparación de la calidad	Estudios preclínicos completos (*in vivo*/ *in vitro*)	Estudios farmacocinéticos, farmacodinámicos Estudios de seguridad y eficacia Estudios basados en lo que indica la FDA, EMA e ICH	Es un ejercicio de comparabilidad con el medicamento de referencia
Ecuador	Reglamento para la obtención del registro sanitario control y vigilancia de medicamentos biológicos para uso y consumo humano	Extensiva comparabilidad fisicoquímica y biológica	Estudios de toxicidad Farmacológicos y de inmunogenicidad	Estudios clínicos fase I y II Estudios de inmunogenicidad	Es un ejercicio de comparabilidad con el medicamento de referencia
Guatemala	Norma técnica 67-2010	Extensiva comparabilidad fisicoquímica y biológica Basarse en lo indicado en normas internaciones FDA, EMA, ICH y OMS	Basarse en lo indicado en normas internacionales FDA, EMA, ICH y OMS	Basarse en lo indicado en normas internacionales FDA, EMA, ICH y OMS Farmacovigilancia	Es un ejercicio de comparabilidad con el medicamento de referencia

Continuación cuadro 4. Normatividad en Latinoamérica para medicamentos biosimilares

País	Norma o Ley	Caracterización fisicoquímica	Preclínica	Clínica	Notas
México	NOM-177-SSA1-2013	Extensiva comparabilidad fisicoquímica y biológica	Estudios de seguridad *in vitro/in vivo* Estudios de toxicidad Estudios de farmacología en dos especies relevantes Estudios de actividad biológica y farmacodinamia (*in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*) Estudios de inmunogenicidad	Estudios farmacocinéticos, toxicológicos Estudios de seguridad y eficacia Fase I y II La extensión de los estudios depende de la caracterización fisicoquímica Farmacovigilancia	Es un ejercicio de comparabilidad con el medicamento de referencia

3.5. Legislación en México

En México existía un vacío regulatorio para este tipo de productos, cuya consecuencia fue la aprobación de copias de medicamentos biotecnológicos como si se tratara de medicamentos de síntesis química, es decir sin evidencia de estudios de comparabilidad fisicoquímica, pre-clínica y clínica. Esta situación representaba un riesgo y era necesario afrontarla y superarla en forma inmediata. En el año 2007, se realizó en México el foro "Hacía una regulación de medicamentos biotecnológicos en México" en dónde se plantearon los primeros pasos para iniciar la legislación en nuestro país [61].

Para el año 2009 se llevaron a cabo modificaciones en la Ley General de Salud, en el artículo 222 bis indicando que: "El solicitante de registro sanitario de medicamentos biocomparables que sustente su solicitud en un medicamento biotecnológico de referencia, deberá presentar los estudios clínicos y, en su caso *in vitro* que sean necesarios para demostrar la seguridad, eficacia y calidad del producto" [62].

Aun cuando ya se habían establecido estos primeros pasos para un registro adecuado de

medicamentos biotecnológicos, para el 2011 se registraron 23 copias de medicamentos biotecnológicos en México como genéricos y entre 1993 y 2012 se habían vendido más de 100 millones de dosis de tratamientos que usan estos medicamentos [25], sin embargo, considerando que la farmacovigilancia está en fase de desarrollo en nuestro país, no se cuenta con información suficiente para identificar cuáles fueron las repercusiones de estas aprobaciones.

En el año 2012 se publicó la Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-001-SSA1-2012 [63], para medicamentos biotecnológicos y sus biofármacos, que determinan las características técnicas y científicas que deben cumplir éstos para demostrar su calidad, seguridad y eficacia. En el 2013 se modificó la NOM-177-SSA-2013 y se incluyeron los requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad [31] y en el 2014, se publicó la NOM-257-SSA1-2014 que establece las directrices, requisitos y criterios generales para evaluar y autorizar a los medicamentos biotecnológicos innovadores y biocomparables [64]. Además de estas normas, se están elaborando guías individuales, las cuales establecerán los requisitos a cumplir caso por caso.

En resumen, la legislación en México para medicamentos biocomparables indica lo siguiente:

- Los medicamentos biotecnológicos de entrada subsecuente se les denomina “biocomparables”.
- Para su aprobación es necesario presentar los estudios de caracterización fisicoquímica, estudios preclínicos y clínicos que demuestren un perfil comparable de calidad, seguridad y eficacia respecto al producto innovador. Los

estudios clínicos para biocomparables se llevarán a cabo en México, cuando así lo indique la autoridad.

- Los requerimientos específicos se definirán caso por caso, tomando en cuenta la opinión del Comité de Moléculas Nuevas, el que para efectos de lo dispuesto en este artículo contará con un Subcomité de Evaluación de Productos Biotecnológicos que estará integrado por especialistas y científicos en materia de biotecnología farmacéutica.
- Deberá implementarse un plan de farmacovigilancia de este tipo de medicamentos.
- En la etiqueta, los biocomparables serán identificados con las siglas MBB (medicamentos biotecnológicos biocomparables) y los innovadores con las siglas MB (medicamentos biotecnológicos).

3.6. Factores Estimuladores de Colonias

Los factores estimuladores de colonias (CSF por sus siglas en inglés) son glicoproteínas que actúan sobre las células hematopoyéticas uniéndose a receptores específicos de la célula y estimulando su proliferación, diferenciación y activación.

Se dividen en cuatro grupos principales:

G-CSF: Factor estimulante de granulocitos

M-CSF: Factor estimulante de macrófagos

GM-CSF: Factor estimulante de granulocitos-macrófagos

Multi-CSF: Factor multifuncional (también llamado interleucina 3: IL-3)

El G-CSF es una glicoproteína que regula la producción de neutrófilos en la médula ósea y ha mostrado tener un mínimo efecto en la producción de otro tipo de células. El G-CSF es indispensable para mantener el balance normal de producción de neutrófilos durante la granulopoyesis. Normalmente, los niveles plasmáticos de G-CSF son indetectables, pero en respuesta a estímulos bacterianos aumentan rápidamente [65]. Al factor estimulante de colonias de granulocitos, producido mediante la tecnología recombinante, se le conoce como filgrastim.

3.6.1. Filgrastim (rhu-G-CSF)

Este biofármaco se sintetiza mediante ingeniería genética, insertando en la bacteria *Escherichia coli* el gen de origen humano, correspondiente al factor de estimulación de colonias de granulocitos. Es una proteína compuesta por 175 aminoácidos, equivalentes a 18800 Daltons (figura 5). El producto no está glicosilado lo que lo hace diferente del factor estimulante que produce el humano y además contiene un residuo de metionina en el amino terminal [3].

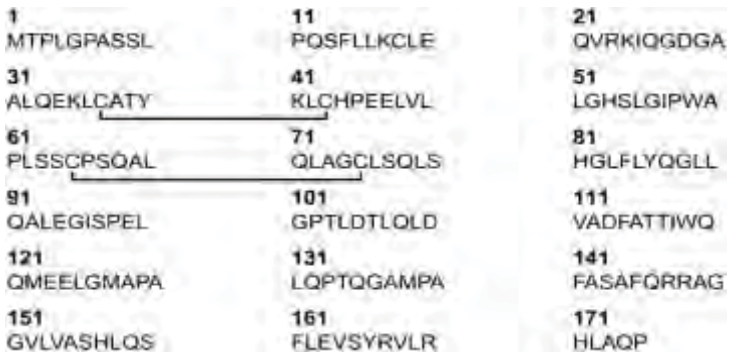


Figura 5. Secuencia de aminoácidos de filgrastim [66]

La producción y purificación de filgrastim inició entre 1984 y 1986, su desarrollo clínico comenzó en 1986 y con su aprobación (1991) se empezó a utilizar en pacientes con cáncer tratados con quimioterapia para combatir la neutropenia. Su uso ha llevado a reducir infecciones y reingresos al hospital de pacientes con cáncer [67,68]. El filgrastim ha sido aprobado en varios de países para el tratamiento de mielosupresión después de un trasplante de médula ósea, neutropenia crónica severa, leucemia aguda, anemia aplásica y síndromes mielodisplásicos [69].

El modelo teórico de la estructura de filgrastim muestra una estructura con 4 hélices antiparalelas como se observa en la figura 6.

Figura 6. Modelo teórico de filgrastim obtenido mediante cristalografía de rayos X [70]

3.6.1.1. Actividad Farmacológica

Filgrastim se une al receptor de factor estimulador de colonias de granulocitos (receptor de G-CSF) éste es un receptor de membrana, el cual ha demostrado ser específico, saturable y de alta afinidad para el estimulador de colonias de granulocitos. Se puede encontrar un mayor número de estos receptores en los neutrófilos maduros, de hecho,

entre mayor sea el nivel de maduración tendrá una mayor cantidad de receptores. Cuando filgrastim se une al receptor de G-CSF que se encuentra en la médula ósea, estimula la producción de neutrófilos funcionales, así como su liberación a sangre periférica 24 horas después de su administración. Filgrastim también promueve la maduración de estos neutrófilos.

Esta proteína también puede inducir el aumento leve de otras células del sistema inmunológico como son los eosinófilos y basófilos.

Los neutrófilos que se producen por la administración de filgrastim, muestran una actividad igual o mayor a los producidos normalmente por el cuerpo humano [71,72].

3.6.1.2. Farmacocinética

Al administrar filgrastim vía subcutánea o intravenosa se observó que este fármaco no posee una farmacocinética lineal. Las concentraciones máximas de filgrastim se alcanzan de 4 a 5 horas cuando es administrado por vía subcutánea. La vida media de eliminación oscila entre 0.43 a 1.02 horas en voluntarios sanos, pero en pacientes se han encontrado valores de alrededor de 1.3 y hasta 3.5 horas. Un dato importante es que cuando se administran altas dosis del fármaco el tiempo de vida media tiende a aumentar [73].

En un estudio para evaluar la “biosimilitud” entre Neupogen® con el primer biosimilar para filgrastim aprobado por la Comunidad Europea, se obtuvieron los parámetros farmacocinéticos que se presentan en el cuadro 5 [74].

Cuadro 5. Resultados de los parámetros farmacocinéticos de filgrastim (SD)

Dosis de filgrastim	Cmáx (ng/mL) (SD)	$ABC_{0\text{-}48\ h}$ (h*ng/mL) (SD)	$ABC_{0\text{-}\infty}$ (h*ng/mL) (SD)	$t_{1/2}$ (SD)
Intravenosa 5 mg (n=31)	126.124 (1.18)	470.373 (1.25)	471.431 (1.25)	8.00 (1.54)
Intravenosa 10 mg (n=30)	221.562 (1.20)	990.996 (1.25)	991.892 (1.25)	5.98 (1.50)
Subcutánea 5 mg (n=33)	18.416 (1.56)	159.426 (1.41)	160.783 (1.56)	8.94 (1.25)
Subcutánea 10 mg (n=30)	43.145 (1.47)	430.717 (1.33)	431.860 (1.33)	5.67 (1.26)

Cmáx: Concentración máxima alcanzada
$ABC_{0\text{-}48\ h}$: Área bajo la curva de 0 a 48 horas
$ABC_{0\text{-}\infty}$: Área bajo la curva de 0 a infinito
$t_{1/2}$: Tiempo de vida media

3.6.1.3. Indicaciones terapéuticas

El filgrastim está indicado para reducir la duración de la neutropenia y la incidencia de la neutropenia febril en los pacientes con neoplasias que reciben tratamiento con quimioterapia citotóxica convencional, así como para disminuir la duración de la neutropenia y sus secuelas clínicas en los pacientes sometidos a tratamiento mielosupresor seguido de trasplante de médula ósea y con riesgo de neutropenia crónica grave [75].

El filgrastim también está indicado para la movilización de células progenitoras hematopoyéticas hacia la sangre periférica tras la quimioterapia mielosupresora (Fig. 7), así como para la movilización de células progenitoras hematopoyéticas hacia la sangre periférica en donantes sanos [76].

La administración prolongada de filgrastim está indicada en los adultos y niños con neutropenia grave, congénita, cíclica o idiopática y antecedentes de infecciones recurrentes o graves para aumentar el número de neutrófilos y reducir la incidencia y la

duración de episodios infecciosos [77,78].

Está indicado para el tratamiento de la neutropenia persistente en pacientes con infección avanzada por el VIH, para reducir el riesgo de infecciones bacterianas, cuando no resulten adecuadas otras opciones terapéuticas para la neutropenia [79].

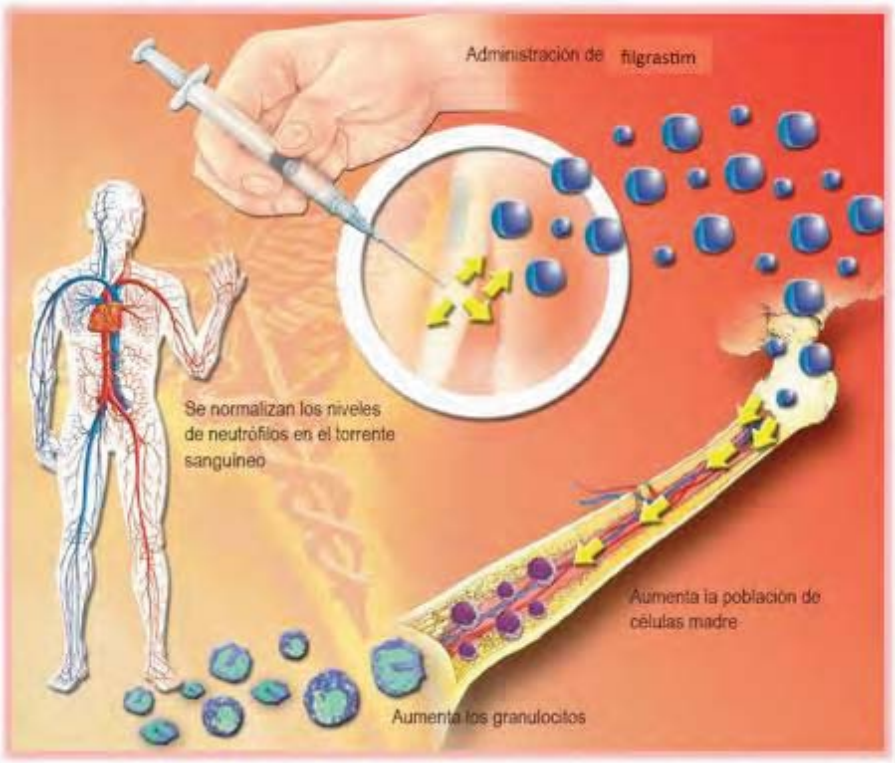


Figura 7. Efecto terapéutico de filgrastim

3.6.1.4. Efectos adversos

El filgrastim usualmente no produce reacciones adversas graves y sólo en raras ocasiones requieren descontinuar el tratamiento por los efectos secundarios. Debido a su efecto biológico, el filgrastim puede producir leucocitosis en menos del 5 % de los pacientes.

La reacción adversa más frecuente es un dolor profundo y palpitante en los huesos medulares que se observa hasta en el 33% de los pacientes.

En el 21-58% de los pacientes tratados con filgrastim se ha observado una moderada o ligera hiperuricemia y un aumento de la lactato-deshidrogenasa (LDH) y de la fosfatasa alcalina.

En el 4% de los pacientes se ha observado una moderada hipotensión que no requiere tratamiento. Se han detectado anemia y trombocitopenia en pacientes que recibieron filgrastim para la movilización de las células progenitoras de la sangre.

La trombocitopenia ha sido observada en el 12% de los pacientes con neutropenia crónica severa y con bazos palpables. Se ha observado esplenomegalia en el 30% de los pacientes que recibieron el filgrastim para tratar una severa neutropenia crónica. Se han reportado jaquecas en el 7% de los pacientes tratados con filgrastim previamente a una leucoforesis.

Las reacciones anafilácticas son muy poco frecuentes (< 1%). Las reacciones de hipersensibilización se caracterizan por síntomas sistémicos, en particular disnea, edema facial, hipotensión, rash, taquicardia, urticaria y jadeos. Estas reacciones se producen en los primeros 30 minutos después de la administración de la dosis y son más frecuentes después de la administración intravenosa. Más de la mitad de estas reacciones ocurren en pacientes tratados más de una vez con filgrastim.

No se ha observado la formación de anticuerpos neutralizantes para filgrastim ni una atenuación de la respuesta biológica [80]. Para Zarzio®, uno de los productos que contiene filgrastim que ha sido autorizado por la EMA y la FDA, no se encontró

evidencia de anticuerpos neutralizantes lo que coincide con lo reportado para el producto de referencia Neupogen® [81].

3.6.1.5. Dosis y vía de administración

En México, filgrastim se encuentra en el cuadro básico de medicamentos del sector salud, en presentación de solución inyectable para administración subcutánea o infusión intravenosa.

La dosis establecida es 5 µg/kg por día de peso corporal, en pacientes con quimioterapia mielosupresiva o con neutropenia. En trasplante de médula ósea, la dosis es de 10 µg/kg por día [82].

El siguiente es un ejemplo de los estudios que se presentaron en Europa para aprobar a un producto biosimilar conteniendo filgrastim [83,84].

- Estudios de calidad:
  - Proceso de manufactura: Estandarización del banco de células empleado; validación del proceso de manufactura.
  - Propiedades fisicoquímicas: apariencia, pH, determinación del punto isoeléctrico, concentración de proteínas, mapeo peptídico con secuenciación de C- y N-terminal, determinación de la masa molecular intacta, determinación de los puentes de disulfuro por mapeo peptídico y análisis de aminoácidos.
  - Pureza e impurezas: detección de otras proteínas con diferentes pesos moleculares, oligómeros, formas oxidadas y desaminadas y formas truncas.
  - Estabilidad: en condiciones reales, bajo condiciones aceleradas, bajo condiciones de estrés, ciclos de congelación-descongelación, ciclos de altas y

bajas temperaturas, fotoestabilidad y tiempo de vida útil, almacenándose por 24 meses a 5 ºC ± 3 ºC.

- Estudios pre-clínicos:
  - Farmacodinámicos: estudio in vitro, estudios de proliferación celular o midiendo la unión al receptor que activa la proliferación de neutrófilos. Ensayos in vivo en animales con neutropenia y estudios de eficacia en animales.
  - Farmacocinéticos: tratamiento de 28 días con filgrastim en animales y determinación de sus niveles plasmáticos el día 1 y el día 28.
  - Toxicológicos: estudios de dosis repetidas en animales, detección de anticuerpos y evaluación de la tolerancia.
- Estudios clínicos:
  - Fase I: Farmacocinética y seguridad.
  - Fase III: Seguridad y eficacia

3.7. Impacto económico de medicamentos biotecnológicos *vs* biosimilares

Aun cuando el tratamiento con medicamentos biotecnológicos es una alternativa eficaz para mejorar la calidad de vida, los costos de estos medicamentos son tan altos que no poseen un gran impacto en el sector salud en países en desarrollo. Por ejemplo, el costo anual por un tratamiento de Humira® (adalimumab), que se emplea para artritis reumatoide o enfermedad de Crohn se encuentra cerca de los 50 mil dólares por paciente. Otro ejemplo es el tratamiento con Cerezyme® (imiglucerase) para la enfermedad de Gaucher el cual tiene un costo anual de 200 mil dólares [10].

El punto más importante a destacar en el empleo de medicamentos biosimilares es que un sector más amplio de pacientes puede tener acceso a medicamentos de alta tecnología con la calidad, seguridad y eficacia requeridos. Un ejemplo de ello son las insulinas, donde las estimaciones sugieren que podrían costar entre el 65 al 85 % del costo del producto innovador [85,86] (producto que fue el primero en demostrar seguridad y eficacia). Así mismo, el único biosimilar a la fecha aprobado por la FDA, Zarxio®, filgrastim de Sandoz®, se ha anunciado que costará aproximadamente el 15 % menos que el producto innovador; sin embargo, esto podría reducirse más, ya que el mismo producto se comercializa en Europa con un descuento del 20 al 30 % [87].

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México se ha adoptado el término biocomparable para versiones subsecuentes de los medicamentos biotecnológicos, los cuales se usan en la misma indicación terapéutica una vez que la patente ha vencido.

Los medicamentos biotecnológicos presentan estructuras tridimensionales complejas, su heterogeneidad depende del proceso de producción en los cultivos celulares y además pueden producir inmunogenicidad. Es por lo anterior que los productos no podrán ser idénticos, sino similares. Ello implica que, para su registro, se requieren pruebas más sofisticadas para documentar la calidad, seguridad y eficacia que para un producto de síntesis química y por ende las agencias regulatorias han desarrollado guías para definir el tipo de pruebas a realizar.

Se estima que los países en desarrollo han aprobado 10 veces más productos biocomparables que los países desarrollados. Esta disparidad crea la necesidad de contar con políticas regulatorias objetivas para su registro en función al potencial tecnológico y económico de cada país.

En México, hasta el 2009 existía un vacío regulatorio para los medicamentos de este tipo, por lo que muchos de los biocomparables fueron registrados sin criterios específicos. Uno de estos productos es el filgrastim, del cual existen 6 productos en nuestro país, de los cuales se desconoce cuáles son sus atributos de calidad. Considerando que este producto es ampliamente utilizado en pacientes con cáncer bajo tratamiento con quimioterapia es importante garantizar que los productos cumplan con ciertos criterios que avalen su uso en la clínica.

5. HIPÓTESIS

Los productos comerciales conteniendo filgrastim presentarán diferencias en las propiedades fisicoquímicas y biológicas.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

- Determinar la biocomparabilidad a nivel fisicoquímico y biológico de 6 productos comerciales conteniendo filgrastim.

6.2. Objetivos Específicos

- Establecer la identidad fisicoquímica de filgrastim en productos comerciales del mercado nacional
- Implementar metodologías analíticas que permitan comparar la pureza de productos comerciales que contienen filgrastim
- Comparar la actividad biológica de filgrastim empleando un modelo de unión a receptor

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1. Productos bajo estudio

Para el estudio, se seleccionaron y compraron 6 marcas del mercado nacional que contienen filgrastim, los cuales se nombraron como producto 1 a 6. Se evaluaron entre uno a tres lotes de cada uno de estos medicamentos, los cuales se compararon con el medicamento de referencia Neupogen®. Cabe mencionar que dos de los tres lotes del medicamento de referencia fueron fabricados por Amgen® y uno por Roche®.

En el cuadro 6, se muestran los productos estudiados.

Cuadro 6. Productos utilizados en las pruebas de biocomparabilidad

Nombre	Dosis	Número de lotes evaluados
Neupogen®	600 y 300 µg/mL	3
Biosimilar 1	300 µg/mL	3
Biosimilar 2	300 µg/mL	3
Biosimilar 3	300 µg/mL	3
Biosimilar 4	250 µg/mL	2
Biosimilar 5	300 µg/mL	1
Biosimilar 6	300 µg/mL	1

7.2. Pruebas fisicoquímicas y biológicas

Los productos se evaluaron empleando métodos farmacopeicos [88], con algunas adecuaciones a las técnicas. Con la finalidad de complementar la información y llevar a cabo un análisis racional de los atributos críticos de la proteína, se llevaron a cabo otras pruebas, las cuales se resumen en la figura 8. Las técnicas complementarias: calorimetría diferencial de barrido, dicroísmo circular y fluorescencia se basaron en los descrito por Flores L., 2014 y Pérez V., 2014 [89,90]. El tratamiento de la muestra para la

comparación del mapa peptídico y verificación de secuencia la metodología se basó en lo indicado por la Farmacopea Europea [88]. Cada una de las pruebas se realizó por triplicado.

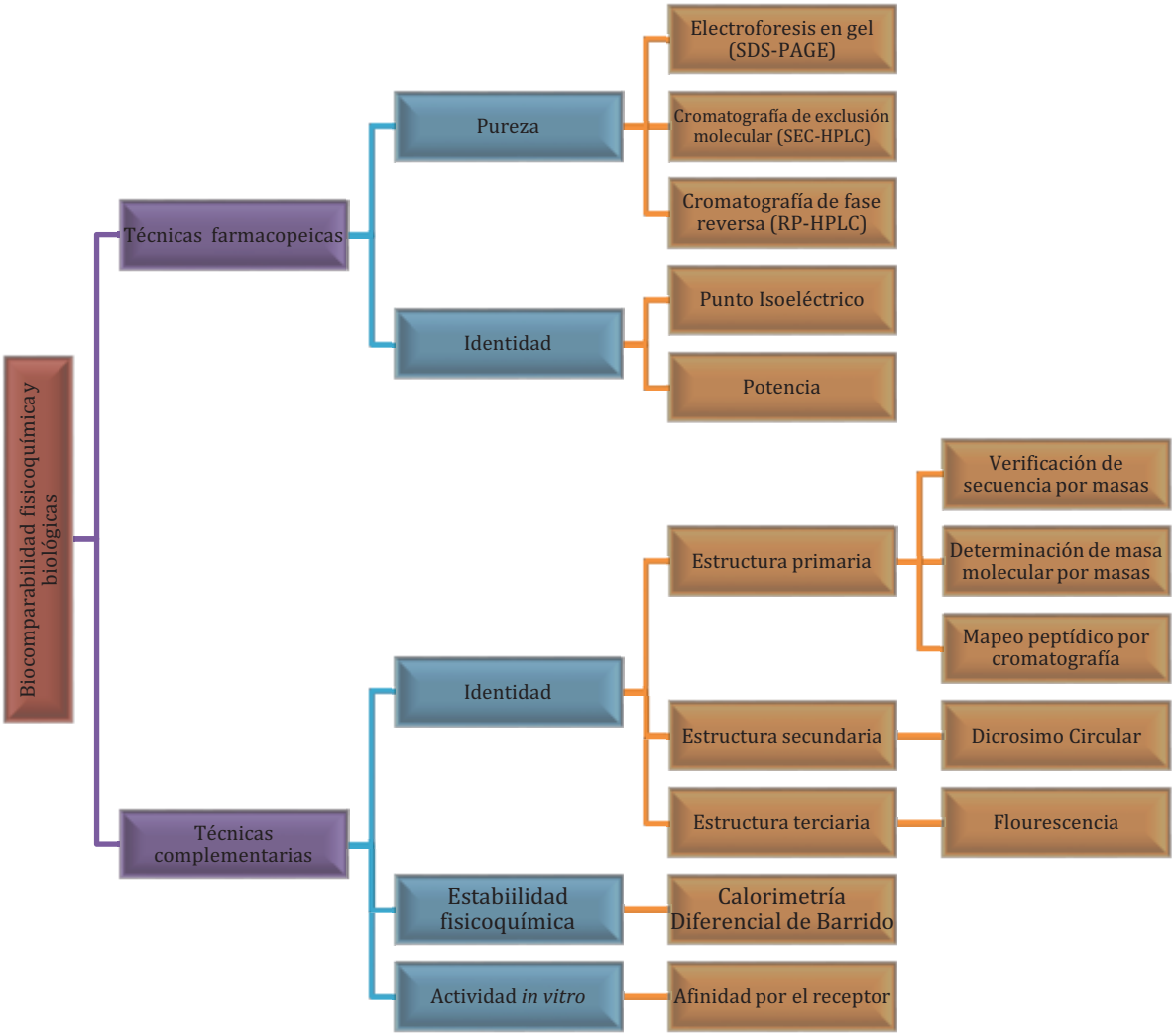


Figura 8. Técnicas utilizadas para evaluar las propiedades fisicoquímicas de productos conteniendo filgrastim

A continuación, se describe la metodología utilizada para cada una de ellas:

7.2.1. Pruebas fisicoquímicas

7.2.1.1. Pureza

7.2.1.1.1. Detección de proteínas con masa molecular diferente a filgrastim

Para ello se utilizó la técnica de SDS-PAGE. Se preparó un gel de poliacrilamida al 13 % de 7 cm x 1 mm. A partir de una concentración de 300 µg/mL se prepararon diferentes diluciones (100, 50, 10, 2 y 1 µg/mL), las cuales se procesaron bajo condiciones reductoras y no reductoras:

No reductoras: Se mezclaron volúmenes iguales de agua y solución amortiguadora, a esta solución se añadió la dilución de filgrastim correspondiente.

Reductoras: Se mezclaron volúmenes iguales de agua y solución amortiguadora concentrada conteniendo 2-mercaptoetanol como agente reductor, a esta solución se añadió la dilución de filgrastim correspondiente.

Las muestras se calentaron a ebullición durante 5 minutos y se aplicaron en el gel de acrilamida al 13 % y migraron en el gel a un voltaje inicial de 60 v durante una hora y posteriormente a 90 v hasta su total elución. Para la comparación de los pesos moleculares, se incluyó un estándar de proteínas, que cubría el rango de 10 a 250 kDa (Precision Plus STD Dual Color). Finalmente, los geles se tiñeron con plata y con azul de Coomassie.

Criterio de aceptación: Si se presentase alguna otra banda, ésta no deberá ser más intensa que la banda principal correspondiente a la concentración del 2 µg/mL de filgrastim.

7.2.1.1.2. Determinación de proteínas relacionadas

Esta técnica fue utilizada para determinar si los medicamentos presentaban proteínas relacionadas al filgrastim (formas oxidadas o desaminadas), mediante cromatografía en fase reversa. La prueba se llevó a cabo empleando una columna de fase reversa Júpiter 300, C4 (250 X 4.6 mm) y 5 µm de tamaño de partícula (Phenomenex USA) acoplada a un UPLC H-Class con un detector de diodos (Waters Corporation USA). La fase móvil consistió en agua con 0.1% de ácido trifluoroacético y acetonitrilo con 0.1% de ácido trifluoroacético, la velocidad de flujo fue de 1.0 mL/min, la detección a 214 nm y la temperatura de la columna a 50 ºC. Cada lote de medicamento se inyectó por triplicado a la concentración contenida en su presentación comercial. Se determinó el tiempo de retención de cada uno de los picos, con referencia al tiempo de retención de filgrastim, siendo la retención relativa de la forma oxidada 1 de aproximadamente 0.85 min., la forma oxidada 2 de aproximadamente 0.95 min. y las formas desaminadas de aproximadamente 1.1 min.

Criterio de aceptación: el porcentaje máximo de cualquier impureza debe ser de 2.0% y el total de impurezas debe ser menor al 3.5%.

7.2.1.1.3. Determinación de oligómeros

Para determinar el porcentaje de oligómeros que contienen los medicamentos, se llevó a cabo la técnica de cromatografía de exclusión molecular. Para ello, se empleó una concentración de 300 µg/mL, y se inyectó a una columna de exclusión molecular BEH 200 SEC (300 X 4.6 mm) 5 µm de tamaño de partícula (Waters Corporation USA)

acoplada a un UPLC Waters con un detector de fluorescencia (Waters Corporation USA). La longitud de onda de emisión fue de 335 nm y la de excitación de 286 nm. La fase móvil consistió en buffer de fosfatos 20 mM más cloruro de sodio 150 mM a un pH de 6.8 y una velocidad de flujo de 0.4 mL/min. Se determinó el tiempo de retención de cada uno de los picos, con referencia al tiempo de retención de filgrastim, siendo la retención relativa de agregados de aproximadamente 0.6, oligómero 1 de filgrastim de aproximadamente 0.75, oligómero 2 de filgrastim 0.8 y el dímero de 0.85. La prueba se llevó a cabo por triplicado.

Criterio de aceptación: El total de los picos con tiempos de retención menores al filgrastim debe ser menor al 2%.

7.2.1.2. Estructura Primaria

La estructura primaria de una proteína se refiere al orden o secuencia de aminoácidos. El análisis de esta estructura es importante para establecer que la secuencia sea correcta. La comparación de la estructura primaria entre productos permite determinar si el orden de alguno de los aminoácidos esta alterado por alguna modificación. Las técnicas analíticas utilizadas para comparar la estructura primaria del producto de referencia y los diferentes productos de prueba fueron las siguientes:

7.2.1.2.1. Determinación de masa molecular

La masa molecular se determinó mediante el análisis de proteína intacta. Para ello se empleó una concentración de 300 µg/mL y se inyectó a una columna de fase reversa Waters BEH 300 C4 (2.1 X 50 mm) y un tamaño de partícula de 1.7 µm (Waters

Corporation USA) acoplada a un detector de masas Electroespray Tiempo de Vuelo (ESI-TOF) XEVO G2 (Waters Corporation, USA).

Las condiciones cromatográficas que se utilizaron fueron: gradiente lineal de acetonitrilo con 1.0% de TFA en agua. La adquisición de los datos se llevó a cabo en un intervalo de 400-3500 m/z empleando el modo positivo y se analizaron utilizando el software BiopharmaLynx. El peso molecular de cada uno de los productos se determinó mediante el análisis de proteína intacta.

7.2.1.2.2. Mapeo peptídico

Los péptidos se generaron por digestión usando la enzima Glutamil-endopeptidasa (Glu-C, Roche SUI) que posee la propiedad de romper en el C-terminal del ácido glutámico y en los residuos de ácido aspártico. A 25 µg de filgrastim, se agregaron 25 µL de Glu-C (1 mg/mL) preparada en buffer de fosfatos. La mezcla se incubó por 18 horas a una temperatura de 37 ºC y agitada a 500 rpm. Los péptidos resultantes fueron separados por UPLC-UV, empleando una columna de fase reversa CSH 130 C18 (2.1 X 50 mm) y un tamaño de partícula de 1.7 µm (Waters Corporation USA). La fase móvil consistió en agua y acetonitrilo con 0.1% de ácido trifluoroacético mediante un gradiente lineal a una velocidad de flujo 0.2 mL/min y detección a 220 nm. La temperatura de la columna fue de 60 ºC.

Criterio de aceptación: El perfil del cromatograma obtenido con la preparación de la muestra deberá corresponder al cromatograma obtenido con la preparación de referencia.

7.2.1.2.3. Verificación de la secuencia de aminoácidos

Con los péptidos obtenidos anteriormente, se llevó a cabo la verificación de la secuencia de aminoácidos empleando el software BiopharmaLynx de Waters, donde los péptidos se caracterizan a partir de su masa molecular.

7.2.1.2.4. Determinación del punto isoeléctrico. Electroforesis capilar

Para comparar el punto isoeléctrico de los medicamentos bajo estudio (el cual está dado por el tipo de aminoácidos presentes en la proteína), las muestras se concentraron mediante ultrafiltración con membranas de 3 kDa para obtener una concentración de la proteína a 2 mg/mL y se inyectaron al equipo de electroforesis capilar con detector de diodos y UV (Beckman Coulter USA), conjuntamente con 4 proteínas con diferentes puntos isoeléctricos. El equipo se montó colocando en el anolito ácido fosfórico 200 mM y en el catolito hidróxido de sodio 300 mM. Para estabilizar el gradiente se utilizó ácido iminodiacético 200 mM y L-Arginina 500 mM. Se empleó un capilar neutro de 50 µm X 67 cm. La longitud de onda de detección fue 280 nm. El punto isoeléctrico se determinó interpolando el tiempo de retención de la muestra en la curva de calibración de las cuatro proteínas de diferentes puntos isoeléctricos.

7.2.1.3. Estructura Secundaria

7.2.1.3.1. Dicroísmo Circular

Esta técnica permite cotejar la estructura secundaria de la proteína en los medicamentos evaluados, mediante la comparación de sus espectros. Para realizar esta prueba se empleó un espectropolarímetro de dicroísmo circular J-815 (Jasco Inc, JPN). Las muestras de filgrastim se ajustaron a una concentración de 300 µg/mL. El análisis se realizó en el UV

lejano (180-260 nm) con una celda de cuarzo de 1 mm de longitud a una velocidad de 50 nm/min. Como blanco se utilizó el excipiente correspondiente, el cual se obtuvo separando a la proteína de este mediante ultrafiltración. Una vez obtenidos los espectros se compararon los perfiles de los productos de prueba con el de referencia.

7.2.1.4. Estructura terciaria

7.2.1.4.1. Fluorescencia

Para comparar la estructura terciaria de la proteína se determinó el tiempo de vida que recorre un fotón dentro de la proteína. Para que una proteína posea la capacidad de fluorescer es necesario que presente en su estructura aminoácidos aromáticos como Tirosina, Fenilalanina y el Triptófano, los cuales están presentes en la estructura de filgrastim. Para esta técnica se empleó un Fluorolog 5 spectometer system (Horiba Scientific). Inicialmente se determinó la longitud de onda de emisión y de excitación de la proteína, los valores máximos se encontraron a 355 y 285 nm, respectivamente. Bajo estas condiciones se colocaron en la celda 300 μg/mL de cada uno de los productos y se determinó el tiempo de vida. Cada lote fue evaluado por triplicado.

7.2.1.4.2. Calorimetría Diferencial de Barrido

Esta prueba se realizó con la finalidad de determinar la temperatura de transición en la cual la proteína cambia de conformación y de esta manera evaluar la estabilidad termodinámica en el excipiente que está contenida.

Para el estudio, se empleó un Nano-Calorímetro Diferencial de Barrido 6300 (TA Instruments USA). Las muestras se concentraron a 2 mg/mL mediante ultrafiltración y se

desgasificaron al vacío por 15 min. El equipo cuenta con dos celdas, en una de ellas se colocó la muestra y en la otra el buffer correspondiente. El calentamiento se llevó a cabo a una velocidad de 1 ºC/min de 10 a 100 ºC a 3 atm de presión. Las entalpías de transición se estimaron calculando el área bajo la curva de la transición térmica usando el Software Nano Analyzer.

7.2.2. Pruebas Biológicas, estudios *in vitro*

7.2.2.1. Potencia

Para evaluar la potencia de los diferentes productos se empleó una técnica *in vitro,* empleando células 32D Clone 3 ATCC® CRL-11346 *Mus musculus* bone marrow (ATCC USA). Esta clona es ampliamente utilizada como modelo *in vitro* del estudio de proliferación, diferenciación y apoptosis de células hematopoyéticas.

Para el ensayo, se colocaron 25000 células/pozo en una placa de microtitulación de 96 pozos y se incubaron durante 48 horas a 37 ºC. A cada pozo se le agregó 50 µl de medio de cultivo más 50 µl de las diluciones (100.0, 20.0, 4.0, 0.8, 0.16, 0.032 y 0.0064 ng/mL) de cada uno de los 7 medicamentos, éstas se evaluaron por triplicado. Se utilizó un control negativo con 50 µl de medio de cultivo + 50 µl de células. La placa se incubó durante 48 h a 37 ºC con una atmósfera de CO_2 al 5 %.

Después de la incubación se añadió bromodesoxiuridina (BrdU) 100 mM a cada uno de los pozos. Esta molécula que es un nucleótido sintético, es análogo de la timidina, por lo que va a sustituirla en el ADN de una célula en proliferación. La placa se incubó durante 2 h a 37 ºC con una atmósfera de CO_2 al 5%. Las placas se centrifugaron durante 10 min

a 12 000 rpm, se decantaron y lavaron. Posteriormente se secaron en una incubadora a 60 ºC durante una hora.

Las células se fijaron, con una solución de folmaldehído/paraformaldehído, se agregó una solución de 1/500 de anticuerpo anti-BrdU acoplado con peroxidasa y se incubó durante 90 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó el sustrato tetrametilbenzidina (TMB) y se incubó de 5-30 min para desarrollar el color. Finalmente, se paró la reacción con ácido sulfúrico 1 M y se leyó a 450 nm en un lector de microplacas Power Wave (BIO-TEK Instruments Inc, USA).

La potencia se determinó mediante el método de la concentración efectiva 50 (EC50 por sus siglas en inglés) de las curvas dosis respuesta obtenidas para el producto de referencia y el producto de prueba, calculadas mediante el software SoftMax®, realizando un ajuste a los cuatro parámetros sigmoidales.

7.2.2.2. Bioensayo de unión al receptor de colonias de estimulador de granulocitos (G-CSFR)

Se desarrolló un método para evaluar el porcentaje de afinidad del filgrastim al receptor para G-CSF. Las células utilizadas fueron M-NFS-60 ATCC® CRL-1838 *Mus musculus*, mouse (ATCC USA), las cuales responden a la estimulación con filgrastim, ya que poseen el receptor correspondiente. Se probaron diferentes cantidades de células por pozo, distintos tiempos de incubación, tanto para la adeherencia de las células a la placa, como para la unión de los anticuerpos hacia el antígeno. Se realizaron también diferentes ensayos para determinar la temperatura de incubación, así como la cantidad de lavados entre tratamientos. La metodología final se describe a continuación:

Se aplicó un tratamiento a la placa de ensayo de 96 pozos que consiste en la incubación

con solución de poli-lisina para que las células se adhieran fácilmente a la placa, se inocularon 120 000 células/pozo y se agregó solución de formaldehído/paraformaldehído para facilitar el fijado de las células a la placa. Posteriormente se realizó un bloqueo con suero de caballo, el cual contiene proteínas que ayudará a que no exista una unión inespecífica con la membrana de alguno de los anticuerpos que participarán. Un día después se añadieron a las células diferentes concentraciones de filgrastim en el intervalo de 0.37 a 300 µg/mL, se incubaron durante una hora, se adicionó un anticuerpo primario anti-filgrastim y se incubó durante 2 h más a 4 ºC. Se realizaron los lavados correspondientes para eliminar el anticuerpo no unido y se adicionó el anticuerpo secundario que se encuentra conjugado a peroxidasa de rábano. Una vez formado el complejo célula-filgrastim-anticuerpo primario-anticuerpo secundario, se adicionó a cada uno de los pozos el sustrato TMB (tetrametilbencidina), que al ser oxidado por la peroxidasa de rábano genera un producto de color amarillo con un máximo de absorbancia a 450 nm, directamente proporcional a la unión de filgrastim a G-CSFR, el equipo utilizado para medir a esta absorbancia fue un SpectraMax M3 plate reader (Molecular Devices).

La afinidad relativa de filgrastim a G-CSFR se determinó porcentualmente por la relación entre la concentración efectiva 50 (EC50 por sus siglas en inglés) de las curvas concentración respuesta obtenidas para la sustancia de referencia y las muestras problema, calculadas mediante el software SoftMax®, realizando un ajuste a los cuatro parámetros sigmoidales.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los medicamentos biocomparables conteniendo filgrastim, han estado disponibles por más de 6 años en nuestro país y son ampliamente utilizados. En Europa se han aprobado 4 productos con este biofármaco, los cuales han llevado a cabo todos los estudios de calidad, comparación fisicoquímica, eficacia, seguridad e inmunogenicidad con el producto innovador.

A nivel mundial, se comercializan otros productos más conteniendo filgrastim, particularmente en América del Sur, India y China. Estos medicamentos, sin embargo, no pueden ser considerados como biosimilares, ya que no fueron aprobados con los criterios rígidos que establecen agencias regulatorias como EMA, OMS y FDA.

En el caso de México, existen 6 marcas comerciales conteniendo filgrastim. Estos productos fueron registrados antes de que se publicara la Normatividad para documentar la biocomparabilidad con el producto innovador, sin embargo, han sido ampliamente utilizados en la práctica clínica para el tratamiento de la neutropenia. Es por lo anterior, que se consideró importante implementar las pruebas que permitieran comparar las propiedades fisicoquímicas y biológicas de estos productos.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos. Dado que los resultados obtenidos fueron semejantes para todos los productos, únicamente se presentan dos imágenes representativas para cada una de las pruebas realizadas.

8.1. Pruebas fisicoquímicas

8.1.1. Pureza

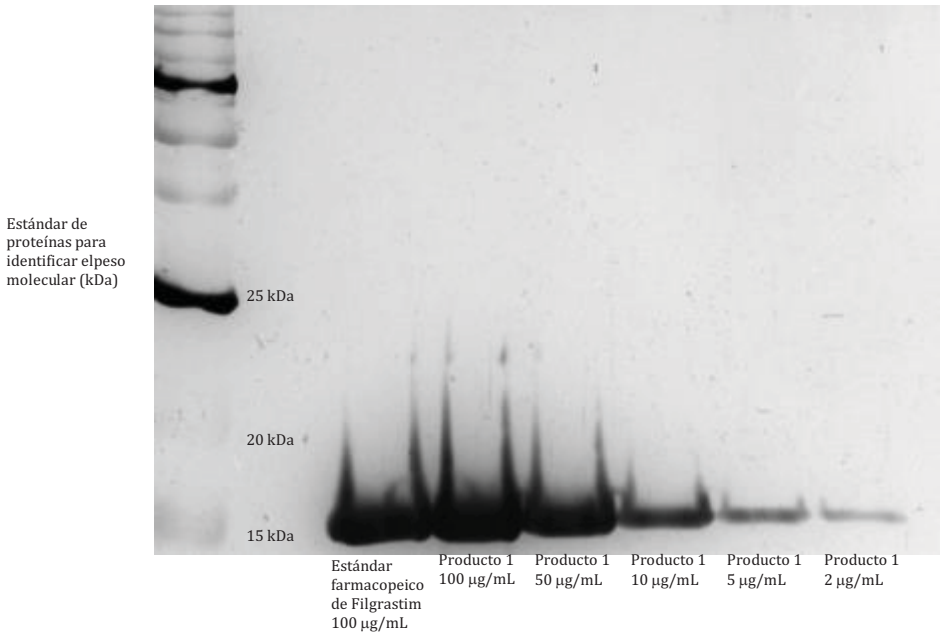
8.1.1.1. SDS-PAGE

La isoforma B de filgrastim, que es la activa, contiene 2 puentes disulfuro uno entre Cis37-Cis43 y otro entre Cis65-Cis75.

La electroforesis bajo condiciones reductoras elimina los puentes disulfuro que posee la proteína, de forma que, si existiera otra cadena proteica derivada del proceso de fabricación o de la degradación, que estuviera unida a filgrastim, ésta se separaría y podría visualizarse en el gel. Las condiciones no reductoras desnaturalizan a la proteína de manera parcial y no modifican los puentes disulfuro, lo cual permitiría visualizar si existen proteínas con diferente peso molecular. Bajo estas condiciones, se esperaba observar una sola banda correspondiente a la proteína de interés. La figura 9 muestra los resultados obtenidos para dos de los productos. Se pudo observar que en ninguno de los lotes de los medicamentos evaluados hay alguna impureza visible, de peso molecular diferente al de filgrastim (18.9 kDa). Es importante mencionar que debido a la alta concentración de filgrastim, se observan sobrecargados los carriles de proteína en el gel, lo cual dificulta llegar a una conclusión contundente. Otros autores como Shaltout E., 2014 [87] y Skrlin A., 2011 [63], no encontraron evidencia de impurezas, lo que indica que es poco común que filgrastim contenga otras proteínas de pesos moleculares mayores a ésta. Sin embargo, dado que esta es una prueba farmacopeica, sería conveniente emplear otras condiciones experimentales, tales como: a) utilizar un porcentaje más alto de acrilamida para lograr una mejor separación y b) disminuir la concentración de las muestras para evitar la saturación. Pérez N., [91] llevaron a cabo la evaluación de la pureza de productos conteniendo filgrastim, empleando acrilamida al 15 %, lo que

permitió una mayor separación de las proteínas y una mejor apreciación de las bandas (Fig.10).

A)



B)

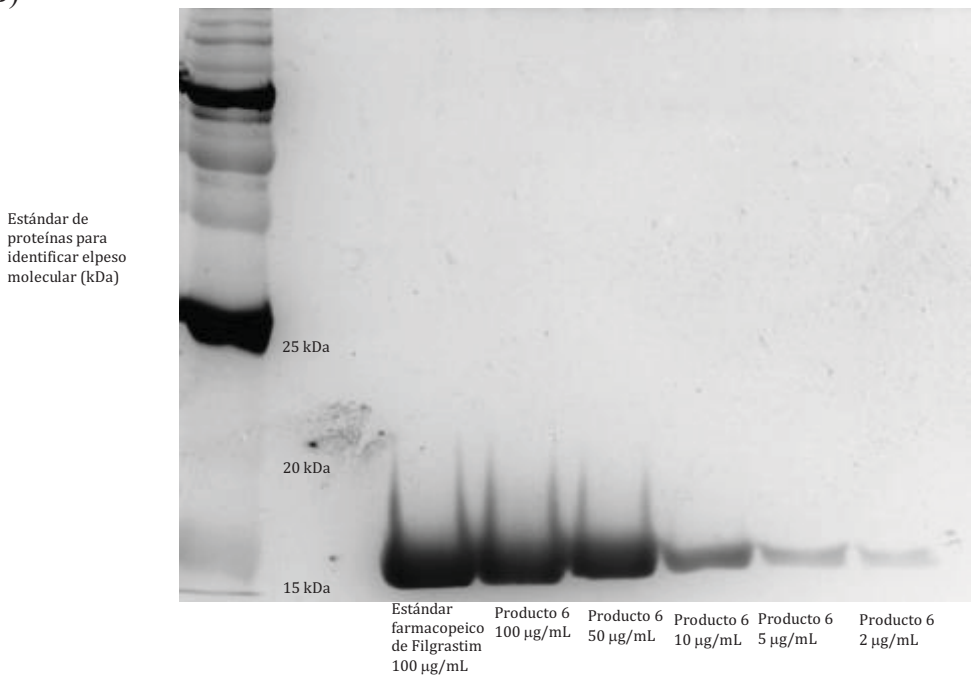


Figura 9. Gel correspondiente al producto 1 (A) y al producto 2 (B) empleando el método farmacopeico

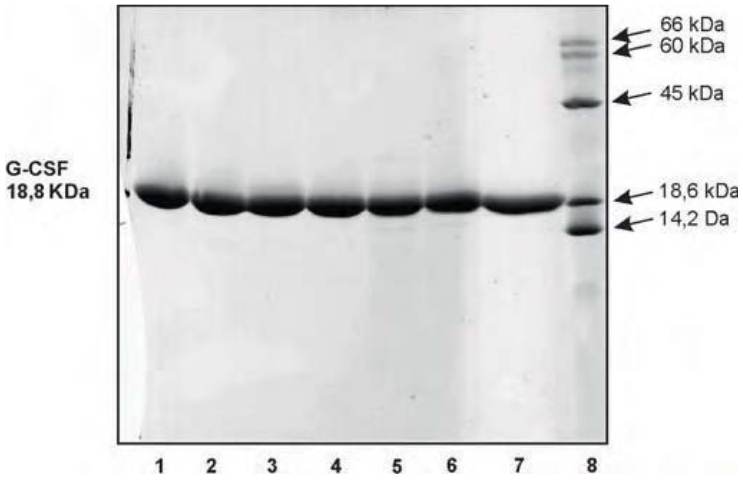


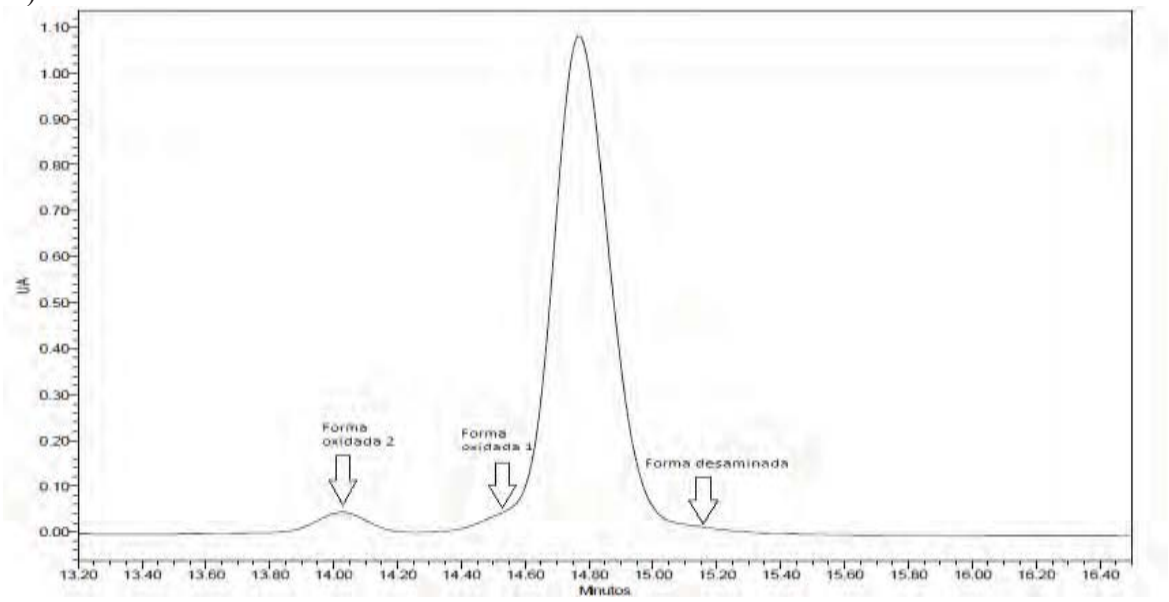
Figura 10. Electroforesis en gel para diferentes productos conteniendo filgrastim. 1 y 2: Neupogen de distintos lotes. 3-7: Diferentes lotes del producto a prueba. 8: estándar de pesos moleculares. Imagen tomada de Pérez N., 2014 [91]

8.1.1.2. Proteínas Relacionadas

Las principales impurezas encontradas en este tipo de productos, son las que corresponden a la oxidación, reducción y desaminación. Se ha reportado que estas impurezas disminuyen significativamente la actividad biológica de filgrastim [92], por lo que, pueden tener un alto impacto en la eficacia del medicamento. Una metodología que permite detectar las formas oxidadas y desaminadas contenidas en el medicamento es la cromatografía de fase reversa. En la figura 11 se muestran dos cromatogramas típicos de los resultados de esta prueba. Los porcentajes de proteínas relacionadas de cada uno de los productos, expresados en relación al área de los picos totales, se presentan en el cuadro 7. Se puede observar que los productos 1 y 5 son los que poseen la mayor cantidad de proteína oxidada, sin embargo, los valores son similares al producto de referencia Neupogen®, además de no superar los límites indicados por la farmacopea.

Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Skrlin A., 2011 [66], sin embargo, Shaltout E., 2014 [93] encontró que, dos productos adquiridos en el mercado egipcio, superaron los límites farmacopeicos especificados con valores de 7.6 ± 0.15 % y 6.9 ± 0.09 %.

A)



B)

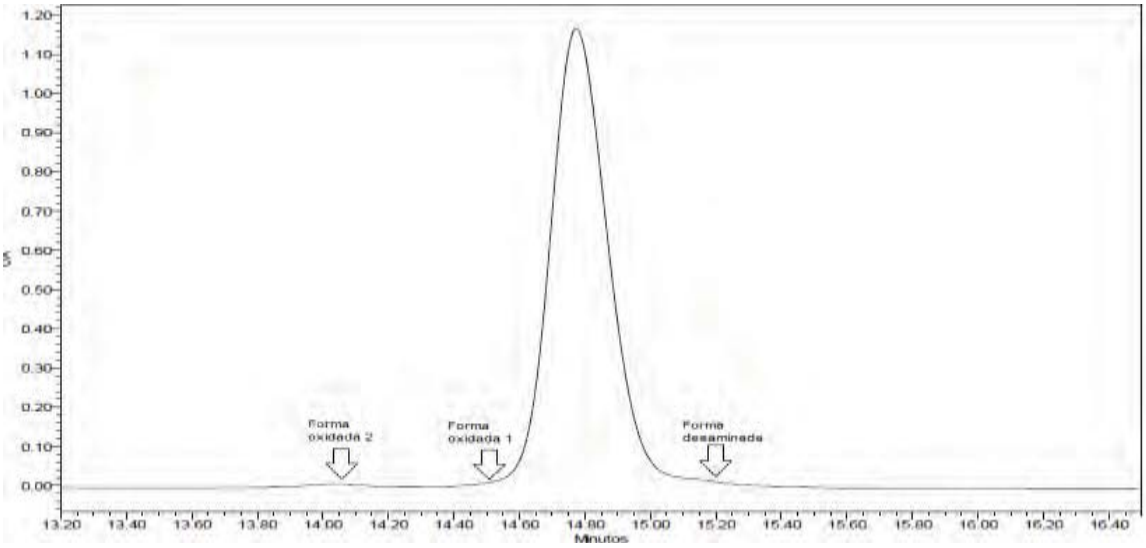


Figura 11. Determinación de proteínas relacionadas (forma oxidada 1, forma oxidada 2 y forma desaminada) contenidas en el producto 1 (A) y el producto (6), empleando cromatografía en fase reversa

Cuadro 7. Valores promedio de proteínas relacionadas, en los productos conteniendo filgrastim

Producto	% de la forma oxidada 1	% de la forma oxidada 2	% de la forma desaminada	Suma de los % de proteínas relacionadas
NEUPOGEN®	0.03 ± 0.01	0.37 ± 0.11	0.11 ± 0.09	0.51 ± 0.21
1	0.02 ± 0.01	1.38 ± 0.47	0.13 ± 0.03	1.53 ± 0.51
2	0.01 ± 0.01	0.76 ± 0.06	0.50 ±0.09	1.27 ± 0.12
3	0.03 ± 0.00	0.35 ± 0.05	0.01 ± 0.01	0.39 ± 0.05
4	0.02 ± 0.00	1.01 ± 0.01	0.16 ± 0.05	1.20 ± 0.04
5	0.02 ± 0.00	1.04 ± 0.00	0.08 ± 0.00	1.12 ± 0.00
6	0.00 ± 0.00	1.61 ± 0.00	0.11 ± 0.00	1.71 ± 0.00

Dado que, en los cromatogramas se observaron otros picos que pudieran estar asociados a otras proteínas, se decidió realizar el cálculo del porcentaje de área de cada una de ellas y hacer la sumatoria. En el cuadro 8 se presenta la suma total de proteínas relacionadas. Se puede observar que los productos 2 y 6 fueron los que presentaron un porcentaje mayor, sin embargo, para establecer cuál sería el impacto que pudieran tener estas proteínas, sobre la seguridad y eficacia del medicamento, sería necesario realizar un estudio de caracterización y evaluación biológica de las mismas.

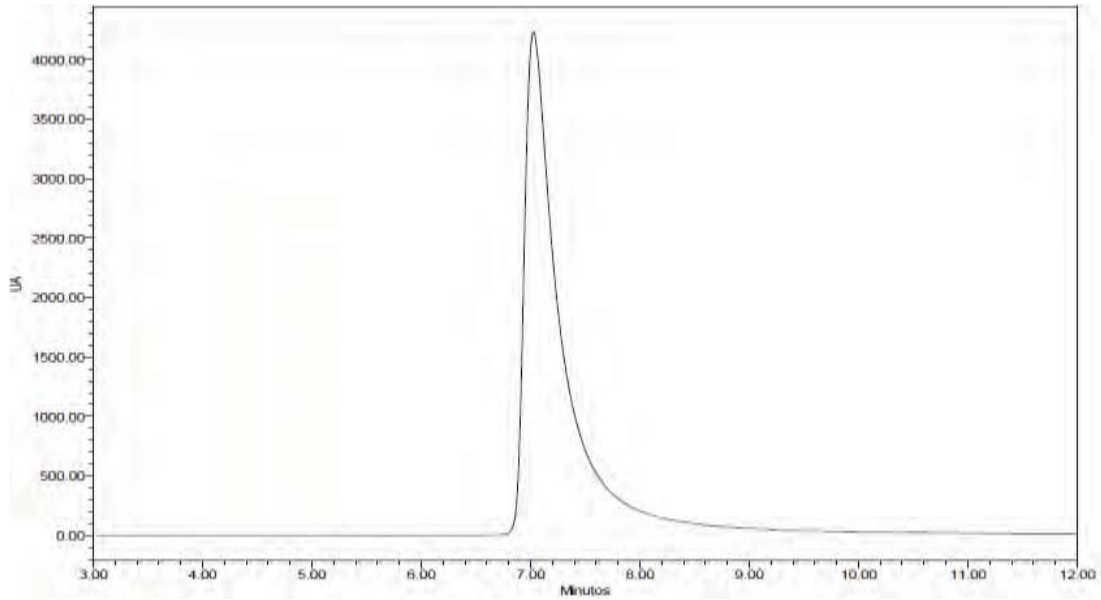
Cuadro 8. Suma total de proteínas relacionadas en los productos conteniendo filgrastim

Producto	% de proteínas relacionadas totales
Neupogen®	1.6 ± 0.19
1	2.8 ± 0.12
2	3.5 ± 0.14
3	1.0 ± 0.13
4	1.9 ± 0.19
5	1.6 ± 0.00
6	4.3 ± 1.58

8.1.1.3. Oligómeros

Durante la producción de proteínas mediante técnicas de ADN recombinante, uno de los retos es disminuir la cantidad de oligómeros presentes en el medicamento, los cuales pueden generar inmunogenicidad [19], por lo que esta prueba es un atributo crítico de calidad. En la figura 12 se pueden observar dos cromatogramas típicos obtenidos por cromatografía de exclusión molecular para los productos 1 y 6. En el cuadro 9 se presentan los valores promedio de los productos bajo estudio, en donde se puede observar que todos los productos son similares con respecto al medicamento de referencia Neupogen® además de no sobrepasar los límites indicados por la Farmacopea (2%). Los resultados confirman lo obtenido en la prueba de electroforesis SDS-PAGE (sección 8.1.1.1), demostrando que no existen proteínas con pesos moleculares mayores a filgrastim. Estudios llevados a cabo en otros países [66, 91, 93, 94] tampoco encontraron dímeros y agregados en los productos evaluados. Esta ausencia de oligómeros podría estar relacionada con la baja inmunogenicidad reportada para filgrastim.

A)



B)

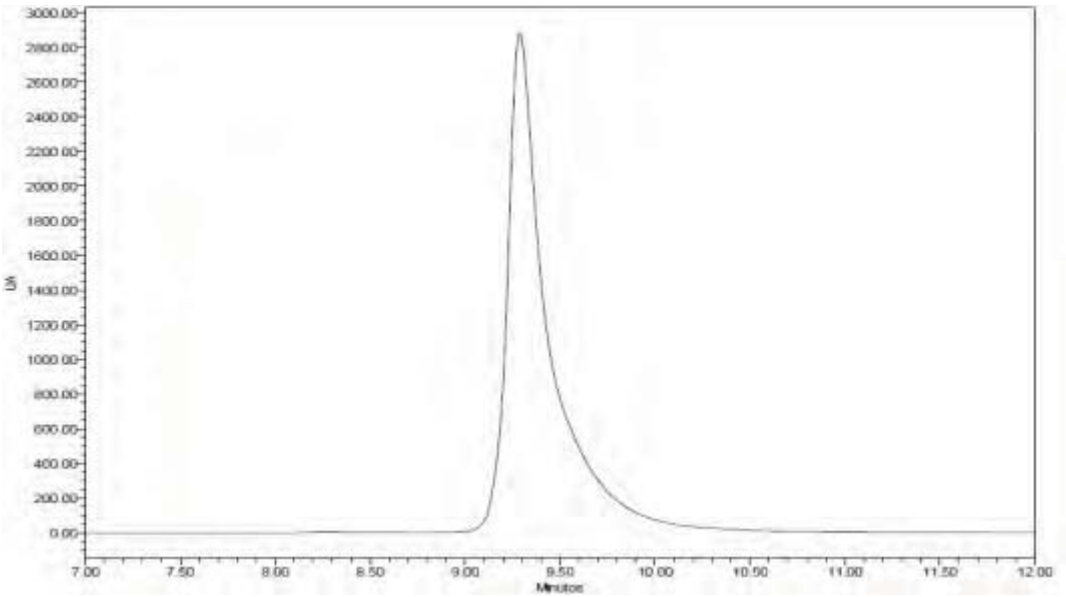


Figura 12. Cromatografía de exclusión molecular para la determinación de oligómeros en el producto 1 (A) y el producto 6 (B)

Cuadro 9. Valores promedio de formas truncas y oligómeros de los productos bajo estudio

Producto	% promedio de agregados
Neupogen®	0.0 ± 0.00
1	0.0 ± 0.00
2	0.3 ± 0.05
3	0.5 ± 0.13
4	0.9 ± 0.60
5	0.1 ± 0.01
6	0.4 ± 0.37

8.1.2. Estudios de Identidad

8.1.2.1. Estructura primaria

8.1.2.1.1. Determinación de la masa molecular por Masas (ESI-TOF)

Este análisis proporciona certeza de la masa molecular de la proteína en los productos evaluados. El equipo ESI-TOF de Waters Corporation emite datos con una exactitud mayor a 1 ppm, por lo que, aportan datos muy cercanos al valor real de la masa molecular de la proteína evaluada. Diferencias sustanciales en la masa molecular de la podrían ser un indicativo tanto de cambios en la secuencia de aminoácidos, así como de la ausencia o integración de otros aminoácidos. Los resultados obtenidos para los diferentes productos se muestran en el cuadro 10. Se encontraron diferencias de un máximo 2 décimas, lo cual indica que la masa molecular de todos los productos es similar al de Neupogen®.

Cuadro 10. Valores de peso molecular de los productos bajo estudio conteniendo filgrastim

Producto	Masa molecular (Da)
Neupogen®	18798.2 ± 0.16
1	18798.2 ± 0.04
2	18798.7 ± 0.03
3	18798.6 ± 0.02
4	18798.3 ± 0.03
5	18798.2 ± 0.00
6	18798.3 ± 0.35

Los pocos estudios que han reportado esta prueba [68,91] mostraron también que los

valores fueron muy similares al medicamento de referencia Neupogen®. Sin embargo, para verificar que la secuencia de éstos sea la correcta, fue necesario llevar a cabo el mapeo peptídico y la verificación de la secuencia de aminoácidos.

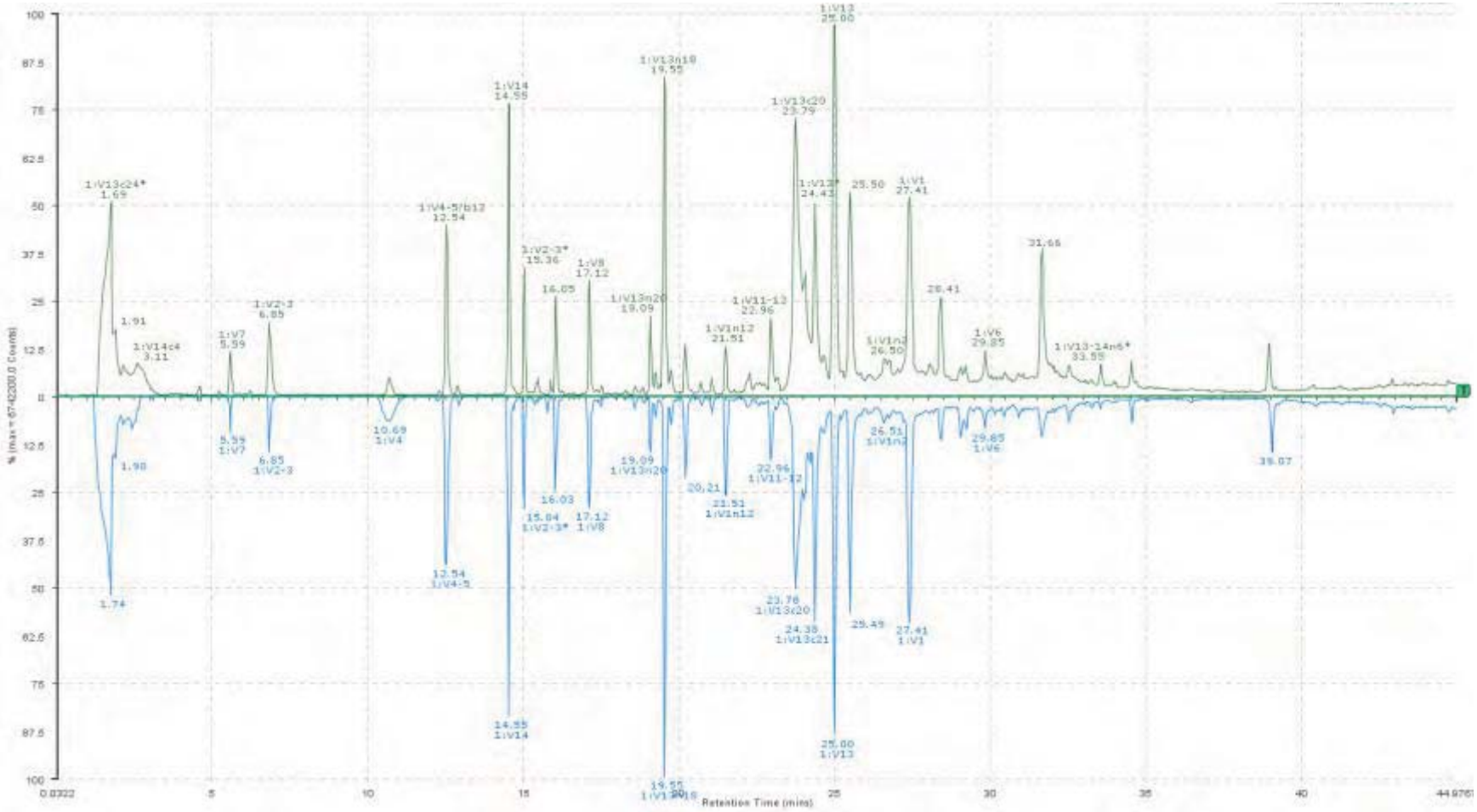
8.1.2.1.2. Mapeo peptídico

En la figura 13 se presentan dos cromatogramas típicos de los resultados de mapeo peptídico. Para poder realizar una mejor comparación entre los perfiles, los cromatogramas se presentan en forma de espejo; en la parte superior los productos 1 y 6 (A y B, respectivamente) y en la parte inferior el producto de referencia. Aun cuando se presentaron algunas diferencias en la abundancia de los picos, ello podría estar asociado a diferentes factores relacionados con el equipo o al proceso de digestión enzimática y no a diferencias entre productos. Para disminuir esta variabilidad, sería conveniente emplear la misma marca y lote de enzima durante todo el estudio.

Los resultados de la prueba mostraron que no existen diferencias de los productos bajo estudio con respecto a la referencia, lo cual indica que la secuencia de aminoácidos es similar con respecto a la de Neupogen®.

Los resultados que se han publicado por otros autores, de igual forma, no muestran diferencias sustanciales entre los cromatogramas obtenidos [63,86,91].

A)


1:V13c24*
1.69
1.91
1:V14c4
3.11
1:V7
5.59
1:V2-3
6.85
1:V4-5/b12
12.54
1:V14
14.55
1:V2-3*
15.36
16.05
1:V8
17.12
1:V13n20
19.09
1:V13n19
19.55
1:V11-12
22.96
1:V1n12
21.51
1:V13c20
23.79
1:V12
25.00
1:V13*
24.43
25.50
1:V1n2
26.50
1:V1
27.41
28.41
1:V6
29.85
31.66
1:V13-14n6*
33.55
39.07
10.69
1:V4
1.98
1.74
5.59
1:V7
6.85
1:V2-3
12.54
1:V4-5
14.55
1:V14
15.84
1:V2-3*
16.03
17.12
1:V8
19.09
1:V13n20
20.21
21.51
1:V1n12
22.96
1:V11-12
23.78
1:V13c20
24.38
1:V13c21
25.00
1:V13
25.49
26.51
1:V1n2
27.41
1:V1
29.85
1:V6
Retention Time (mins)

B)

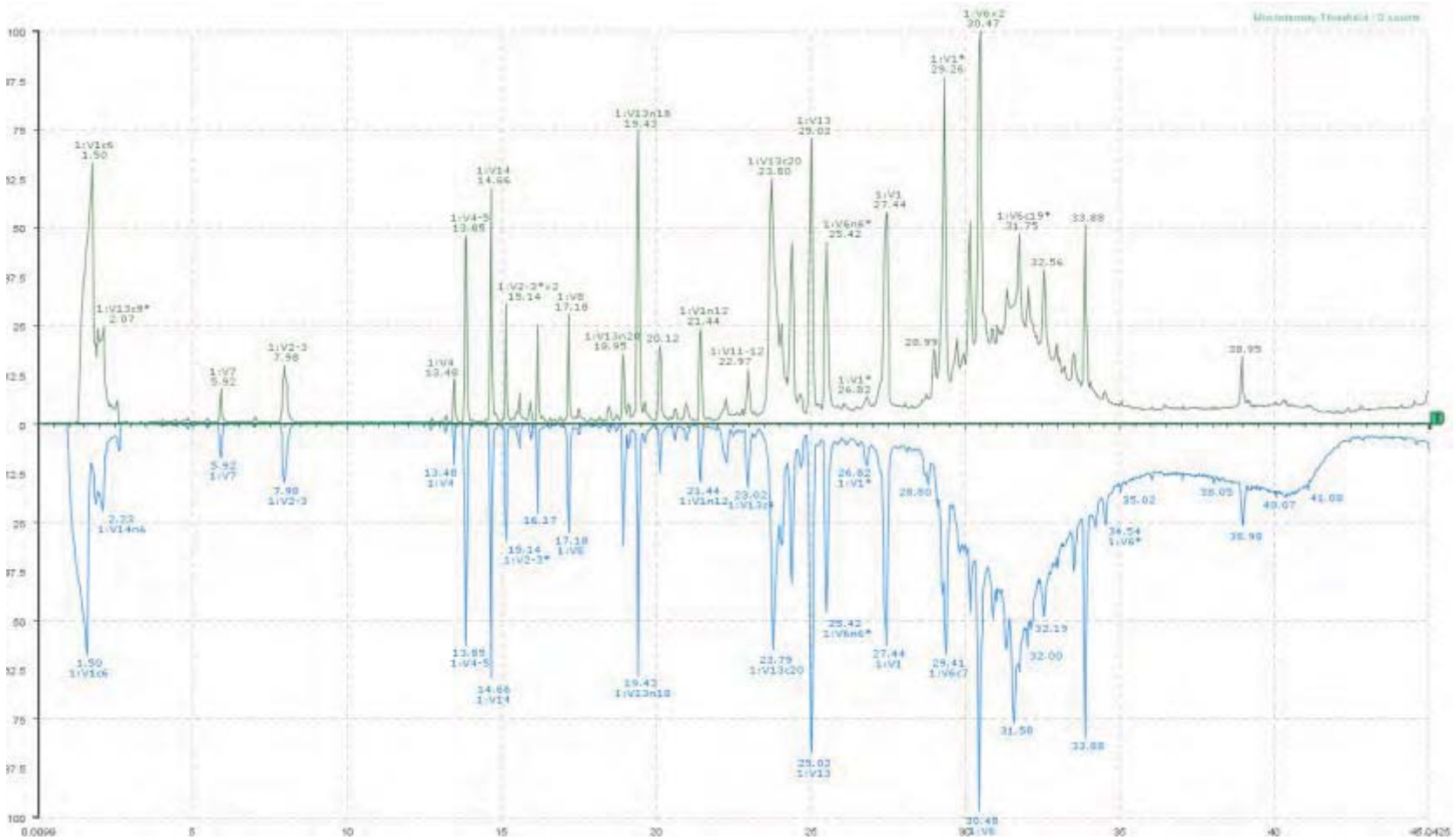
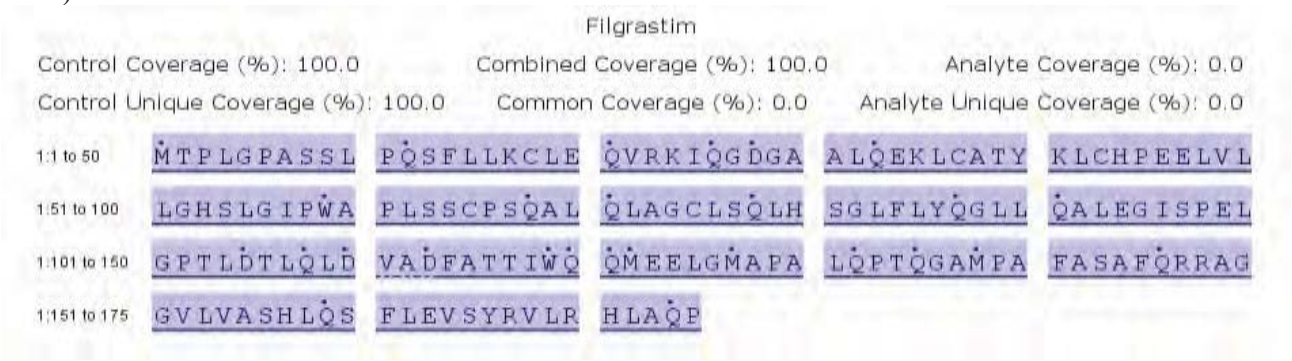


Figura 13. Mapeo peptídico de filgrastim. En la parte superior el producto 1 y 6 (A y B respectivamente) y en la parte inferior Neupogen®

8.1.2.1.3. Verificación de la secuencia de aminoácidos

La verificación de la secuencia de aminoácidos es una prueba crucial ya que un cambio en la estructura primaria puede modificar la estructura secundaria y/o terciaria de la proteína, lo que podría influir en la seguridad, eficacia e inmunogenicidad. En la figura 14 se presentan los ejemplos de la verificación de secuencia para los productos 1 y 6, empleando el software BiopharmaLinx. El cuadro 11 muestra el porcentaje de cobertura en la secuencia de aminoácidos de todos los productos. Se observa que los valores de fueron mayores al 93.00% con respecto a la secuencia teórica. Dado que para esta prueba se considera que un 90 % de cobertura es adecuado, los resultados muestran que los productos bajo estudio presentan una alta similitud con respecto al producto de referencia Naupogen® y a la secuencia teórica de filgrastim. Las diferencias entre los porcentajes podrían deberse a las condiciones de digestión, ya que las proteínas fueron digeridas con diferentes lotes de la enzima. Es importante mencionar, que ninguno de estos reportes de la literatura presenta el porcentaje de cobertura de sus resultados, únicamente mencionan que la secuencia corresponde a la de filgrastim.

A)



B)

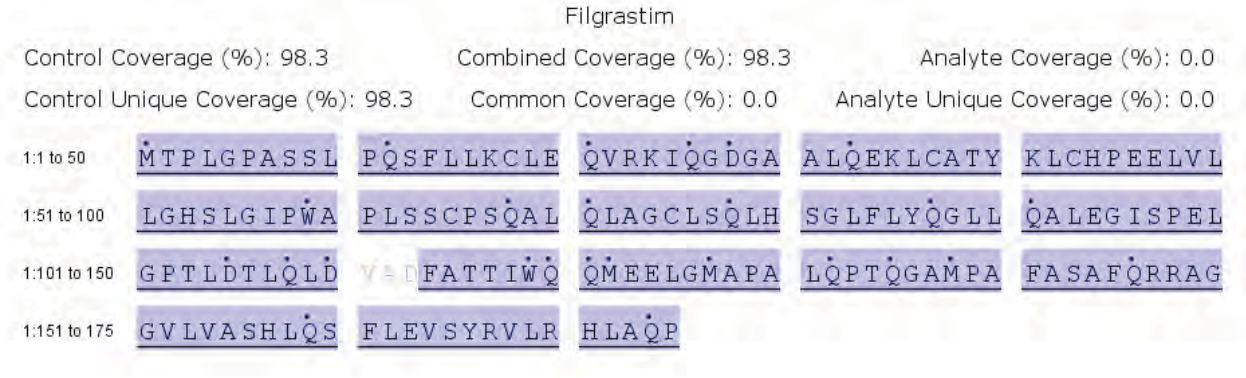


Figura 14. Verificación de la secuencia de aminoácidos para uno de los lotes del producto 1 (A) el cual presenta un 100 % de cobertura con respecto a la secuencia teórica y para uno de los lotes del producto 6 (B) el cual posee un 98.3 % de cobertura en la secuencia

Cuadro 11. Porcentaje de cobertura de secuencia de aminoácidos de los productos conteniendo filgrastim

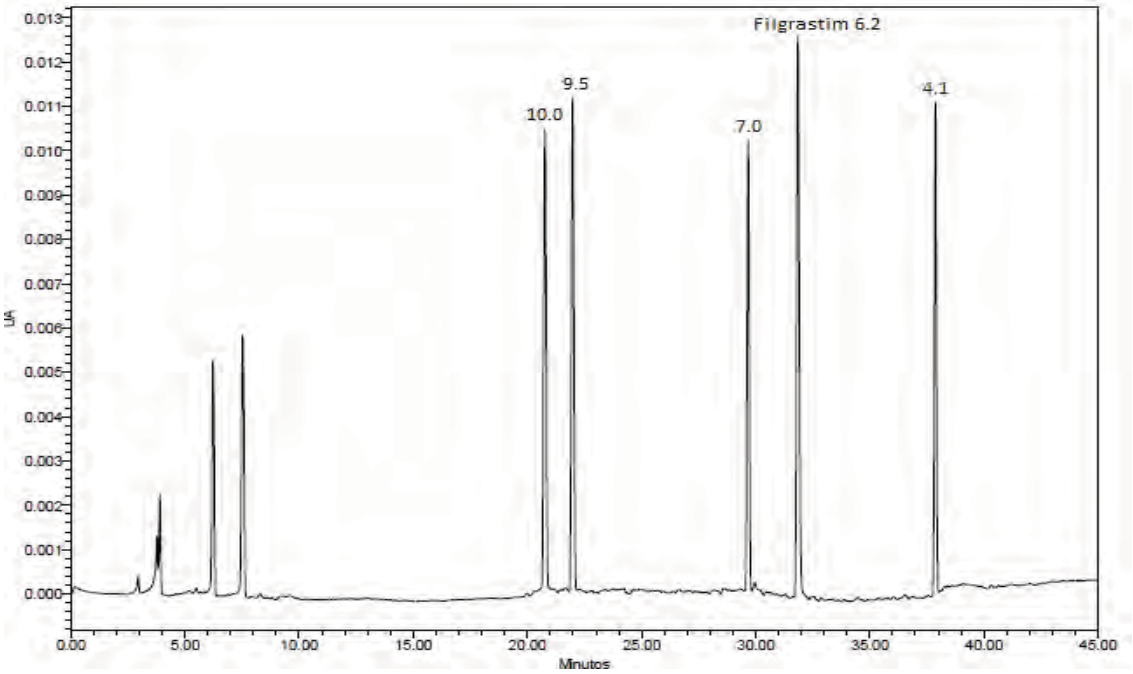
Producto	Porcentaje de cobertura ± DS
Neupogen®	98.3 ± 0.00
1	98.9 ± 0.98
2	99.4 ± 0.98
3	98.9 ± 0.00
4	93.0 ± 10.74
5	98.3 ± 0.00
6	98.3 ± 0.00

8.1.2.1.4. Punto isoeléctrico

Esta técnica se empleó de manera ortogonal, para verificar la estructura primaria de los productos ya que un cambio en el punto isoeléctrico podría estar relacionado con una modificación en la secuencia de aminoácidos. En la figura 15 se presentan los electroferogramas correspondientes a los productos 1 y 6, (A y B respectivamente). Se muestran los puntos isoeléctricos de las proteínas utilizadas en la curva de calibración (10, 9.5, 7 y 4.1) y el obtenido para filgrastim. Los valores obtenidos para cada uno de los productos, se presentan en el cuadro 12. Se puede observar que el punto isoeléctrico de cada uno de ellos es semejante al valor teórico (6.1), por lo que se cumple con el criterio de similitud con el producto de referencia.

En la bibliografía consultada, la mayoría de los autores llevan a cabo la determinación del punto isoeléctrico mediante electroisoenfoque en gel. La técnica de electroforesis capilar empleada en el presente trabajo aporta más información que la evaluación mediante geles, ya que posee una mayor sensibilidad y permite identificar impurezas de carga diferentes a filgrastim [93].

A)



B)

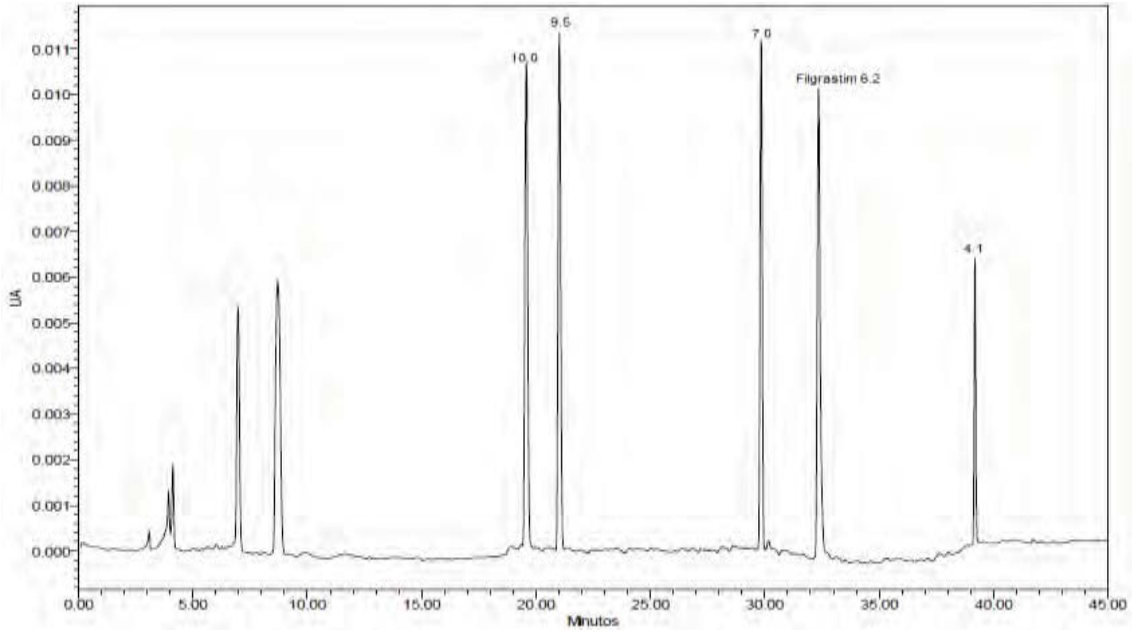


Figura 15. Electroferogramas correspondientes al producto 1 (A) y al producto 6 (B). El punto isoeléctrico de 6.2, corresponde a filgrastim

Cuadro 12. Resultados de punto isoeléctrico de los productos bajo estudio conteniendo filgrastim

Producto	Punto isoeléctrico
Neupogen®	6.2 ± 0.02
1	6.2 ± 0.01
2	6.2 ± 0.01
3	6.2 ± 0.01
4	6.2 ± 0.03
5	6.2 ± 0.00
6	6.2 ± 0.01

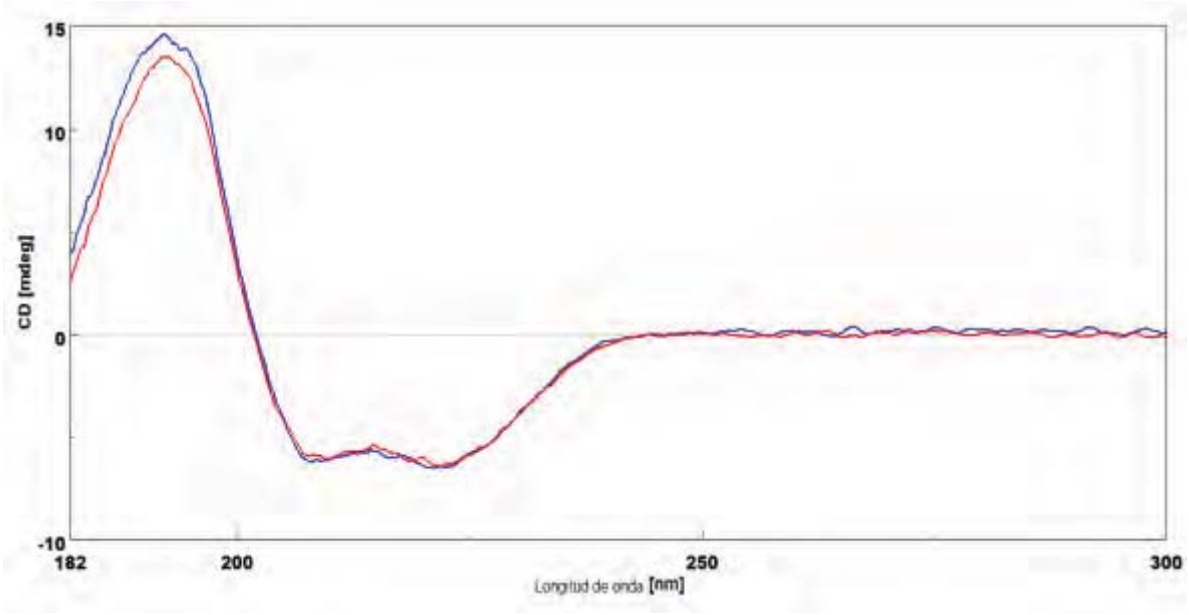
8.1.2.2. Estructura secundaria

8.1.2.2.1. Dicroísmo Circular

La estructura secundaria de la proteína, es la forma en la que se pliegan las proteínas mediante puentes de hidrógeno que se forman entre los grupos –CO- y –NH- del enlace peptídico, e indica las cadenas alfa o beta que posee la molécula. De esta forma, la cadena de aminoácidos es capaz de adoptar una conformación más estable al contener menor energía libre. La figura 16 muestra los espectros obtenidos para los productos 1 y 6, respectivamente, empleando la técnica de dicroísmo circular. Se sabe que la estructura secundaria de filgrastim está formada por 4 hélices alfa dispuestas de forma antiparalela [95], el resto de la proteína también es helicoidal, lo cual coincide con los espectros obtenidos donde se observa una respuesta típica para alfa hélice. Se encontró que todos los medicamentos presentaron el mismo perfil que el producto de referencia, lo cual indica que la estructura secundaria es similar.

Los resultados concuerdan con los obtenidos por Levi M., 2013 [96], cuyo espectro se presenta en la figura 17.

A)



B)

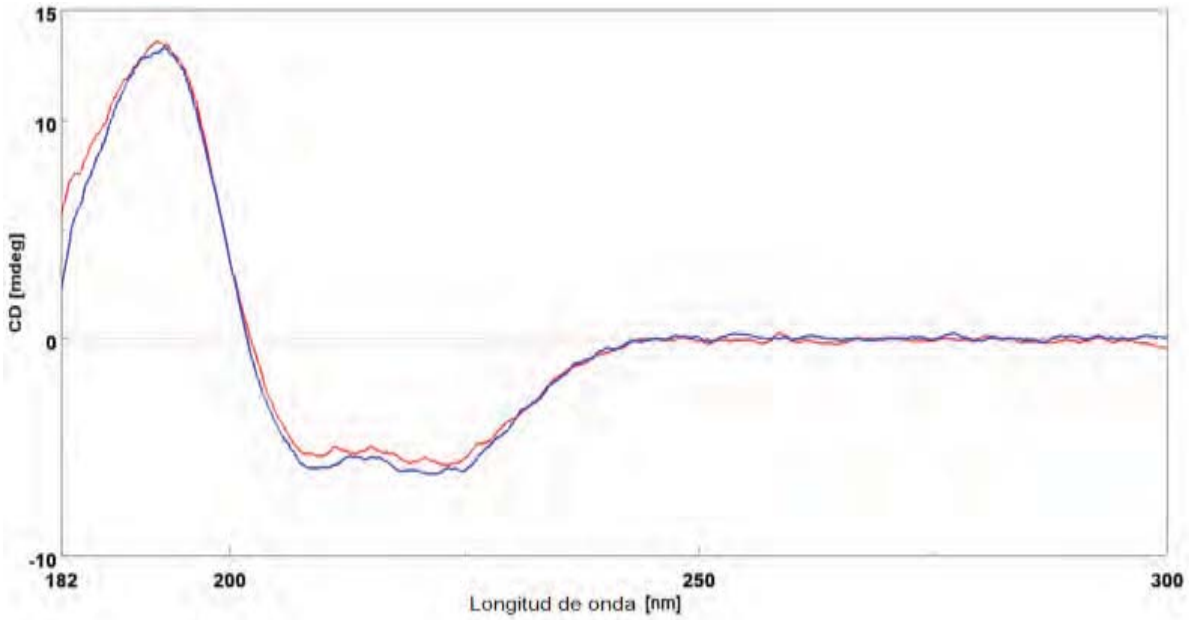


Figura 16. Espectro de dicroísmo circular de Neupogen®, en rojo y el producto 1 (A) y el producto 6 (B) en azul

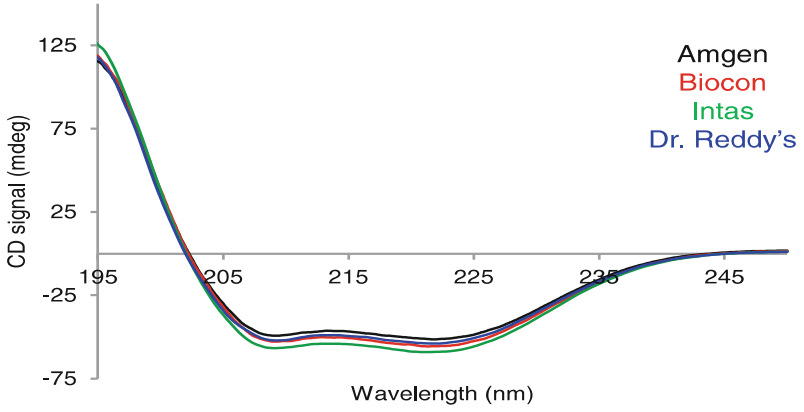


Figura 17. Espectro de Dicroísmo Circular para diferentes productos conteniendo filgrastim. Tomado de Levi M., 2013 [96]

8.1.2.3. Comparación de la estructura terciaria

8.1.2.3.1. Fluorescencia

La estructura terciaria de la proteína se refiere a la disposición espacial de los grupos funcionales, éstos son los que establecerán interacciones con el receptor para ejercer el efecto farmacológico.

La espectroscopia de fluorescencia toma como base la capacidad que tienen las moléculas de absorber luz (fotones) a una determinada longitud de onda, dentro del intervalo espectral UV-Vis, mediante una longitud de onda de excitación (λ ex) y posteriormente emitir a una mayor longitud de onda, denominada longitud de emisión (λ em). Este proceso de absorción-emisión de luz conlleva la promoción de un electrón desde su estado basal, previo a la absorción de la luz, hasta un estado excitado, para después emitir un fotón de menor energía al regresar a su estado basal (emisión).

El proceso de fluorescencia se lleva a cabo en un tiempo definido, que depende de la estructura tridimensional de una proteína, o de la disposición espacial de los aminoácidos susceptibles a fluorescer a una determinada longitud de onda, (tirosina, triptófano y fenilalanina). Mientras mayor o menor sea la exposición y flexibilidad de la región en que se encuentran dichos aminoácidos, mayor o menor será el tiempo de vida de la fluorescencia. Diferencias en el tiempo de vida, podrían estar relacionadas tanto con diferencias estructurales, como en la desnaturalización de la molécula, ya que ésta podría aumentar el tiempo de vida. Los resultados de este análisis se presentan en el cuadro 13 y en la figura 18, la comparación gráfica de estos. No se encontraron diferencias importantes entre los productos de prueba y el de referencia, Neupogen®. El producto 2, fue el que presentó un menor tiempo de vida, sin embargo, la diferencia fue del 6.86 % en relación al producto de referencia. Ello indica que la estructura terciaria de los productos bajo estudio es semejante en todos los casos.

Cuadro 13. Valores promedio de tiempo de vida de los medicamentos conteniendo filgrastim

Producto	Vida media (s)
Neupogen®	3.35E-09 ± 1.4E-11
1	3.14E-09 ± 1.1E-10
2	3.12E-09 ± 1.31E-10
3	3.24E-09 ± 1.1E-11
4	3.39E-09 ± 5.2E-13
5	3.36E-09 ± 0.0
6	3.19E-09 ± 7.9E-11

Figura 18. Tiempo de vida obtenido por fluorescencia de los productos bajo estudio

Para determinar la estructura terciaria de las proteínas, se cuenta con técnicas robustas como son, la resonancia magnética nuclear y la cristalografía, sin embargo, en nuestro país existen pocos grupos de trabajo que lleven a cabo este tipo de estudios y se requiere de personal altamente capacitado para la interpretación de los resultados. Sería conveniente fomentar estudios de colaboración que permitieran aportar mayor información acerca de la comparabilidad de los medicamentos biotecnológicos, particularmente para aquellos biofármacos con estructuras más complicadas como son los anticuerpos monoclonales.

8.1.2.3.2. Calorimetría diferencial de barrido

La estructura de las proteínas está estabilizada por diferentes tipos de enlaces como enlaces covalentes, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas o las fuerzas de Van

der Waals. Estas fuerzas determinan también su estabilidad termodinámica en un determinado medio (pH, fuerza iónica, osmolaridad, etc.).

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica que se usa para caracterizar la estabilidad de una proteína en su forma nativa, al ser sometida a cambios de temperatura a cierta velocidad. La técnica se basa en el calentamiento lento de la proteína y su matriz; de modo tal que cuando se excede un valor crítico de temperatura, la proteína se desnaturaliza presentando diferencias en energía entre el estado nativo y el desnaturalizado. Estas diferencias en energía se distinguen de cualesquiera transiciones energéticas de la matriz, con lo cual es posible medir entalpías y temperaturas de transición características. Así, un cambio sustancial en la temperatura de transición podría indicar una menor estabilidad debida a un cambio conformacional de la proteína dentro del excipiente correspondiente. En la figura 19 se muestra un espectro típico de temperatura de transición para el producto 2 en comparación con el producto de referencia. Los resultados que se presentan en el cuadro 14 muestran que, la temperatura de transición de todos los productos, fue similar al medicamento de referencia, lo cual se refleja también en la entalpía de transición del estado nativo al desnaturalizado. Cabe mencionar que este es el primer trabajo que reporta esta técnica para evaluar la estabilidad termodinámica de filgrastim. Dado que la metodología es sencilla y que el equipo es de fácil acceso, esta prueba podría ser complementaria para el estudio de comparabilidad de productos biotecnológicos.

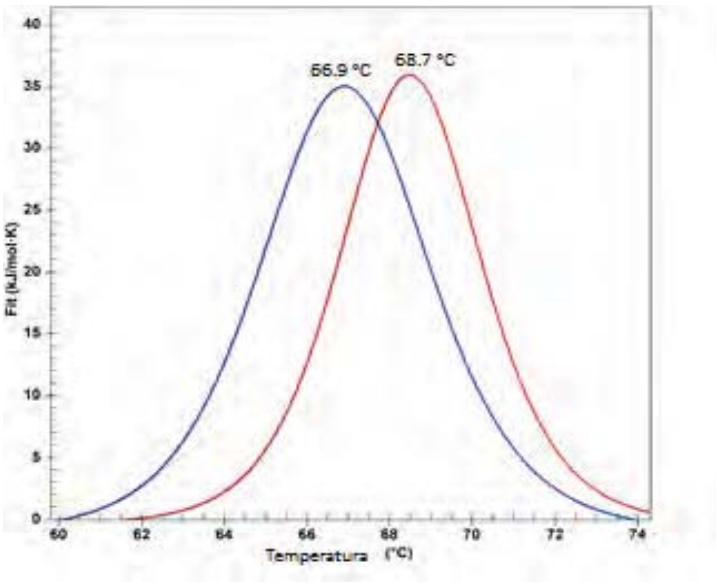


Figura 19. Temperatura de transición para el Producto 2, en rojo se observa Neupogen® y en azul el producto 1

Cuadro 14. Temperatura y entalpía de transición para cada producto evaluado

Producto	Temperatura de Transición (ºC)	Entalpía de transición (kJ/mol)
Neupogen®	68.1 ± 0.95	1002.5 ± 66.34
1	66.9 ± 0.89	1110.4 ± 94.32
2	66.8 ± 0.63	1000.7 ± 101.38
3	67.4 ± 0.12	925.6 ± 6.20
4	68.9 ± 2.21	939.9 ± 95.62
5	67.7 ± 0.00	851.8 ± 0.00
6	66.3 ± 4.19	962.2 ± 167.32

8.2. Actividad Biológica

8.2.1. Potencia

La potencia es la evaluación cuantitativa *in vitro* de la actividad farmacológica del medicamento, es un atributo crítico de calidad, complementa la caracterización

fisicoquímica y puede tener un alto impacto en la seguridad y eficacia del medicamento. Los resultados obtenidos, que se presentan en el cuadro 16, muestran que todos los productos cumplen con el valor de potencia con respecto al producto de referencia (80-125%). En este estudio el producto 5 presentó la potencia más baja.

Cuadro 15. Resultados de la potencia relativa *in vitro* para filgrastim

Producto	UI/mL	% De potencia relativa	Intervalo de confianza (±)
Neupogen®	NA	NA	NA
1	2.85×10^7	92.7	2.58
2	2.74×10^7	91.0	0.00
3	5.26×10^7	88.0	0.00
4	2.77×10^7	92.3	4.24
5	2.56×10^7	85.0	0.00
6	2.95×10^7	98.5	3.16

NA: No aplica
UI: Unidades Internacionales

8.2.2. Unión al receptor

Para complementar el estudio de potencia, se llevó a cabo la evaluación comparativa de la actividad biológica, mediante el estudio de unión a receptor. En el presente estudio se evaluaron 3 lotes tanto del producto de referencia como del producto 1, mientras que para los otros productos solamente se evaluó un lote. En el caso del producto 3, no se contó con la cantidad suficiente para realizar la prueba. La figura 20 muestra la gráfica típica de logaritmo de la concentración-respuesta de 2 de los productos bajo estudio. En el cuadro 16 se presentan los resultados de los diferentes productos. Se puede observar que los productos 4 y 5 presentaron una afinidad muy baja en relación al producto de referencia.

Al comparar los datos de afinidad con los de potencia, se encontró que, el producto 5 presentó la menor potencia y una baja afinidad. En el caso del producto 4, aun cuando cumplió con la prueba de potencia, su afinidad fue la más baja, lo cual sugiere que es necesario realizar otro tipo de estudios para avalar su eficacia y seguridad.

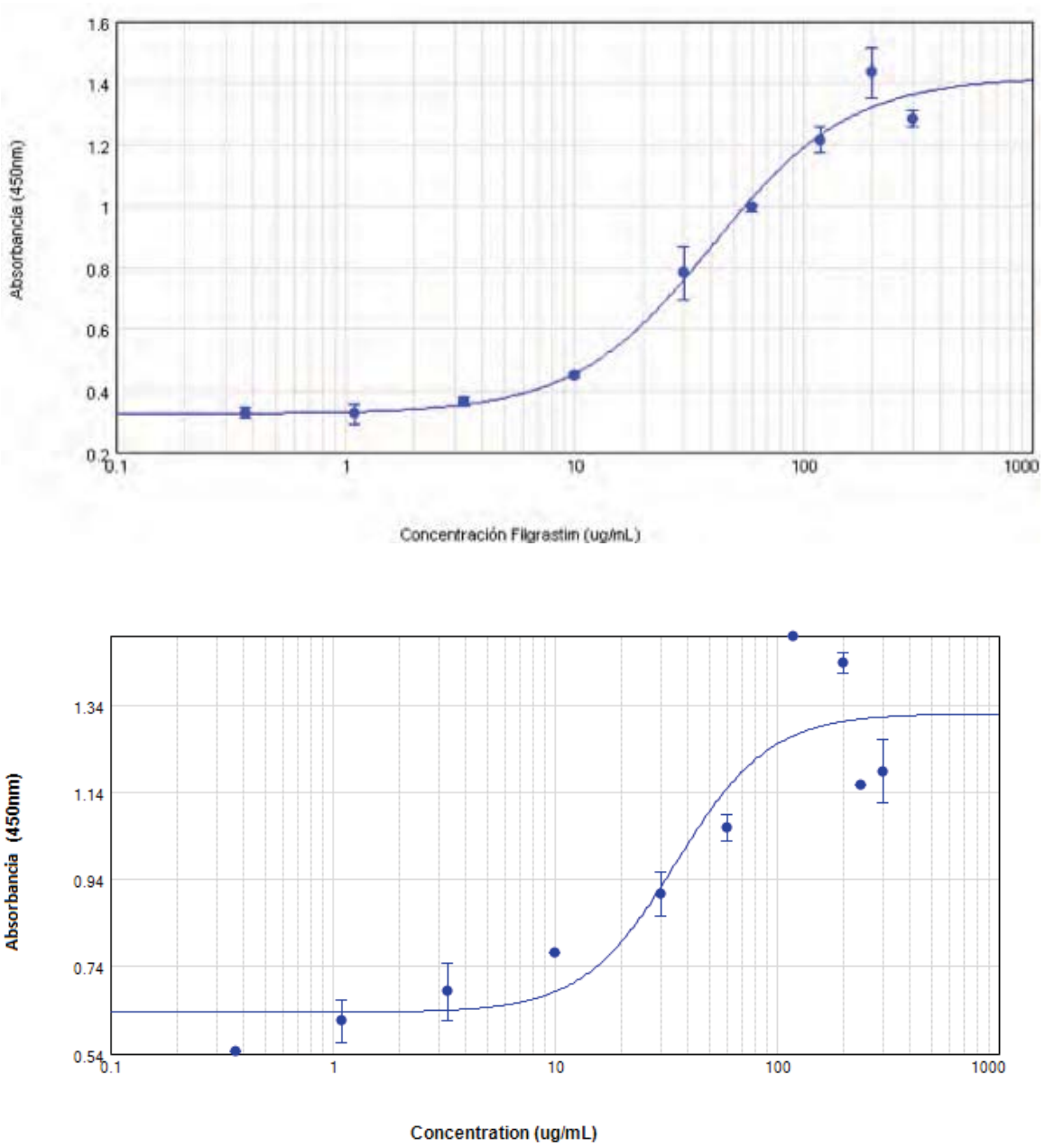


Figura 20. Curvas de unión a receptor para los productos 1 (superior) y 6 (inferior)

Cuadro 16. Porcentaje de afinidad relativa el receptor de filgrastim

Producto	CE50 (µg/mL)	% Afinidad	Intervalo de confianza (±)
Neupogen®	42.78	98.9	19.95
1	40.41	105.6	32.19
2	42.44	99.9	0.00
3	ND	ND	ND
4	66.25	63.5	0.00
5	56.10	73.8	0.00
6	34.99	118.2	0.00

ND: No determinado

8.3. Discusión global de resultados

El filgrastim es una molécula pequeña y no tan compleja en comparación con otros productos de origen biotecnológico, por lo que el proceso de producción es más sencillo y posee mayor probabilidad de éxito. En el cuadro 17 se presentan los parámetros críticos de calidad del filgrastim y su impacto en la eficacia, seguridad e inmunogenicidad [97].

Cuadro 17. Parámetros críticos de calidad para compuestos conteniendo filgrastim y su impacto en la seguridad y eficacia

Atributo de calidad	Nivel crítico	Relevante en
Secuencia de aminoácidos	Muy alta	Eficacia, seguridad, inmunogenicidad
Potencia	Muy alta	Eficacia, seguridad
Unión a receptor	Muy alta	Eficacia, seguridad
Concentración de proteínas	Muy alta	Eficacia
Estructura secundaria y terciaria	Alta	Eficacia, inmunogenicidad

Continuación cuadro 17. Parámetros críticos de calidad para compuestos conteniendo filgrastim y su impacto en la seguridad y eficacia

Atributo de calidad	Nivel crítico	Relevante en
Variantes de alto peso molecular	Alta	Inmunogenicidad
Variantes oxidadas	Alta	Eficacia

En el presente trabajo se emplearon diferentes técnicas para evaluar los atributos de calidad y por ende la biocomparabilidad de los 6 productos conteniendo filgrastim, empleando técnicas novedosas. En los cuadros 18 y 19 se resumen los resultados de las pruebas realizadas. En ella se puede observar que no existen diferencias importantes a nivel fisicoquímico, entre los productos de prueba con el producto de referencia Neupogen®. En el caso de la prueba de unión al receptor, dos de los productos presentaron una baja afinidad. Considerando que este parámetro impacta en la seguridad y eficacia, sería necesario realizar otras pruebas más, como por ejemplo, la resonancia de plasmones superficiales (SPR) que permite evaluar las asociaciones o disociaciones moleculares al receptor, así como, un ensayo *in vivo* en ratones [65] el cual podría aportar evidencia de las propiedades farmacodinámicas de los productos.

Tomando como base los resultados publicados por otros autores, las características del fármaco y la experiencia que se tiene con este medicamento en la clínica, los resultados encontrados en el presente trabajo sugieren que, se sugiere que para el ejercicio de biocomparabilidad de productos conteniendo filgrastim, se lleve a cabo una caracterización fisicoquímica exhaustiva empleando métodos ortogonales, se realicen pruebas *in vitro* de actividad biológica y unión a receptor, pruebas de farmacocinética y

farmacodinamia en un modelo animal y se lleve a cabo un estudio Fase I de farmacocinética y farmacodinamia en voluntarios sanos. Con base en la información obtenida se podría prescindir de la realización de los estudios clínicos establecidos en la regulación actual. La farmacovigilancia sería también un factor determinante para garantizar la seguridad en la práctica clínica.

8.4. Consideraciones finales

Uno de los productos bajo estudio fue el filgrastim del laboratorio PROBIOMED, S.A. de C.V. Los resultados de comparabilidad obtenidos en el presente trabajo se incluyeron en el dossier que fue sometido para su registro ante la COFEPRIS.

Cuadro 18. Resultados de las pruebas farmacopeicas aplicadas a los productos conteniendo filgrastim

Prueba	**Metodología**	**Resultado**	**Neupogen®**	**Producto 1**	**Producto 2**	**Producto 3**	**Producto 4**	**Producto 5**	**Producto 6**
Identidad e impurezas con diferentes pesos moleculares	Electroforesis en gel	Posición de la banda principal Presencia de otras bandas	Se muestra la banda principal en posición similar a la banda de Neupogen® y no se observa la presencia de otras bandas						
Proteínas relacionadas	HPLC-FR	Total de impurezas	0.51 ± 0.21	1.53 ± 0.51	1.27 ± 0.12	0.39 ± 0.05	1.2 ± 0.04	1.12± 0.07	1.71
Identidad e impurezas con altos pesos moleculares	UPLC-SEC	Agregados	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.3 ± 0.05	0.5 ± 0.13	0.9 ± 0.6	0.1± 0.01	0.4±0.37
Punto isoeléctrico	Electroforesis capilar	Punto isoeléctrico	6.22 ± 0.02	6.23 ± 0.01	6.21 ± 0.01	6.20 ± 0.00	6.20 ± 0.03	6.20 ± 0.01	6.17 ± 0.01
Potencia	Proliferación	Potencia	NA	92.7 ± 2.58	91.0 ± 0.00	88.0 ± 0.00	92.3 ± 4.24	85.0 ± 0.00	98.5 ± 3.16
Mapeo peptídico	UPLC	Perfil cromatográfico	El perfil corresponde con el producto de referencia						

Cuadro 19. Resultados de las pruebas complementarias aplicadas a los productos conteniendo filgrastim

Prueba	Metodología	Resultado	Neupogen®	Producto 1	Producto 2	Producto 3	Producto 4	Producto 5	Producto 6
Estructura primaria	Verificación de secuencia por MS	Cobertura de secuencia (%)	98.3 ± 0.0	98.9 ± 0.98	99.4 ± 0.98	98.9 ± 0.0	93.0 ± 10.74	98.3 ± 0.0	98.30 ± 0.0
Masa molecular	MS	Molécula intacta	18798.2 ± 0.16	18798.2 ± 0.04	18798.7 ± 0.03	18798.6 ± 0.02	18798.3 ± 0.03	18798.2 ± 0.09	18798.3 ± 0.35
Estructura de alto orden	Dicroísmo Circular	Espectro	No existen diferencias entre los espectros						
	Fluorescencia	Tiempo de vida (s)	3.35E-09 ± 1.4E-11	3.14E-09 ± 1.1E-10	3.12E-09 ± 1.31E-10	3.24E-09 ± 1.1E-11	3.39E-09 ± 5.2E-13	3.36E-09 ± 0.0	3.19E-09 ± 7.9E-11
Estabilidad termodinámica	Calorimetría Diferencial de Barrido	Temperatura de transición (°C)	68.13 ± 0.95	66.88 ± 0.89	66.8 ± 0.63	67.42 ± 0.19	68.93 ± 2.21	67.66 ± 0.00	66.28 ± 4.19
		Entalpía de transición (kJ/mol)	1002.49 ± 66.34	1110.39 ± 94.32	1000.65 ± 101.38	925.62 ± 6.20	939.93 ± 95.62	851.80 ± 0.00	962.19 ± 4.19
Unión al receptor	ELISA	% de unión a receptor	98.91 ± 19.95	105.6 ± 32.19	99.9	ND	63.5	73.8	118.2

9. CONCLUSIONES

- Se utilizaron técnicas analíticas de vanguardia, para comparar la estructura primaria, secundaria y terciaria de 6 productos comerciales conteniendo filgrastim del mercado nacional con el producto innovador Neupogen®.

- Los resultados mostraron que el perfil fisicoquímico de todos ellos, fue semejante al del producto innovador. Además, cuatro de los productos presentaron una actividad biológica similar y podrían ser una opción costo-efectivo útil para pacientes que requieren este tipo de tratamiento.

- Dos de los medicamentos presentaron diferencias en la prueba de unión a receptor, lo cual podría impactar en su eficacia y seguridad. Sería importante realizar más pruebas a estos medicamentos para determinar si estas diferencias tienen alguna correlación *in vivo*.

- El aseguramiento de calidad de lote a lote es de gran importancia para el seguimiento de los productos de nuestro país.

10. BIBLIOGRAFÍA

[1] Espinosa R., Díaz A. y Barile L. Medicamentos biocomparables en México: la postura del Colegio Mexicano de Reumatología, 2012. Reumatol Clin. (2013) 9: 113-116.

[2] Ministerio de Salud Secretaria de Políticas, Regulación e Institutos. ANMAT, Argentina. Disposición No 7729. (2011) Disponible en: www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/octubre_2011/Dispo_7075-11.pdf. Consultado en marzo.

[3] Vanz A., Renard G., Palma M., et al. Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization. Microb Cell Fact. (2008) 7: 1-12.

[4] Bhupinder S., Vikrant S. Biosimilars: an overview. Biosimilars. (2011) 1: 1-11.

[5] America's Biopharmaceutical Research Companies. New Medicines Approvals in 2013 (2014) Disponible en: http://www.phrma.org/sites/default/files/pdf/PhRMA%20Profile%202013.pdf. Consultado en noviembre 2015.

[6] Johnson IS. Human insulin from recombinant DNA technology. Science. (1983) 219: 632-637.

[7] Stern S. Sources of Medical Technology: Universities and Industry Committee on Technological Innovation in Medicine. Institute of Medicine, National Academies Press. (1995) 7: 157-187.

[8] Knezevic, I. and Griffiths E., Biosimilars global issues, national solutions. Biologicals. (2011) 39: 252-255.

[9] Editorial Nature. The next Generation? Second-generation biologics are now entering the marketplace. Nat Biotechnol. (2006) 24: 1300.

[10] Aggarwal S. What's fueling the biotech engine - 2012 to 2013. Nat Biotechnol. (2014) 32: 32-39.

[11] Nowicki M. Basic Facts about Biosimilars. Kidney Blood Press Res. (2007) 30: 267–272.

[12] Revers L. and Furczon E. An introduction to biologics and biosimilars. Part II: Subsequent entry biologics: Biosame or biodifferent? Can Pharm J. (2010) 4: 184-191.

[13] Roger D. and Goldsmith D. Biosimilars: it's not as simple as cost alone. J Clin Pharm Ther. (2008) 33: 459–464.

[14] Avidor Y., Mabjeesh N. and Matzkin H. Biotechnology and drug discovery: from bench to bedside. South Med J. (2003) 96: 1174-1183.

[15] Thelwell C. and Longstaff C. Biosimilars: the process is the product. The example of recombinant streptokinase. J Thromb Haemost. (2014) 12: 1229-33.

[16] Xu1 X. and Vugmeyster Y. Challenges and Opportunities in Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion Studies of Therapeutic Biologics. The AAPS J. (2012) 14: 781-791.

[17] Franco M. y Savio E. Medicamentos biotecnológicos. Conceptos básicos y relevancia en el contexto clínico. Tendencias en medicina. (2008) Disponible en: www.tendenciasenmedicina.com/imagenes/imagenes33/art_03.pdf. Consultado en noviembre 2015.

[18] Jelkmann W. Biosimilar epoetins and other ‘‘follow-on’’ biologics: Update on the European experiences. Am J Hematol. (2010) 85: 771–780.

[19] Barbosa D. Immunogenicity of biotherapeutics in the context of developing biosimilars and biobetters. Drug Discov Today. (2011). 16: 345-353.

[20] Buttel I., Chamberlain P., Chowers Y., et al. Taking immunogenicity assessment of therapeutic proteins to the next level. Biologicals. (2011) 39: 100-109.

[21] Schellekens H. Recombinant human erythropoietins, biosimilars and immunogenicity. J Nephrol. (2008) 21: 497-502.

[22] Manrique S. y Jiménez W. Mercado de medicamentos biotecnológicos en el Sistema General de Seguridad Social en Salud. Cien Tecnol Salud Vis Ocul. (2012) 10: 59-78.

[23] Staginnus, M. Economía y productos biotecnológicos. Economía de la Salud. (2007) 5: 343-348.

[24] Davit B., Braddy A., Conner D., et al. International Guidelines for Bioequivalence of Systemically Available Orally Administered Generic Drug Products: A Survey of Similarities and Differences. AAPS J. (2013) 15: 974-990.

[25] Calvet X. y Esplugues J. ¿Cómo comparar fármacos biológicos? Reumatología clínica. (2014) 10: 353-359.

[26] Crommelin D., Bermejo T., Bissig M., et al. Pharmaceutical evaluation of biosimilars: important differences from generic low-molecular-weight pharmaceuticals Eur J Hosp Pharm Sci Pract. (2005) 11: 11-17.

[27] Noaiseh G. and Moreland L. Current and future biosimilars: potential practical applications in rheumatology. Biosimilars. (2013) 3: 27-33.

[28] McKinnon R. and Lu C. Biosimilars are not (bio)generics. Aust Prescr. (2009) 32: 146-7.

[29] De Mora F. Medicamentos derivados de la biotecnología: ¿Qué son? Una perspectiva farmacológica e histórica. J Generic Med. (2010) 7: 145-157.

[30] Kay J., Feagan B., Guirguis M., et. al. Health Canada/BIOTECanada Summit on regulatory and clinical topics related to subsequent entry biologics (biosimilars), Ottawa, Canada. Biologicals. (2012) 40: 517-527.

[31] Secretaria de Salud. Norma Oficial Mexicana 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. (2013) Disponible en : http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013. Consultado en marzo 2017.

[32] World Health Organization. Guidelines on evaluation of similar Biotherapeutic Products. (2009) Disponible en: http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/biological_therapeutics/Guidelines_Biotherapeutic_products_FINAL_HK_IK_12_June.pdf. Consultado en marzo 2017.

[33] Georg-Burkhard Kresse. Biosimilars – Science, status, and strategic perspective. Eur J Pharm Biopharm. (2009) 72: 479-486.

[34] Calvo B. Medicamentos Biotecnológicos: Requisitos Exigidos para el Desarrollo y Aprobación de Biosimilares. Inf Tecnol. (2010) 21: 125-132.

[35] Heim H. Similar biological medicinal products currently licensed in the European union - Overview of non-clinical study programs. Biologicals. (2011) 39: 284-288.

[36] European Medicines Agency. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues. (2006) Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003953.pdf. Consultado en marzo 2017.

[37] European Medicines Agency. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues. (2006) Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003920.pdf. Consultado en marzo 2017.

[38] European Medicines Agency. Guideline on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins. (2007) Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2015/10/WC500194507.pdf. Consultado en marzo 2017.

[39] European Medicines Agency. Comparability of biotechnology-derived medicinal products after a change in the manufacturing process non-clinical and clinical issues. (2014) Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003935.pdf. Consultado en marzo 2017.

[40] European Medicines Agency. Non-clinical and clinical development of similar medicinal products containing recombinant interferon alpha. (2009) Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003930.pdf. Consultado en marzo 2017.

[41] European Medicines Agency. Similar biological medicinal products containing recombinant erythropoietins. (2009) Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003930.pdf. Consultado en marzo 2017.

[42] European Medicines Agency. Annex to guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues - Guidance on similar medicinal products containing somatropin. (2006) Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003956.pdf. Consultado en marzo 2017.

[43] European Medicines Agency. Annex to guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues - Guidance on biosimilar medicinal products containing recombinant granulocyte-colony stimulating factor. (2006) Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003955.pdf. Consultado en marzo 2017.

[44] European Medicines Agency. Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant human insulin and insulin analogues. (2015) Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2015/03/WC500184161.pdf. Consultado en marzo 2017.

[45] European Medicines Agency. Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies – non-clinical and clinical issues (2012) Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/06/WC500128686.pdf. Consultado en marzo 2017.

[46] European Medicines Agency. Guideline on similar biological medicinal products containing interferon beta (2013) Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2013/03/WC500139622.pdf. Consultado en marzo 2017.

[47] European Medicines Agency. Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant human follicle stimulating hormone (r-hFSH) (2013) Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2013/03/WC500139624.pdf. Consultado en marzo 2017.

[48] Steven A. Berkowitz1, John R. Engen2, Jeffrey R. Mazzeo. Analytical tools for characterizing biopharmaceuticals and the implications for biosimilars. Nat Rev Drug Discov. 2013. 11: 527-540.

[49] Koen S., Isabel V., Pat S. Modern chromatographic and mass spectrometric techniques for protein biopharmaceutical characterization. J Chromatogr A. (2014) 1335: 81-103.

[50] Macht M. Top-down characterization of biopharmaceuticals. Trends Anal Chem. (2013) 48: 62-71.

[51] Quinternet M., Starck J., Delsuc M., et al. Heteronuclear NMR provides an accurate assessment of therapeutic insulin's quality. J Pharm Biomed Anal. (2013) 78-79: 252–254.

[52] Generics and Biosimilars Initiative (GaBI). Japanese guidelines for biosimilars. (2013) Disponible en: http://www.gabionline.net/Guidelines/Japanese-guidelines-for-biosimilars. Consultado en marzo 2017.

[53] Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Guidance for Industry Quality Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Protein Product. (2012) Disponible en: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM291128.pdf. Consultado en marzo 2017.

[54] Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Quality Considerations in demonstrating Biosimilarity to Reference Protein. (2012) Disponible en: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM291134.pdf. Consultado en marzo 2017.

[55] Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria, Brasil. Registro de Productos Biológicos. (2011) Disponible en: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/935aed0048bd2755a7cdaf9a6e94f0d0/Registro_Produtos_Biologicos_Hemoterapicos_10102011_WEB.pdf?MOD=AJPERES. Consultado en abril 2015.

[56] Instituto de Salud Pública, Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. Norma Técnica No 170. Registro Sanitario de Productos Biotecnológicos derivados de técnicas de ADN Recombinante. (2014) Disponible en: www.ispch.cl/sites/default/files/Norma%20Biotecnologicos.pdf. Consultado en marzo 2017.

[57] Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia. Decreto Número 1782 de 2014. (2014) Disponible en: http://wsp.presidencia.gov.co/Normativa/Decretos/2014/Documents/SEPTIEMBRE/18/DECRETO%201782%20DEL%2018%20DE%20SEPTIEMBRE%20DE%202014.pdf. Consultado en marzo 2017.

[58] Ministerio de Salud de Costa Rica. Reglamento Técnico: RTCR 440 (2010) Disponible en:

http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=72232&nValor3=88031&strTipM=T. Consultado en marzo 2017.

[59] Ministerio de Salud de Ecuador. Acuerdo No.00003344, Reglamento Para la obtención del Registro Sanitario, Control y Vigilancia de Medicamentos Biológicos para uso y consumo humano. (2013) Disponible en: http://www.cip.org.ec/attachments/article/1011/ACUERDO%20MINISTERIAL%20No%203344.pdf. Consultado en marzo 2017.

[60] Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Dirección de Regulación Vigilancia y Control de Salud de Guatemala. Norma Técnica 67-2015. Versión 2 Registro Sanitario de Referencia de Productos Biológicos y Biotecnológicos. (2015) Disponible en: http://www.medicamentos.com.gt/index.php/legislacion-vigente/normas-tecnicas?download=44%3Ano-67-2010&start=20. Consultado en marzo 2017.

[61] Instituto Nacional de Medicina Genómica, Memorias Foro "Hacia una regulación de medicamentos biotecnológicos en México". (2007) Tomo II.

[62] Decreto por el que se adiciona un artículo 222 Bis a la ley general de Salud, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 11 de junio de 2009.

[63] Secretaria de Salud. Norma Oficial Mexicana 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. (2012) Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo= 5269530&fecha=20/09/2012. Consultado en agosto 2013.

[64] Norma Oficial Mexicana NOM-257-SSA1-2014: En materia de medicamentos biotecnológicos. (2014) Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5375517&fecha=11/12/2014. Consultado en marzo 2017.

[65] D. Metcalf. Control of Animal Cell Proliferation. Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factors. Volume II. Academic Press Inc. Pág. 109-128

[66] Skrlin A., Radic I., et al. Comparison of the physicochemical properties of a biosimilar filgrastim with those of reference filgrastim. Biologicals. (2010) 38: 557-566.

[67] Honorato J. Fármacos biotecnológicos y quimioterapia antiinfecciosa. Revista Española de Quimioterapia. (2007) 6: 310-316.

[68] Dale D. Potential role of colony-stimulating factors in the prevention and treatment of infectious diseases. Clin Infect Dis. (1994) 18: 180-188.

[69] McNiece I. Synergism of hematopoietic colony-stimulating factors. Am J Pediatr Hematol Oncol. (1992) 14: 31-38.

[70] Welte K., Gabrilove J., Bronchud M., et al. Filgrastim (r-metHuG-CSF): The First 10 Years. Blood. (1996) 88: 1907-1929.

[71] Food and Drug Administration. Neupogen® filgrastim. Disponible en: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/103353_5127lbl.pdf. Consultado en marzo 2017.

[72] Demetri G. y Griffin J. Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Its Receptor. Blood. (1991) 78: 2791-280.

[73] Catalán M., Álvarez MP. Filgrastim: Factor estimulante de colonias de granulocitos. Disponible en: http://dadun.unav.edu/bitstream/10171/34625/1/Rev_med_univ_Navarra_1993_38(2)_33_8.pdf. Consultado en junio de 2016.

[74] Lubenau H., Bias P., Maly AK., et al. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profile of New Biosimilar Filgrastim XM02 Equivalent to Marketed Filgrastim Neupogen Single-Blind, Randomized, Crossover Trial. Biodrugs. (2009) 23: 43-51

[75] Carulli G., Matii L., Azarà A., et al. Actin Polymerization in Neutrophils from Donors of Peripheral Blood Stem Cells: Divergent Effects of Glycosylated and Nonglycosylated Recombinant Human Granulocite Colony-Stumulatin Factor. Am J Hematol. (2006) 81: 318-323.

[76] Snowden JA, Biggs JC, Milliken S., et al. A randomised, blinded, placebo-controlled, dose escalation study of the tolerability and efficacy of filgrastim for haemopoietic stem cell mobilization in patients with severe active rheumatoid arthritis. Blood Marrow Transplant. (1998) 22: 1035-1041.

[77] Heussner P., Haase D., Kanz L., et al. G-CSF in the long-term treatment of cyclic neutropenia and chronic idiopathic neutropenia in adult patients. Int J Hematol Ther. (1995) 6: 225-34.

[78] Bonilla M., Gillio A., Ruggeiro M., et al. Effects of Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor on Neutropenia in Patients with Congenital Agranulocytosis. N Engl J Med. (1989) 320: 1574-1580.

[79] Kuritzkes DR. Neutropenia, Neutrophil Dysfunction, and Bacterial Infection in Patients with Human Immunodeficiency Virus Disease: The Role of Granulocyte Colony-Stimulating Factor. Clin Infect Dis. (2000) 30: 256-260.

[80] American Society of Clinical Oncology. Update of recommendations for the use of hematopoietic colony-stimulating factors: evidence-based clinical practice guidelines. J Clin Oncol. (1996) 14: 1957-1960.

[81] Gascon P., Tesch Hans., Verpoort K., et al. Clinical experience with Zarzio® in Europe: what have we learned?. Support Care Cancer (2013) 21: 2925-2932.

[82] Comisión Interinstitucional del Cuadro Básico y Catálogo de Insumos del Sector Salud. Cuadro Básico de Medicamentos. 2013. Disponible en http://www.csg.gob.mx/descargas/pdfs/2013/EDICION_2013_MEDICAMENTOS.pdf Consultado en noviembre 2016.

[83] European Medicines Agency. Nivestim: EPAR summary for the public. (2010) Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/001142/WC500093662.pdf. Consultado en marzo 2017.

[84] European Medicines Agency. Hexal: EPAR summary for the public. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000918/WC500022469.pdf. Consultado en marzo 2017.

[85] Suthakaran R. The assessment of current regulatory guidelines for Biosimilars - A Global Scenario. J Pharm Res. (2014) 8: 49-52.

[86] Wilkins A., Venkat M, Brown A., et al. Patient Perspectives on Biosimilar Insulin. J Diabetes Sci Technol. (2014) 8: 23–25.

[87] Hirschler B and Shields M. Novartis launches first U.S. 'biosimilar' drug at 15 percent discount. Reuters. (2015) Disponible en: http://www.reuters.com/article/2015/09/03/us-novartis-drug-idUSKCN0R30C220150903#OCOMuIP41aphMMPO.99. Consultado en marzo 2017.

[88] The European pharmacopoeia, filgrastim concentrated solution. France: The Council of Europe. (2010)

[89] Flores L., Campos V., Perdomo F., et al. Physicochemical properties of rituximab. J Liq Chromatogr Relat Technol. (2014) 37: 1438–52.

[90] Pérez-Medina MV, Abad-Javier ME, Romero-Díaz AJ, Villaseñor-Ortega F, Pérez NO, Flores-Ortiz LF, et al. Comparability of a three-dimensional structure in biopharmaceuticals using spectroscopic methods. J Anal Methods Chem. (2014) 27: 1–11.

[91] Pérez N., Cruz Y., et al. Caracterización estructural del factor estimulador de colonias de granulocitos, Hebervital. VacciMonitor. (2014) 23: 3-10.

[92] Hsieng Lu., Patricia F., Linda N. Chemical Modification and Site-Directed Mutagenesis of Methionine Residues in Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor: Effect on Stability and Biological Activity. Arch Biochem Biophys. (1999) 362: 1-11.

[93] Shaltout E., Al-Ghobashy M., et al. Chromatographic and electrophoretic assessment of Filgrastim biosimilars in pharmaceutical formulations. J Pharm Biomed Anal. (2014) 97: 72-80.

[94] Anurag R. and Rahul B. Establishing analytical comparability for "biosimilars": filgrastim as a case study. Anal Bioanal Chem. (2014) 26: 6569-6576.

[95] Hill C., Osslund T. and Eisenberg D. The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors. Proc Natl Acad Sci. (1993) 90: 5167-5171.

[96] Levy M., Gucinski A., et al. Analytical techniques and bioactivity assays to compare the structure and function of filgrastim (granulocyte-colony stimulating factor) therapeutics from different manufacturers. Anal Bioanal Chem. (2013) 25: 6559-6567

[97] FDA Oncologic Drugs Advisory Committee Meeting. Sandoz, Zarxio filgrastim. 2015. Disponible en: http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/OncologicDrugsAdvisoryCommittee/UCM428782.pdf Consultado en agosto 2016.

11. ARTÍCULO

Karina Mendoza-Macedo, Alexis J. Romero-Díaz, Mariana P. Miranda-Hernández, Víctor R. Campos-García, Nancy D. Ramírez-Ibañez, L. Carmina Juárez-Bayardo, Karen Moreno-Duran, Miriam S. Cedillo-Robles, Nestor O. Pérez, Helgi Jung-Cook, Luis F. Flores-Ortiz, Emilio Medina-Rivero. Characterization and comparability of biosimilars: A filgrastim case of study and regulatory perspectives for Latin America. Electronic Journal of Biotechnology. (2016), 19 (5) 63-69.

Electronic Journal of Biotechnology 24 (2016) 63–69

Contents lists available at ScienceDirect

Electronic Journal of Biotechnology

Research article

Characterization and comparability of biosimilars: A filgrastim case of study and regulatory perspectives for Latin America

Karina Mendoza-Macedo [a], Alexis J. Romero-Díaz [b], Mariana P. Miranda-Hernández [b], Víctor R. Campos-García [b], Nancy D. Ramírez-Ibañez [b], L. Carmina Juárez-Bayardo [b], Karen Moreno-Duran [b], Miriam S. Cedillo-Robles [c], Nestor O. Pérez [b], Helgi Jung-Cook [a], Luis F. Flores-Ortiz [b,*], Emilio Medina-Rivero [b,*]

[a] Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Coyoacán, Ciudad de México, C.P. 04510, Mexico
[b] Unidad de Investigación y Desarrollo, Probiomed S.A. de C.V., Cruce de Carreteras Acatzingo-Zumpahuacán s/n, Tenancingo, Estado de México, C. P. 52400, Mexico
[c] Unidad de Calidad, Probiomed S.A. de C.V., San Esteban No. 88, Azcapotzalco, Ciudad de México, C.P. 02020, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:
Received 23 June 2016
Accepted 12 October 2016
Available online 27 October 2016

Keywords:
Bio therapeutic
Comparability
Critical quality attributes
Developing countries
Generics
Health policies
High quality biosimilars
Regulation

ABSTRACT

Background: Developing countries have an estimate of ten times more approved biosimilars than developed countries. This disparity demands the need of an objective regulation that incorporates health policies according to the technological and economical capabilities of each country. One of the challenges lies on the establishment of comparability principles based on a physicochemical and biological characterization that should determine the extent of additional non-clinical and clinical studies. This is particularly relevant for licensed biosimilars in developing countries, which have an extensive clinical experience since their approval as generics, in some cases more than a decade. To exemplify the current status of biosimilars in Mexico, a characterization exercise was conducted on licensed filgrastim biosimilars using pharmacopeial and extended characterization methodologies.
Results: Most of the evaluated products complied with the pharmacopeial criteria and showed comparability in their Critical Quality Attributes (CQAs) towards the reference product. These results were expected in accordance with their equivalent performance during their licensing as generics. Accordingly, a rational approval and registration renewal scheme for biosimilars is proposed, that considers the proper identification of CQAs and its thoroughly evaluation using selected techniques.
Conclusions: This approach provides support to diminish uncertainty of exhibiting different pharmacological profiles and narrows or even avoids the necessity of comparative clinical studies. Ultimately, this proposal is intended to improve the accessibility to high quality biosimilars in Latin America and other developing countries.

© 2016 Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Production and hosting by Elsevier B.V. All rights reserved. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

1. Introduction

Since their introduction, biotherapeutic products have transformed modern medicine by bringing novel and targeted therapies for several life-threatening and chronic diseases, providing healing opportunities and improving the quality of life of patients, while reducing the incidence and severity of side effects. This biotechnology-based field has grown in the last decades, allowing the continuous development and commercialization of similar products in terms of quality, safety and efficacy with respect to a licensed product whose innovation patents had expired.

However, the introduction of these biosimilar products and their increasing worldwide manufacture has been received with controversy, mainly because of the absence of a consensus about the scientific and regulatory requirements needed to confirm their similarity, in spite of the proved quality of biosimilars and their positive impact, intended to increase health coverage and diminish the treatment costs [1].

In 2003 the European Medicines Agency (EMA) became the first regulatory organization that established initial requirements to approve biosimilars, followed by other regulatory and health agencies around the globe [2]. A current concern is the regulatory situation in developing countries, including Latin America, where almost 80% of deaths related to non-communicable diseases occur [3]. Particularly, chronic and degenerative diseases had caused 50% of the disease burden in developing countries along with an estimated loss of $84 USD billions of their income in 2015 [4], becoming practically unaffordable for their patients and health systems.

* Corresponding authors.
E-mail addresses: luis.flores@probiomed.com.mx (L.F. Flores-Ortiz), emilio.medina@probiomed.com.mx (E. Medina-Rivero).
Peer review under responsibility of Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.10.003
0717-3458/© 2016 Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Production and hosting by Elsevier B.V. All rights reserved. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

In this regard, one of the main focuses of the Pan-American Health Organization (PAHO) is to develop a harmonized regulation for biotherapeutic products across Latin America in order to improve equity in health and quality of life. In response, guidelines for biological medicines have been issued in some countries; nevertheless, the requirements for the approval of each type of product (*e.g.*: vaccines, hemoderivatives, allergenic extracts or biotherapeutics) are frequently non-differentiated. Even though the guidance established by the World Health Organization (WHO), the Food and Drug Administration (FDA), the International Conference on Harmonization (ICH) and the EMA were often used as a reference, 12% of Latin American countries have licensed biosimilar products issued as generics without a specific clinical evaluation [5].

Since 2012, Mexico is a leader in Latin America by issuing an updated regulation aimed for biosimilars approval, published by the Mexican Ministry of Health (SALUD) and the Federal Commission for the Protection against Sanitary Risk (COFEPRIS) [6,7,8]. Other regulatory agencies which have issued similar regulations are the Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA) [9], the National Administration of Drugs, Foods and Medical Devices (ANMAT) from Argentina [10], the National Food and Drug Surveillance Institute (INVIMA) from Colombia [11], the National Drug Agency (ANAMED) from Chile [12], the Department for Regulation and Control of Pharmaceutical and Related Products (DRCPFA) from Guatemala [13], the Ministry of Health Directorate-General of Medical Supplies and Drugs (DIGEMID) from Peru [14] and the Ministries of Health from Costa Rica [15] and Ecuador [16].

According to the updated guidelines, the pathway for biosimilars' approval begins with an exhaustive characterization and a comprehensive comparability study of the Critical Quality Attributes (CQAs), strongly related to the functionality and safety of the biopharmaceutical. These CQAs should comprise the attributes already recognized by the reference product, either found in characterization exercises or during the experience with equivalent molecules. The guidance states that a clinical comparative study should be followed, whose extension is defined by the characterization results and designed to assess meaningful differences, if they exist [17]. In effect, the higher the comparability the less pharmacological studies needed to evidence similarity [6,18,19].

However, one of the major challenges related to the CQA's characterization, between the biosimilar and its reference product, is their proper selection, including the definition of their comparability principles, which, ultimately, allows a rational evaluation of the biosimilar towards their licensing and continuous surveillance. A proper selection is particularly relevant, given that a successful characterization and comparability exercise supports the selection of in-process controls and quality specifications for biosimilars.

1.1. Regulatory challenges in Latin America towards characterization and comparability

For the first-generation biopharmaceuticals (synthesized as analogous of human endogenous proteins), scientific consensuses have allowed the establishment of pharmacopeial monographs stating the minimum attributes to be evaluated. Since licensed products have been safe and effective, the compliance of the control limits specified in these monographs had proved to be useful to ensure quality for human use. The aforementioned, along with an active pharmacovigilance program, set the basis for the comparability studies used for the first biosimilars registration in Europe [20]. This scheme would be adequate for the registration or license renewal of biosimilars in Latin America; nonetheless, pharmacovigilance programs are not fully incorporated or are still in process of being regulated.

Hence, a demonstrated comparability sustained on a comprehensive characterization and the clinical record during the commercialization period of an approved biosimilar, should be considered as the major contributors for their licensing renewal. Whereas, the completion of clinical trials, with narrowed extension as long as CQAs comparability is demonstrated, must be considered for new biosimilar applications in order to diminish the uncertainty of exhibiting an altered pharmacological behavior.

In summary, comparability studies must include pharmacopeial methodologies and selected state-of-the-art-technologies to thoroughly evaluate CQAs, accompanied by the clinical record or narrowed trials as appropriate. The design of the analytical characterization strategy should be planned around this purpose, and the technical capabilities to detect relevant modifications.

1.2. A case of study: filgrastim in Mexico

Filgrastim is a non-glycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) indicated for treatment of neutropenia. It was first approved in 1991 by the FDA and belongs to the first generation of biotherapeutic products after the registration of insulin in 1982. Since 2008, nine biosimilars containing filgrastim have been approved by the EMA, one of them recently approved by the FDA. However, over 50 filgrastim biosimilars are available in developing countries, most of them licensed as generic drugs since the early 2000s. For instance, in Mexico eight filgrastim biosimilars are currently commercialized. These latter had demonstrated to be safe and effective, by the absence of adverse events for more than seven years since their licensing, being Filatil® the only product manufactured in this country by Probiomed S.A. de C.V (Mexico City, Mexico) from the drug substance to the drug product. It is important to notice that the other products are commercialized using imported active pharmaceutical ingredients from Korea, Lithuania, India, Cuba, Argentina, Austria, among other countries. Also, Zarzio® (Sandoz International GmbH; Holzkirchen, Germany) obtained its approval in 2014, being in the Mexican market for less than two years.

To illustrate the current status of filgrastim biosimilars in Mexico and propose a rational scheme for their licensing renewal according to the updated regulation, a comparability analysis was performed considering the identified CQAs for this molecule (Table 1). The physicochemical and biological properties were evaluated in comparison to the reference product, Neupogen® (Amgen Inc.; Thousand Oaks, *CA*) [21] using pharmacopeial and extended methodologies which were selected according to their sensitivity, specificity, cost and the need of specialized personnel and infrastructure (Table 2). Extended methodologies were chosen to evaluate each identified CQA, based on the premise that not all the analytical techniques that a manufacturer could afford should be assessed, as their outcomes are not always linked to any functional or pharmacological behavior.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

All chemicals and reagents used for the analyses were at least ACS grade and were obtained from J.T. Baker (Avantor Performance Materials, Inc.; Center Valley, PA) or Sigma Aldrich (St. Louis, MO). All assays were performed using ultrapure Milli-Q water (Millipore, Billerica, MA).

2.2. Filgrastim samples

Filgrastim biosimilars commercialized in Mexico included: Filatil® from Probiomed S.A. de C.V., Dextrifyl® from Laboratorios Pisa S.A. de C.V., Inmunef® from Lemery S.A. de C.V., Biocilin® from Representaciones e Investigaciones Médicas, S.A. de C.V., Ior LC® from Alvartis Pharma S.A. de C.V., and Biofilgran® from Landsteiner

Table 1
Identified CQAs of filgrastim.

Attribute		Critically	Impact		
			Efficacy		Safety
			Pharmacodynamics	Pharmacokinetics	Immunogenicity
Amino acid sequence		Very High	⇕Affinity and biological potency	⇕Volume of distribution and clearance	Inherent of the molecule. Differential response to different sequences
Biological potency		Very High	⇕Biological activity	Non determined	Non determined
Affinity towards G-CSFR		Very High			
Higher order structure		High	⇕Affinity and biological potency	⇕Volume of distribution and clearance	Inherent of the molecule. Differential response to different epitopes
Aggregates and degradation isoforms	High-molecular weight variants	High	⇩Specific biological potency	⇩Bioavailability	⇧Anti-drug antibodies
	Truncated variants	Low	Non-determined		Non determined
Charge heterogeneity	Oxidized variants	High	⇕Affinity and biological potency	⇕Volume of distribution and clearance	
	Deamidation	Very Low	Non-determined		

Scientific S.A. de C.V.; Neupogen® from Amgen Inc. was used as the reference product.

2.3. Pharmacopeial analysis

Peptide mapping, reverse phase (RP) and size exclusion chromatographies (SEC) as well as polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), isoelectric focusing (IEF) and *in vitro* potency were performed according to the filgrastim pharmacopeial monograph [22].

2.4. Extended characterization analysis

Higher order structure was evaluated by differential scanning calorimetry (DSC), circular dichroism (CD) and fluorescence lifetime using time correlated single photon counting (TCSPC). Operation and sample treatment conditions were performed as previously described for DSC, by Flores-Ortiz et al. [23]; CD and TCSPC by Perez-Medina et al. [24].

Whole-molecule exact masses and tryptic peptide mappings were analyzed by reverse phase ultra-performance-liquid-chromatography coupled to a tandem quadrupole/time-of-flight mass spectrometer (RP-UPLC-MS/MS) using an ESI source on a SYNAPT G2 HDMS (Waters Corp.; Manchester, UK) and an ACQUITY UPLC H-Class Bio System (Waters Corp., Milford, MA). Acquisition was carried out in the 400–3500 m/z range employing a positive ion mode. Data was analyzed using BiopharmaLynx software (Waters Corp., Milford, MA). Amino acid sequence was confirmed by alignment to the theoretical filgrastim sequence.

Table 2
Analytical methodologies evaluation.

CQA	Analytical tool	Qualified personnel, specialized infrastructure	Cost	Standardization, sensitivity, specificity	Relationship towards CQAs	Score
Amino acid sequence	Multiangle Light Scattering	1	2	2	1	0
	SDS-PAGE	1	1	1	1	0
	Mass spectrometry	2	3	3	2	0
	Peptide mapping MS/MS	2	3	3	3	1
	Peptide mapping UV	1	2	2	1	0
	Edman Degradation	1	2	2	2	1
High order structure	TCSPC Lifetime spectroscopy	1	2	2	2	1
	Free Thiol Analysis	1	1	2	1	1
	Differential Scanning Calorimetry	1	2	3	3	3
	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	3	3	2	2	-2
	X-ray crystallography	3	3	3	3	0
	Circular Dichroism	1	2	3	3	3
	Fourier Transform Infrared Spectroscopy	1	2	2	2	1
	Hydrogen Deuterium Exchange	3	3	3	3	0
Charge heterogeneity	Hydrophobic Interaction Chromatography	1	2	2	2	1
	Capillary Isoelectrofocusing	1	2	3	3	3
	Capillary Zone Electrophoresis	1	2	3	2	2
	Isoelectrofocusing	1	1	2	2	2
	Cation Exchange Chromatography	1	2	3	2	2
	Anion Exchange Chromatography	1	2	3	2	2
Aggregates and degradation isoforms	Capillary Gel Electrophoresis	1	2	2	3	2
	Size Exclusion Chromatography	1	2	2	3	2
	Reverse Phase Chromatography	1	2	2	3	2
	SDS-PAGE	1	1	2	3	3
	Analytical Ultracentrifugation	2	3	2	3	0
Affinity towards target molecule	ELISA (cell based)	2	1	2	3	2
	Flow Cytometry (cell based)	3	3	3	3	0
	Surface Plasmon Resonance	3	3	3	3	0
	Biolayer Interferometry	2	2	3	3	2
	Isothermal Titration Calorimetry	2	2	3	3	2
Biological potency	Depends on the mechanism of action of the biopharmaceutical					

1 = Low, 2 = Medium, 3 = High.
Score = (Standardization, sensitivity, specificity + Relationship towards CQAs) − (Qualified personnel, specialized infrastructure + Cost).

Filgrastim affinity towards its receptor was assessed using a cell based ELISA assay. M-NFS-60 murine myeloid leukemia cells (ATCC CRL-1838TM) disposed in 96 well plates, were incubated at 4°C during 2 h with serial dilutions of each filgrastim sample, ranging from 300 g/mL to 0.37 g/mL. Cells were washed with a 0.1% tween 20 Tris buffered saline solution, to be incubated for 1 h with a 0.4 ng/mL solution of human anti-G-CSF antibody (R&D Systems; McKinley Place, MN). Afterwards, cells were washed and incubated for 1 h with a 0.1 ng/mL solution of goat anti-IgG horseradish peroxidase-conjugated antibody (HRP) from R&D Systems (McKinley Place, MN). Cells were washed again to add 100 L of TMB substrate (Thermo Fisher Scientific; Carlsbad, *CA*). After 20 min, a 0.01 N hydrochloric acid solution was added to quench the reaction. UV–Vis absorbance was acquired at 450 nm on a SpectraMax M3 plate reader from Molecular Devices (Sunnyvale, *CA*). Dose–response curves were adjusted using a 4 parameter logistic model. Relative affinity was calculated by comparing the half maximal effective concentration (EC50) of the sample against the reference product.

3. Results

3.1. Filgrastim comparability results

Pharmacopeial analysis results revealed comparability towards the reference product and compliance with the pharmacopeial acceptance criteria, except for one product (Table 3).

For all the evaluated products a similar peptide mapping profile (number and abundance of peaks) towards the reference product was obtained. For the main isoform, differences below 0.07 units in the isoelectric point (pI) were revealed by cIEF in comparison to the reference value of 6.22. Also SDS-PAGE showed correspondence in position and intensity for the observed bands under both reducing and non-reducing conditions. Additionally, no species with different molecular masses other than filgrastim were observed during the SDS-PAGE analyses for all biosimilars. Regarding purity, the aggregate level was under the pharmacopeial limit in all cases whilst the content of related proteins was below the limit of 3.5%, with the exception of one product, whose higher content of oxidized and deamidated isoforms did not showed an impact on its biological potency (Table 3). Collectively, resulting in a biological potency that lied within the expected acceptance range.

These results constitute the basis to demonstrate physicochemical and biological similarity. Further, this characterization overview of filgrastim products, as stated, was strengthened by orthogonal techniques and the evaluation of other CQAs not considered in the pharmacopeial monograph, such as higher order structure and receptor affinity (Table 4).

Mass spectrometry (MS), a well-known high-resolution technique for protein characterization, confirmed the identity of filgrastim through intact mass analysis and sequence verification. MS revealed coverage over 92% for all products against the theoretical sequence, and differences below 0.5 Da for the main isoform against the reference product and the theoretical molecular mass, with a similar content of related variants with different masses (Table 4, Fig. 1).

Circular dichroism (CD) and fluorescence lifetime spectroscopy by Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC) were employed to assess higher order structure. Both techniques are useful to evaluate the spatial arrangement of specific residues within the molecule by their absorbance and fluorescence properties, respectively. Fluorescence lifetimes (τ) showed differences below 7% for all the assessed biosimilars against the reference product, attributable to the dependence of the fluorescence lifetime to the formulation properties of each product. Likewise, CD measurements revealed a similar secondary and tertiary structure, with comparable profiles among the biosimilars and the reference product. Additionally, differential scanning calorimetry (DSC) was used to determine the thermal transitions, as a measure of the structural integrity, thermostability and solubility of each biosimilar product at their specific formulation. A comparable behavior was observed among all products, with differences lower than 2°C in their respective transition temperatures against the reference product.

Finally, receptor affinity assays were performed to complete CQA's evaluation, since the interaction of filgrastim with its receptor represents the onset for its mechanisms of action and reflects an adequate three-dimensional structure and chemical composition. Most of the biosimilar products had a comparable affinity towards the granulocyte colony-stimulating factor receptor (G-CSFR). However, two products showed mean measured affinities outside the observed confidence interval for the reference product of 81 to 123% ($n = 5$).

Table 3
Pharmacopeial analyses.

CQA	Pharmacopeial attribute	Methodology	Acceptance criteria	Neupogen®	Biosimilar product					
					Filatil®	2	3	4	5	6
Amino acid Sequence	Identity	Peptide mapping	Correspondence in chromatographic profiles	The profile of all the biosimilars correspond by showing similar number and abundance of peaks against the reference product						
Charge heterogeneity	Identity and Impurities with different charge	Isoelectric focusing	Isoelectric point between 5.7 to 6.3	6.2 ± 0.01	6.2 ± 0.01	6.2 ± 0.01	6.2 ± 0.00	6.2 ± 0.03	6.2 ± 0.00	6.2 ± 0.01
			Charge variants content <10.0%	1.4 ± 0.16	5.5 ± 0.24	5.6 ± 0.12	4.0 ± 0.69	4.6 ± 0.20	2.7 ± 0.27	3.8 ± 0.66
Aggregates and degradation isoforms	Identity and Impurities with different molecular masses	Polyacrylamide gel electrophoresis	Relative molecular weight is 18.8 kDa Impurities <2.0% Correspondence in electrophoretic profile	The SDS-PAGE gels for all the biosimilars showed a principal band around 18.8 kDa with similar position and intensity against the reference product. No bands with different molecular masses were detected						
	Identity and Impurities with higher molecular masses	Size-exclusion chromatography	Aggregates content <2.0%	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.3 ± 0.03	0.5 ± 0.08	0.9 ± 0.49	0.1 ± 0.02	0.4 ± 0.31
			Correspondence in retention time	The retention time for all the biosimilars showed undistinguishable differences						
	Related proteins	Reverse phase liquid chromatography	Total impurities content <3.5%	1.6 ± 0.33	2.8 ± 0.54	3.5 ± 0.24	1.0 ± 0.23	1.9 ± 0.85	1.6 ($n = 1$)	4.3 ± 7.07
			Highest impurity content <2.0%	0.7 ± 0.07	1.3 ± 0.47	1.2 ± 0.06	0.5 ± 0.12	1.1 ± 0.28	0.7 ($n = 1$)	3.0 ± 7.23
Biological Potency	Potency	Cell proliferation assay	Induces cell proliferation (80–125%)	–	92.7 ± 2.58	91.0 (n = 1)	88.0 (n = 1)	92.3 ± 4.24	85.0 (n = 1)	98.5 ± 3.16

Table 4
Extended analyses.

CQA	Methodology		Neupogen®	Biosimilar product					
				Filatil®	2	3	4	5	6
Amino acid sequence	Mass spectrometry	Intact molecule mass (Da)	18,798.2 ± 0.19	18,798.2 ± 0.06	18,798.7 ± 0.06	18,798.6 ± 0.03	18,798.3 ± 0.04	18,798.2 (n = 1)	18,798.4 ± 1.55
		Sequence coverage (%)	98.3 ± 0.00	98.9 ± 1.65	99.4 ± 1.65	98.3 ± 0.00	93.0 ± 18.11	98.3 (n = 1)	98.3 ± 0.00
High order structure	Circular dichroism	Secondary structure	The profile of all the biosimilars corresponds with the reference product						
	Fluorescence spectroscopy	Fluorescence lifetime (s)	3.35E-09 ± 0.02	3.14E-09 ± 0.19	3.12E-09 ± 0.22	3.24E-09 ± 0.02	3.39E-09 ± 0.00	3.36E-09 ($n = 1$)	3.19E-09 ± 0.35
	Differential scanning calorimetry	Transition temperature (°C)	68.1 ± 1.61	66.9 ± 1.50	66.8 ± 1.07	67.4 ± 0.19	68.9 ± 3.72	67.7 ($n = 1$)	66.3 ± 7.07
		Transition enthalpy (kJ/mol)	1002.5 ± 111.85	1110.4 ± 159.02	1000.7 ± 170.91	925.6 ± 10.45	939.9 ± 161.21	851.8 ($n = 1$)	962.2 ± 282.07
Affinity towards G-CSFR	Sandwich ELISA	Receptor affinity (%)	98.9	105.6	99.9	Non determined	63.5	73.8	118.2

4. Discussion

The comparability exercise revealed that most of the evaluated filgrastim products are physicochemically and biologically similar to the reference product. Although, differences were observed on the content of oxidized and deamidated isoforms and the relative affinity towards G-CSFR in some products, no impact on the biological potency was observed as measured by cell proliferation. In such cases, additional non-clinical or clinical comparative studies are needed to reduce the uncertainty regarding altered *in vivo* safety and efficacy profiles.

For instance, biosimilars with an increased amount of oxidized and deamidated isoforms would require additional non-clinical PK studies (*i.e.*: *in vivo*) to assure comparability, as these isoforms may lead to changes in the electrical charge of the molecule, altering their interactions against cells and tissues, resistance to proteolysis and receptor affinity [25]. Whereas, biosimilars with differences in receptor affinity would require additional clinical PK studies as these modified affinities could affect the receptor-mediated clearance of filgrastim [26].

In summary, when physicochemical differences are found on an approved product, additional experimental models should be used to demonstrate comparability as long as they can be regarded as relevant to the pathophysiological conditions in patients [23]. Affinity tests, activity assays, or even a higher number of participants (*i.e.*: stringent statistics) and endpoints during clinical trials, could be included to fulfill this purpose and ultimately obtain registration renewal.

On the other hand, products with extensive market experience that proved to be comparable after a thorough CQA evaluation can be recognized as biosimilars through a proper analysis of their wealth of accumulated clinical evidence over time. This evidence includes investigator initiated trials or IITs, real world evidence or RWE, electronic health records or EHRs, and pharmacovigilance/safety reports, of sufficient quality to generate valid scientific conclusions to

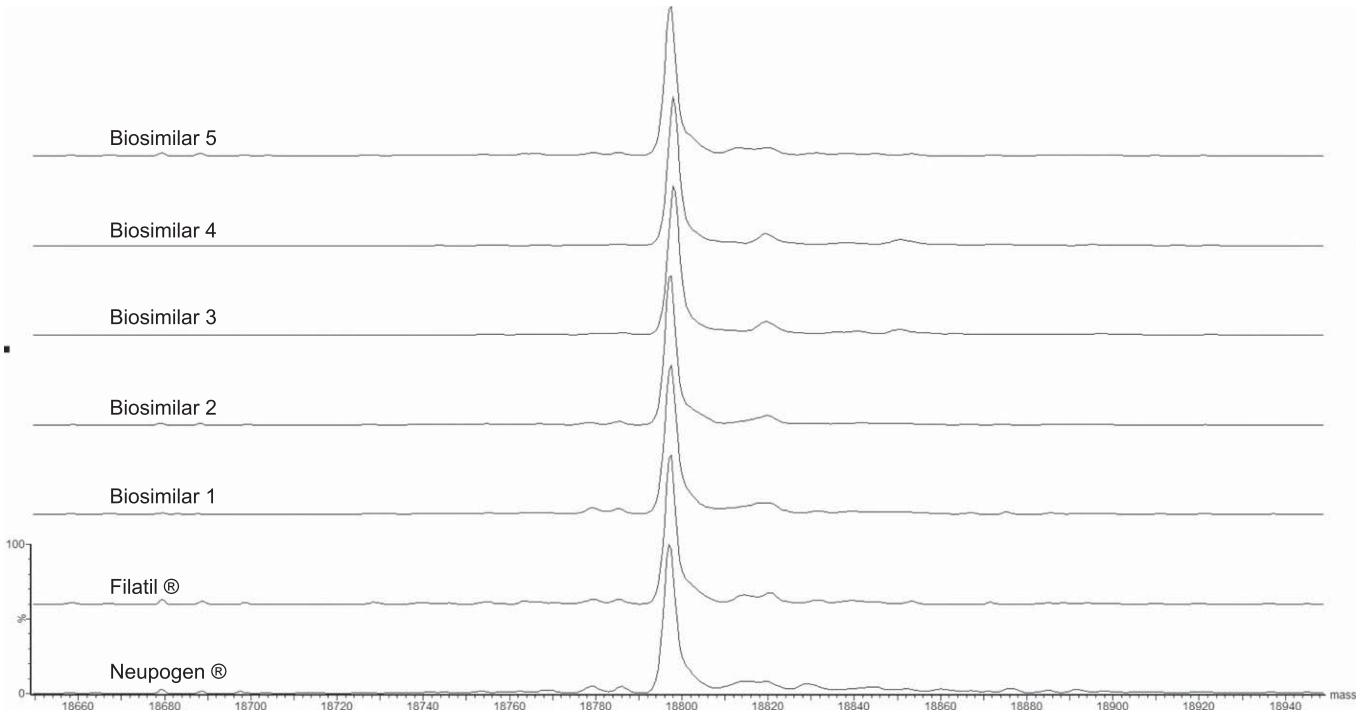


Fig. 1. MS profiles of the filgrastim samples.

demonstrate a comparable efficacy and safety profile with respect to the reference product.

Evoking the proposed regulatory approach, manufacturers of biosimilars approved as generics should formally complete the presented characterization exercise using several batches of their product and its reference. This would finally allow to establish comparability and to determine the source of any observed differences, either intrinsic to the biosimilar or due to the variability of the reference product, and the necessity of additional studies. Moreover, this exhaustive exercise will evidence the biosimilar manufacturing process consistency in each case, which should be complemented with the product lifecycle management process and annual product reviews. The aforementioned along with the analyzed clinical evidence obtained during the commercialization period of a product can support their registration renewal.

In this sense, Mexico has published specific guidelines for the registration of biosimilars and the update of products approved as generics to a biosimilar-status [8]. The recommendations involve a case-by-case analysis of the information submitted during the biosimilar application, including CQA's comparability, defining the need and extension of additional studies. In all cases, Good Manufacturing Practices (GMP) compliance is mandatory, regardless of the product origin.

4.1. Perspectives: innovation and industrial progress in Latin America

As has been mentioned, healthcare systems in developing countries demand access to affordable and specialized biopharmaceutical therapies, encouraging the advent of biosimilar products. As a result, more than 100 biosimilars had been approved since the late 1990s worldwide, even before any specific regulation appeared.

A reasonable approach to address this need, with long-term benefits for developing countries, would stimulate scientific progress, contribute to gain experience in biotechnological manufacturing processes and allow competitiveness with market and price equilibrium. For instance, Brazilian authorities have successfully promoted a scheme that has boosted the local industry towards self-sufficiency. Their strategies involved incentivizing the local manufacturing of biosimilars by imposing high import taxes, official promotion of their usage, investment in higher education and the creation of R&D institutes. The partnerships between multinational, academia, private and public institutions could also improve the development of national technological capabilities. Thus enabling the foundation of competitive companies and reducing biopharmaceutical monopolies, giving equity to the health conditions among developed and developing countries.

It must be highlighted that occasionally the benefits of the relationships of international companies with developing countries willfully rely on the reduction of expenses due to lower scientific labor costs. Sometimes the lower entry barriers of these countries allow the entrance of products (even those with different physicochemical properties with respect to the reference product), intending to obtain safety and efficacy information that minimizes the manufacturer's risks for more stringent markets. Thus making imperative to promote a functional and rational regulatory scheme with authentic mutual benefits. In this sense, a truly fruitful relationship between each country and biosimilar producers would benefit the drug quality and accessibility, and ultimately stimulate local scientific and socioeconomic progress.

Stimuli to a biosimilar market would force to overcome the current challenges in Latin American biopharmaceutical industries, including those related to the development, implementation and maintenance of GMPs and the improvement of their pharmacovigilance programs.

For instance, this characterization overview highlights the similarity of most licensed generic products favoring an updated registration program based on a rational approach, which considers comparability of the identified CQAs and the analyzed clinical evidence obtained during the commercialization period as the major contributors for their registration renewal. This exercise is intended to provide certainty to the regulatory authorities towards the approval process, thus strengthening the confidence and acceptance of physicians and patients.

5. Concluding remarks

A regulatory framework is the first step to address the current uncertainty regarding biosimilars approval. This could be achievable through rational foundations that incorporate scientific knowledge. Accordingly, the physicochemical and biological comparability exercise of these molecules is the major player to evidence their similarity and to reduce risks associated to a different pharmacological behavior with respect to the reference product.

CQAs must be the primary target of comparability studies, properly assessed by the selection of specific analytical techniques, whose results can be coherently or meaningfully linked to drug functionality. This would narrow, with respect to the full set of studies conducted by the reference product manufacturer, the extent of comparative clinical studies for biosimilar products, avoiding redundant demonstration of safety and efficacy. Furthermore, a comprehensive comparability study along with the clinical record accumulated during the commercialization period of products approved under a non-specific biosimilar regulation should be considered sufficient evidence for their registration renewal as biosimilars.

We believe that the implementation of a rational approach by regulatory agencies and health authorities based on the concepts presented herein is the keystone to improve the accessibility to high quality biosimilars in Latin America and other developing countries. Furthermore, promoting the investment in research and development of local biopharmaceutical companies by reducing costs and time to satisfy the necessity of specialized therapies.

Conflict of interest

Alexis J. Romero-Diaz, Mariana P. Miranda-Hernandez, Victor R. Campos-Garcia, Nancy D. Ramirez-Ibañez, L. Carmina Juarez-Bayardo, Karen Moreno-Duran, Miriam S. Cedillo-Robles, Nestor O. Perez, Emilio Medina-Rivero and Luis F. Flores-Ortiz are employees of Probiomed S.A. de C.V., which is developing, manufacturing and marketing biosimilar products. All the authors, including Karina Mendoza-Macedo and Helgi Jung-Cook declared no conflict of interest.

Financial support

Financial support was provided by the National Council for Science and Technology (CONACYT) Mexico grant CONACyTC 179118.

References

[1] Knezevic I, Griffiths E. Biosimilars — Global issues, national solutions. Biologicals 2011;39:252–5. http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.09.005.
[2] Gravel P, Naik A, Le Cotonnec JY. Biosimilar rhG-CSFs: How similar are they? Target Oncol 2012;7:3–16. http://dx.doi.org/10.1007/s11523-011-0187-4.
[3] Alwan A. World Health Organization. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Available from: http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report_full_en.pdf; 2011. [Accessed on 21 June 2016].
[4] Nugent R. Chronic diseases in developing countries: Health and economic burdens. Ann N Y Acad Sci 2008;1136:70–9. http://dx.doi.org/10.1196/annals.1425.027.
[5] Pombo ML, Di Fabio JL, Cortes MA. Review of regulation of biological and biotechnological products in Latin American and Caribbean countries. Biologicals 2009;37:271–6. http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.07.003.
[6] Norma Oficial Mexicana 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 (Biotechnological medicines and biopharmaceuticals. Good manufacturing practices. Technical and scientific requirements to ensure safety, effectiveness and quality. Labeling. Biocomparability and pharmacovigilance requirements). Mexico. Available from: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5269530&fecha=20/09/2012; 2012. [Accessed on 21 June 2016].

[7] Norma Oficial Mexicana 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 (Establishing tests and procedures to demonstrate that a medicine is interchangeable. Requirements to be met by authorized third parties that conduct interchangeability tests. Biocomparability study requirements. Requirements to conduct biocomparability tests by authorized third parties, research centres and hospitals that). Mexico. Available from http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013; 2013. [Accessed on 21 June 2016].

[8] Norma Oficial Mexicana NOM-257-SSA1–2014. En materia de medicamentos biotecnológicos (Regarding biotechnology medicines). Mexico. Available from: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5375517&fecha=11/12/2014; 2014. [Accessed on 21 June 2016].

[9] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Registro de Productos Biológicos e Hemoterápicos (Biological and hemotherapic products registry). Brazil. Available from http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivos/dwnl_1307385325.pdf; 2011. [Accessed on 21 June 2016].

[10] Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Ministerio de Salud Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos. Disposición número 7075/11 Disposition number 7075/11. 2011 Argentina; 2011. Available from: http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/octubre_2011/Dispo_7075-11.pdf. [Accessed on 21 June 2016].

[11] Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. Ministerio de Salud y Protección social. Decreto número 1782 (Decree number 1782). Colombia. Available from: https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Decreto%201782%20de%202014.pdf; 2014. [Accessed on 21 June 2016].

[12] Departamento Agencia Nacional de Medicamentos. Norma técnica número 170. Sobre Registro Sanitario de Productos Biotecnológicos Derivados de Técnicas de ADN Recombinantes Norm number 170: Licensing of biotechnology products derived from recombinant DNA techniques Chile; 2014. Available from: http://www.ispch.498cl/sites/default/files/Norma%20Biotecnologicos.pdf. [Accessed on 21 June 2016].

[13] Departamento de Regulación y Control de Productos Farmacéuticos y Afines. Acuerdo número 67-2015 (Norm 67-2015). Guatemala. Available from: http://www.tse.org.gt/images/Acuerdos2015/67-2015.pdf; 2015. [Accessed on 21 June 2016].

[14] Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas. Reglamento para el registro, control y vigilancia sanitaria de productos farmacéuticos, dispositivos médicos y productos sanitarios (Regulation for the registry, control and surveillance of pharmaceutical products and medical devices). Peru. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342009000400014&lng=pt&nrm=is&tlng=es; 2011. [Accessed on 21 June 2016].

[15] Ministerio de Salud de Costa Rica. Reglamento Técnico: RTCR 440: 2010. Reglamento de Inscripción y control de medicamentos Biológicos. Número 370006-S (RTCR 440: 2010: Regulations for the registration and control of biological medicines. Number 370006-S). Costa Rica. Available from: http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=72232&nValor3=88031&strTipM=TC; 2010. [Accessed on 21 June 2016].

[16] Ministerio de Salud de Ecuador. Acuerdo Nacional 00003344. Reglamento para la Obtención del Registro Sanitario, Control y Vigilancia de Medicamentos Biológicos para Uso y Consumo Humano (Agreement number 00003344: Regulation for the health registry, control and surveillance of biologics for human use and consumption). Ecuador. Available from: http://www.cip.org.ec/attachments/article/1011/ACUERDO%20MINISTERIAL%20No%203344.pdf; 2013. [Accessed on 21 June 2016].

[17] Lemery SJ, Esteva FJ, Weise M. Biosimilars: Here and now. Am Soc Clin Oncol Educ Book 2016;35:151–7. http://dx.doi.org/10.14694/EDBK_155954.

[18] Woodcock J, Griffin J, Behrman R, Cherney B, Crescenzi T, Fraser B, et al. The FDA's assessment of follow-on protein products: A historical perspective. Nat Rev Drug Discov 2007;6:437–42. http://dx.doi.org/10.1038/nrd2307.

[19] Barry F. "Regulators: skip clinical data and extrapolate biosimilar indications" published by BioPharma reporter. Available from: http://www.biopharma-reporter.com/Markets-Regulations/Regulators-skip-clinical-data-and-extrapolate-biosimilar-indications; 2015. [Accessed on 13 September 2016].

[20] European public assessment reports (EPAR) or human medicines published by the European Medicines Agency (EMA) European Medicines Agency. Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/epar_search.jsp&mid=WC0b01ac058001d124; 2016. [Accessed on 21 June 2016].

[21] Neupogen® (filgrastim) Full Prescribing Information Amgen Inc, 1991–2015.

[22] The European pharmacopoeia, filgrastim concentrated solution. France: The Council of Europe; 2010.

[23] Flores-Ortiz LF, Campos-Garcia VR, Perdomo-Abundez FC, Perez NO, Medina-Rivero E. Physicochemical properties of rituximab. J Liq Chromatogr Relat Technol 2014;37:1438–52. http://dx.doi.org/10.1080/10826076.2013.794738.

[24] Pérez-Medina MV, Abad-Javier ME, Romero-Díaz AJ, Villaseñor-Ortega F, Pérez NO, Flores-Ortiz LF, et al. Comparability of a three-dimensional structure in biopharmaceuticals using spectroscopic methods. J Anal Methods Chem 2014;2014(7):1–11. http://dx.doi.org/10.1155/2014/950598.

[25] Putnam WS, Prabhu S, Zheng Y, Subramayam M, Wang YC. Pharmacokinetic, pharmacodynamics and immunogenicity comparability assessment strategies for monoclonal antibodies. Trends Biotechnol 2010;28:509–16. http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.07.001.

[26] Molineux G, Foote MA, Arvedson T. Twenty years of G-CSF, clinical and non clinical discoveries. Basel: Springer; 2012. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-0348-0218-5.