



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

***De los anticuerpos monoclonales a las proteínas de fusión:
Perspectivas terapéuticas y legislativas.***

TESINA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

EMANUEL MARTÍNEZ HUERTA

DIRECTOR DE TESINA

DRA. LUZ XOCHIQUETZALLI VÁSQUEZ BOCHM



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: JORGE ESTEBAN MIRANDA CALDERÓN
VOCAL: HAIDEE ÁLVAREZ ALCANTARA
SECRETARIO: LUZ XOCHQUETZALLI VÁSQUEZ BOCHM
1er. SUPLENTE: DAVID BRAVO LEAL
2º SUPLENTE: PAVEL EBER BAUSTISTA PORTILLA

**EDIFICIO DE INVESTIGACIONES. FACULTAD DE MEDICINA. CIUDAD
UNIVERSITARIA, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

LUZ XOCHQUETZALLI VÁSQUEZ BOCHM

SUSTENTANTE:

EMANUEL MARTÍNEZ HUERTA

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	5
RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN.....	12
Historia de los medicamentos biotecnológicos.	12
JUSTIFICACIÓN.....	16
ANTECEDENTES.....	19
El Sistema Inmune y los anticuerpos.	19
El Sistema Inmune.....	19
Anticuerpos.	22
ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	29
Historia de la producción.....	29
Sistemas de expresión mamíferos.....	31
Avances Tecnológicos en la Producción.....	32
TERAPIA.....	42
Limitaciones.....	59
Inmunogenicidad: Generación de Anticuerpos Anti-Anticuerpos (ADAs).....	62
Selectividad: Cardiotoxicidad de Trastuzumab.....	65
PROTEÍNAS DE FUSIÓN.....	69
Fracción constante-proteína de fusión.....	72
Medicamentos aprobados y sus limitaciones.....	73
Perspectivas de aplicación.....	78
Anticuerpo monoclonal – proteína de fusión (citocinas): Terapia inmunomodulatoria.....	78
LEGISLACIÓN FARMACÉUTICA.....	90
Normatividad Mexicana y sus limitaciones.....	90
Aprobación Sanitaria en México.....	103
Normatividad Internacional: KEYTRUDA® (Pembrolizumab).....	111
Comité Internacional de Armonización.....	111
DISCUSIÓN.....	126
CONCLUSIONES.....	131

REFERENCIAS. (Por orden de aparición)	133
ANEXOS	141
Anexo 1	142
Tabla A1. Anticuerpos monoclonales aprobados para diciembre de 2017.	142
Anexo 2	153
Nuevas definiciones incluidas en la última versión de la NOM-059-SSA1-2015, Buenas Prácticas de fabricación de medicamentos, que impactan en la regulación de los medicamentos biotecnológicos.	153
Anexo 3	155
Resúmenes de las Guías ICH aplicables al proceso de manufactura de los medicamentos biotecnológicos para asegurar su calidad, seguridad y calidad.	155

ABREVIATURAS.

ACTIP	<i>Animal Cell Technology Industrial Plataform</i> (Plataforma Industrial de Tecnología Celular Animal).
ADA	<i>Anti-Drugs Antibodies</i> (Anticuerpos anti-anticuerpos).
ADN	Ácido Desoxirribonucléico.
ALK	Cinasa de Linfoma Anaplásico.
APD	<i>Antibody Phage Display</i> (Anticuerpos por Presentación de Fagos).
ARN	Ácido Ribonucléico.
BCM	Banco Celular Maestro.
BCR	<i>B Cell receptor</i> (Receptor de Células B).
BCT	Banco Celular de Trabajo.
BPF	Buenas Prácticas de Fabricación.
CAR	<i>Chimeric Antigenic Receptors</i> (Receptores antigénicos quiméricos).
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico complementario.
CDR	<i>Complementary-determining region</i> (Regiones Determinantes de Complementariedad).
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i> (Ovario de Hámster Chino).
CMV	Citomegalovirus.
CoA	Certificado de Análisis.
CPA	Células Presentadoras de Antígenos.
CPNM	Cáncer de Pulmón no Microcítico.
CPS	<i>Cancer Prevention Survey</i> (Estudio para la Prevención del Cáncer).
CSR	<i>Class Switch Recombination</i> (Recombinación por Cambio de Clase).
CTLA-4	Molécula-4 asociada a la función linfocitaria T citotóxica.
DCI	Denominación Común Internacional.
DOR	<i>Duration of Response</i> (Duración de la Respuesta).
DTC	Documento Técnico Común.
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epitelial.
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> (Ensayo por Inmunoabsorción ligado a Enzimas).
EMA	<i>European Medicine Agency</i> (Agencia Europea de Medicamentos).
Fab	Fracción variable.
Fc	Fracción constante.
FcGR	Receptor de la Fracción constante del isotipo G.
FcRn	Receptor de la Fracción constante indeterminado.
FDA	<i>Food Drug Administration</i> .
GD ₂	Disialogangliosido.
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Estimulating Factor</i> (Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos).
HR	<i>Hazard Ratio</i> (Radio de Peligro).

HER2	Factor de Crecimiento Epidermal Humano 2.
HGPRT	<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i> (Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa).
HLA	<i>Human Leukocyte-associated antigen</i> (Antígeno Leucocitario Humano).
ICH	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i> (Comité Internacional de Armonización).
Ig	Inmunoglobulina.
IND	<i>Investigation New Drug</i> (Nuevo Fármaco en Investigación).
INF γ	Interferón Gama.
INN	<i>International Nonproprietary Name</i> .
LFA-3	Porción de unión a CD2 del antígeno-3 asociado a la función linfocitaria.
mARN	Ácido Ribonucleico mensajero.
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complejo Mayor de Histocompatibilidad).
NK	<i>Natural Killer</i> (Asesinas Naturales).
NOM	Norma Oficial Mexicana.
NSO	<i>Nonsecreting Murine Myeloma</i> .
OMS	Organización Mundial de la Salud.
ORR	<i>Objective Response Rate</i> (Tasa de Respuesta Deseado).
OS	<i>Overall Survival</i> (Supervivencia Promedio).
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa).
pg	Picogramos.
PFS	<i>Progression Free Survival</i> (Supervivencia en Progresión Libre).
RIS	Radioinmunografía.
RIT	Radioinmunoterapia.
ScFv	<i>Single chain variable Fragment</i> (Anticuerpo monocatenario o fragmento Fv monocatenario).
SI	Sistema Inmune.
SIA	Sistema Inmune Adaptativo.
SII	Sistema Inmune Innato.
TCR	<i>T Cell Receptor</i> (Receptores de la Células T).
TdT	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase</i> .
TNF α	Factor de Necrosis Tumoral alfa.
TPS	<i>Tissue Polypeptide Specific Antigen</i> (Antígeno Específico Polipeptídico del Tejido).
USAN	<i>United States Adopted Name</i> .
VEGFA	Factor A del Crecimiento Vascular Endotelial.

RESUMEN.

Los medicamentos biotecnológicos se han convertido en un hito internacional, el conocimiento de su existencia e importancia ha crecido exponencialmente en las últimas dos décadas. Enfermedades crónico-degenerativas u oncológicas eran manejadas anteriormente con opciones terapéuticas en las que el perfil de seguridad de dichos medicamentos estaba en estrecho equilibrio entre su riesgo y su beneficio. Con la llegada de los anticuerpos monoclonales, la era de la terapia selectiva comenzó, al principio se creyó que, al tratarse de anticuerpos monoclonales, la selectividad y eficacia del medicamento mejorarían con respecto a la terapia disponible en aquel momento.

Con respecto a la eficacia terapéutica, no cabe duda de que la terapia biológica es considerada como la mejor opción para el tratamiento de patologías oncológicas o inmunodependientes (para aquellos que puedan costearla), esto se ve reflejado con la autorización de aproximadamente 350 medicamentos biotecnológicos con anticuerpos monoclonales (o sus derivados) como biofármacos desde la aprobación en 1986 de Orthoclone®, el primer medicamento biotecnológico con estas características.

Por su parte, el perfil de seguridad con el uso de anticuerpos no excluyó la presencia de reacciones adversas, tras el primer medicamento aprobado se observó que reacciones inmunogénicas y de rechazo se presentaban en los pacientes tratados debido a que los primeros anticuerpos monoclonales eran de origen murino. Con el paso del tiempo, nuevas tecnologías de biología molecular permitieron crear anticuerpos cada vez más homólogos a los producidos naturalmente por el ser humano. Sin embargo, la presencia de reacciones inmunogénicas no pudo excluirse en ninguno de los casos, llegándose a la conclusión de que cualquier proteína exógena es capaz de generar inmunogenicidad debido a mecanismos no dependientes de la secuencia de

aminoácidos sino de la conformación estructural espacial o perfiles de glicosilación presentes.

Ahora, pese a que la terapia con anticuerpos se le suele conocer como la terapia selectiva, estudios de Farmacovigilancia y Postmarketing han demostrado que no es tan selectiva como se cree. Como ejemplo de este último punto se encuentra Trastuzumab, un anticuerpo monoclonal empleado en la terapia contra cáncer de mama HER2 positivo, este ha demostrado una gran efectividad en monoterapia y en terapia combinada con agentes anticancerígenos orales, e inclusive ser superior a otras opciones terapéuticas como Pertuzumab. Sin embargo, del 1 al 4% de los pacientes tratados con Trastuzumab sufre de cardiotoxicidad debido a su efecto citotóxico en cardiomiocitos por el aumento de especies reactivas de oxígeno en el espacio citoplasmático.

Múltiples estrategias se han generado para mejorar el perfil de seguridad y selectividad de los anticuerpos y, por ende, de la eficacia terapéutica. Una de las estrategias más estudiadas y prometedoras son las proteínas de fusión, estas suponen un mejor perfil de seguridad del medicamento y una mayor selectividad al blanco terapéutico. Las proteínas de fusión pueden ser péptidos, ligandos que se activan al entrar en contacto con la superficie celular del receptor, péptidos señalizadores, dominios extracelulares de receptores que se dimerizan al entrar en contacto con moléculas blanco o proteínas completas. Estas proteínas de fusión se unen a la fracción Fc del anticuerpo monoclonal y generan cambios en dicho anticuerpo que se refleja en una mejora del perfil farmacológico y, a su vez, nuevas opciones terapéuticas disponibles.

Los medicamentos biotecnológicos que tienen como principio activo a los anticuerpos monoclonales involucran el uso organismos vivos para su producción. En un inicio, la generación de hibridomas fue la manera más innovadora de generar este tipo de moléculas, la cual se realizaba con la inmunización de

modelos animales para la extracción de células B y su posterior fusión con células con mieloma; tras el paso de los años y gracias a la innovación en técnicas de biología molecular, el uso de animales vivos se cambió por el uso de líneas celulares de mamíferos y otras técnicas tan específicas como lo es el uso de bacteriófagos modificados genéticamente para la producción de fragmentos de anticuerpos en cepas bacterianas. Para anticuerpos con proteínas de fusión, su fabricación requiere un segundo paso de producción, ya sea que el sistema sea capaz de unir las proteínas en el retículo endoplásmico como paso final en la síntesis o que, una vez sintetizado el anticuerpo, sea sometido a un proceso extenso de purificación y se le adicionen las proteínas de fusión *in vitro*. Sea como sea, esta nueva opción terapéutica promete ser líder en la terapia inmunomoduladora para el tratamiento de patologías oncológicas y se está posicionando como una de las primeras líneas de investigación a nivel mundial.

Como todo medicamento, la información generada durante su síntesis, purificación y acondicionamiento en la forma farmacéutica escogida debe ser revisada, verificada y validada por una Autoridad Sanitaria competente en el país en el que se desea comercializar. En México, la COFEPRIS es la Autoridad encargada de revisar dicha información, los requisitos para obtener la Autorización Sanitaria de comercialización deben cumplir con la normatividad mexicana aplicable y, como adicional, las recomendaciones del ICH. Una de las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) que más impactan es la NOM-059-SSA1-2015 de Buenas Prácticas de Fabricación de la cual se deriva la NOM-257-SSA1-2014 específica para medicamentos biotecnológicos, esta última contiene 9 numerales que, en comparación con las recomendaciones de la ICH, carecen en el grado de profundidad necesaria para que cualquier medicamento biotecnológico innovador pueda ser evaluado adecuadamente acorde con los estándares internacionales requeridos.

KEYTRUDA®, es un medicamento biotecnológico que contiene como biofármaco a pembrolizumab, un anticuerpo anti PD-1 y que tiene como primera opción de tratamiento, en México, el melanoma en cualesquiera de sus estadíos. Este medicamento tiene el récord de aprobación ante FDA (<4 años) debido a la eficacia terapéutica que presentó en los estudios clínicos y el tipo de pacientes para el que está dirigido, sin embargo, su aprobación en E.U.A. se vio condicionada debido a información faltante o no satisfaciente a las necesidades regulatorias del país. En Europa, la EMA detectó problemas similares a los encontrados por la FDA, pero aprobó al medicamento bajo ciertas condiciones debido a su indicación terapéutica propuesta en la solicitud de autorización. México, por su parte, en 2016 aprobó al medicamento en tan solo cuatro meses sin condición alguna o notificación concerniente a la información sometida gracias a no tener fundamentos legales suficientes con los cuales solicitar información adicional al titular del registro.

La generación de una nueva legislación que satisfaga las necesidades regulatorias internacionales es necesaria para asegurar el crecimiento económico del país y la inversión en la investigación clínica, de esta manera, México puede perfilarse como un frente legislativo confiable y robusto para el auge que los medicamentos biotecnológicos prevén.

OBJETIVOS.

- Investigar el desarrollo de las terapias biotecnológicas empleando anticuerpos monoclonales y sus derivados.
- Revisar los principales procesos de manufactura para la generación de anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión.
- Comparar el avance de la legislación en el ámbito de la autorización sanitaria para anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión en México contra la legislación internacional.

INTRODUCCIÓN.

Historia de los medicamentos biotecnológicos.

La palabra “biotecnología”, se empleó por primera vez en 1919 por el ingeniero húngaro Karl Ereky en su libro *Biotechnologie der Fleisch-, Fett-und im Milcherzeugung landwirtschaftlichen Grossbetriebe*, en dónde explicaba como el uso de tecnologías con materia biológica podía transformar la materia prima en productos de mejor calidad agrícola. En las últimas décadas esta palabra ha tomado diferentes significados, pero se le ha definido de una manera más adecuada como “Aplicación de las ciencias biológicas y principios ingenieriles para crear productos innovadores partiendo de materia prima de origen biológico” [Biotechnology Innovation Organization, 2019], por ejemplo, proteínas de uso terapéutico o alimentos transgénicos. Esta palabra poco a poco se escucha y se usa con mayor fuerza dentro del mundo científico y genera un particular interés alrededor el área agrícola, alimenticio y farmacéutico.

La biotecnología emplea organismos vivos o sus derivados biológicos para producir innovación; dentro de su campo de aplicación se encuentran aquellos productos de interés farmacéutico, que han atraído un particular interés para el tratamiento de patologías graves, complicadas o poco comunes de las cuales las opciones terapéuticas son limitadas o poco seguras para el paciente.

Es complicado establecer cuál fue el primer medicamento biotecnológico en la historia, ya que aquellos productos biológicos descubiertos como la penicilina de Fleming en 1928 no pueden entrar en esta categoría porque es un metabolito natural del género *Penicillium*, es decir, no se tuvo que realizar ninguna modificación para su obtención. Sin embargo, esta definición se tergiversa cuando nos referimos a la producción en masa de la penicilina, debemos resaltar que el primer escalamiento se generó en 1942 ocupando métodos biotecnológicos. Por lo que, si nos referimos a la penicilina como el primer biotecnológico resulta complicada esta afirmación sin referir un punto histórico. Lo que se puede

aseverar es que los medicamentos biotecnológicos han sido el foco de atención en las últimas dos décadas y cada vez más productos innovadores se aprueban año con año para salir al mercado e innovar la terapia disponible.

Para inicios de la segunda mitad siglo XX, la biotecnología comenzó a perfilarse entre el mundo científico como uno de los temas de interés más importantes; la generación de la línea celular HeLa por el Dr. Grey en 1952, el descubrimiento de la estructura tridimensional de la molécula de ADN por Rosalin Franklin, James Watson y Francis Crick en 1953, la generación de vacunas empleando por primera vez cultivos celulares en 1955 hasta el entendimiento del código genético en 1961. Fue a partir de este año, gracias a los avances científicos de la época, que el interés por generar moléculas con aplicación terapéutica empleando biotecnología creció exponencialmente y, por solo nombrar los más representativos, en la historia se encuentran: la primera insulina sintética producida por diferentes grupos de científicos en Estados Unidos, Alemania y China (1963), la primera vacuna contra el virus del Sarampión por Katz y Ender (1963), la primera vacuna contra la rubeola (1969) que posteriormente se combinó con las vacunas contra las paperas y sarampión saliendo al mercado como una de las primeras vacunas triples (1971), la primera vacuna contra la viruela aviar (1974), y el desarrollo del primer anticuerpo monoclonal por Milstein, Kohler y Jerne (1975) [AMGEN, 2019].

Para 1977, la primera bacteria modificada por ingeniería genética fue utilizada para sintetizar somatostatina (hormona inhibidora de la liberación de la hormona del crecimiento). Al siguiente año el Dr. Boyer sintetizó la primera insulina humana recombinante insertando los genes que codifican para esta proteína en una cepa de *Escherichia coli* para que fuera capaz de sintetizarla por sí sola; en ese mismo año las vacunas contra la neumonía neumocócica y la meningitis meningocócica fueron liberadas al mercado y marcando el inicio de lo que se conocería como la Era de los Biotecnológicos.

Fue hasta 1982 que el primer medicamento biotecnológico, la insulina humana recombinante de Eli Lilly, se aprobó a nivel mundial en Estados Unidos por la *Food Drug Administration* (FDA) comenzando la carrera por la investigación y desarrollo de medicamentos biotecnológicos. No pasó mucho tiempo cuando el mercado farmacéutico resintió la llegada de esta nueva clase de medicamentos y, dos años más tarde, los interferones para el tratamiento de cáncer se perfilaron entre los productos más innovadores y prometedores del mercado [Ashish, Shishir, Shruti, y Anchal, 2011]; la investigación en este campo (interferones) creció conforme pasaban los años y en 1990 la industria farmacéutica se percató de todas las posibilidades que existen con las nuevas técnicas biotecnológicas.

Los medicamentos biotecnológicos, representan una ventaja sobre los medicamentos por síntesis química en su farmacología, poniendo como ejemplo a los anticuerpos. Este tipo de biotecnológicos son más específicos con su blanco farmacológico gracias a que su fracción variable o Fab, tiene la capacidad de discernir entre múltiples moléculas y reconocer patrones específicos en el blanco terapéutico. En los últimos 20 años, opciones y alternativas terapéuticas para enfermedades crónico-degenerativas o autoinmunes han salido al mercado, interferón beta-1b (Betaseron®) contra la esclerosis múltiple, trastuzumab (Herceptin®) como monoterapia o en combinación con anticancerígenos orales contra el cáncer de mama HER2 (factor de crecimiento epidermal Humano 2) positivo, e Imatinib (Gleevec®) el primer fármaco gen-dirigido para pacientes con leucemia mieloide crónica [BIO, 2019]. Tras cada medicamento aprobado a nivel mundial, enfermedades que se creían incurables o que el tratamiento disponible no revertía ni curaba la patología sino simplemente controlaba la progresión o los síntomas asociados a la patología, dejaron de serlo. Con lo que, los pacientes que sufren este tipo de patologías tienen opciones en el mercado para ser tratados.

Hablando acerca de la manera en la que estos insumos para la salud son regulados, es conveniente mencionar que la Normatividad Mexicana define a los medicamentos biotecnológicos como:

“Toda sustancia o mezcla de sustancias de origen biotecnológico que tiene efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presenta en forma farmacéutica y se identifica por su actividad farmacológica o características físicas, químicas y/o biológicas”.

Para fines explicativos, es conveniente esclarecer la diferencia entre medicamento/producto biotecnológico y medicamento/producto biológico, ya que se hará énfasis únicamente en el primero de estos y para la legislación, un producto biológico y un biotecnológico no son sinónimos. Un medicamento/producto biológico es un producto farmacéutico en el cual el principio activo es producido por un organismo vivo y se ha extraído, purificado y modificado para su uso; mientras que un medicamento/producto biotecnológico es aquel producto farmacéutico en el cual el principio activo es producido por un organismo vivo, que ha sido modificado mediante ingeniería genética y se le ha adicionado un sustrato específico para aumentar la producción de cierto metabolito, el cual es extraído, purificado y modificado mediante procesos patentados.

JUSTIFICACIÓN.

Con la llegada de los medicamentos biotecnológicos, la era de la terapia blanco-selectiva dio comienzo, y los anticuerpos monoclonales, que encabezan la lista en investigación y desarrollo a nivel mundial, son los que lideran este tipo de terapia a nivel mundial. Estas opciones terapéuticas cuentan con una inversión anual de 160 millones de dólares con un potencial de crecimiento de 500 millones de dólares en el siguiente lustro, [El Economista, 2018].

Precedente a la existencia de estos medicamentos, enfermedades crónico-degenerativas y oncológicas eran tratadas con medicamentos poco selectivos y con un perfil de seguridad en el cual el riesgo igualaba prácticamente al beneficio pues el paciente no tenía otra alternativa disponible. Antes de 1986, las patologías que en la actualidad son tratadas con anticuerpos monoclonales como única o primera opción de tratamiento, eran un infortunio total para los pacientes recién diagnosticados. En la mejor de las opciones, el paciente era diagnosticado oportunamente en las primeras etapas de la patología o en un etapa “controlable/manejable” y se le prescribía el tratamiento más efectivo en la época advirtiéndosele de los eventos adversos más potenciales, asimismo, debía continuar asistiendo a revisiones periódicas para ver el avance o control de la patología y la eficacia del tratamiento (ajuste de dosis, nuevos eventos adversos o cambio de tratamiento por falta de apego terapéutico o falta de eficacia). Por otro lado, existió el caso en el que el paciente era diagnosticado tardíamente y las opciones terapéuticas eran limitadas, aunado a que el tratamiento prescrito no le aseguraba al paciente una calidad de vida adecuada sino simplemente un alivio temporal a los síntomas asociados (como lo fue la artritis reumatoide). El peor de los casos, que sigue presente en la actualidad, pero tenía una mayor prevalencia antes de 1986, es cuando el paciente era diagnosticado con una patología crónico-degenerativa que progresa velozmente y la terapia disponible no es la de primera elección, pero al ser un medicamento por síntesis química y tener diversos

blancos farmacológicos, alivia los síntomas asociados sin generar un efecto contundente en el paciente.

En 1986, el primer anticuerpo monoclonal fue aprobado a nivel mundial y marcó un nuevo avance en la medicina, desde ese año hasta el año 2018, han sido aprobados un estimado de 350 medicamentos biotecnológicos con anticuerpos monoclonales como principio activo acorde en la base de datos de la Organización Mundial de la Salud. Dejando afuera el hecho del excesivo precio que la terapia biotecnológica conlleva, la presencia de estas opciones terapéuticas es verdaderamente una “respiro” para pacientes con patologías no tan prevalentes o complejas, pero que requieren de un tratamiento especializado más allá de aliviar los síntomas asociados, como lo son artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, asma bronquial grave de origen alérgico, urticaria crónica y ciertos tipos de cáncer, entre otras.

A pesar del gran avance tecnológico que suponen los anticuerpos monoclonales, existen ciertos problemas de selectividad con el blanco farmacológico, como el que presenta el anticuerpo monoclonal Trastuzumab al indicarse en terapia combinada con antraciclinas o con su uso individual por periodos crónicos para el tratamiento de cáncer de mamá HER2 positivo; este anticuerpo ha denotado generar citotoxicidad en los cardiomiocitos. Asimismo, los anticuerpos monoclonales, a pesar de ser más específicos con el blanco, hay presencia de eventos adversos con el uso de estos, siendo el efecto adverso más representativo la generación de Anticuerpos Anti-Anticuerpos (ADA, por sus siglas en inglés *Anti-Drugs Antibodies*).

La manera en la que la industria farmacéutica ha intentado solucionar este problema, ha sido el aumentar la selectividad de los anticuerpos monoclonales a su blanco farmacológico empleando diferentes técnicas como la invención de las proteínas de fusión. Este último avance tecnológico implica que es necesario

adicionar pasos en la síntesis del anticuerpo, en el ensamble de la proteína de fusión, en la purificación de ésta y en su correcto aislamiento en el reactor de producción de aquellos productos de degradación, sustancias relacionadas o productos incompletos. Esto último no solo se traduce en un aumento en el tiempo y costo de producción, también involucra un nuevo reto acerca de cómo regular y asegurar a los pacientes y consumidores que el producto farmacéutico es de calidad, seguro y eficaz.

Con base en lo anterior, ¿Son los anticuerpos una verdadera innovación terapéutica?, ¿Cuáles es el alcance terapéutico de estas nuevas moléculas?, ¿Está México preparado para soportar el impacto regulatorio de la constante innovación que estas moléculas generan año con año? Y, sobre todo, ¿Tiene México los recursos para asegurar que el medicamento innovador es seguro, de calidad y eficaz?

ANTECEDENTES.

El Sistema Inmune y los anticuerpos.

Es importante mencionar como es que funciona el Sistema Inmune en el Humano para comprender lo esencial de su existencia, así mismo, esclarecer el proceso natural de producción de los anticuerpos para así comprender lo complejo de su biotecnología durante su producción y lo importante que es regular todo el proceso de producción para asegurar que los anticuerpos sintetizados son ampliamente funcionales.

El Sistema Inmune.

Es universalmente conocido que el Sistema Inmune (SI) es uno de los sistemas elementales del cuerpo humano que ha evolucionado para proteger al mismo. Todos los mamíferos, de entre ellos, los seres humanos viven en constante exposición a una carga densa de microorganismos patógenos y no patógenos y, a su vez, estos microorganismos se encuentran constantemente amanzanando la homeostasia del organismo. Tras el paso del tiempo, la evolución ha provisto al organismo de un SI capaz de tolerar a ciertos microorganismos comensales y benéficos que ayuden al organismo a desempeñar ciertas funciones y mantener controlada a la población patógena que se encuentra colonizando e impedir infecciones oportunistas [Chaplin, 2010]. El SI no solo se encarga de tolerar y, dado el caso, eliminar microorganismos patógenos, sino también de eliminar proteínas alergénicas o tóxicas y regularse por sí solo para evitar respuestas exacerbadas que generen daño a los tejidos u órganos o que eliminen la microbiota benéfica del hospedero.

Como el SI se encuentra en constante amenaza, ha desarrollado una amplia gama de mecanismos de control y defensa contra los constantes riesgos y problemas. La manera más efectiva que ha desarrollado para reconocer el peligro o riesgo potencial es mediante el uso de dos grandes mecanismos: El Sistema Inmune Innato (SII) y el Sistema Inmune Adaptativo (SIA).

El SII se basa en el reconocimiento de patrones moleculares que, en su gran mayoría, no están presentes en el organismo y ha sido programado genéticamente desde la línea germinal, estando presente en un gran número de células en el organismo y cuya respuesta se dispara inmediatamente después de ser detectado un elemento extraño en el organismo. Por su parte, el SIA se basa en una respuesta que se encuentra codificada genéticamente en ciertas células y que es expresada somáticamente generando diferentes rearrreglos genéticos para así sintetizar moléculas antígeno-específicas y únicas para las diversas estructuras y/o moléculas extrañas; las células que componen este sistema requieren entrar en contacto con el elemento extraño para proliferar y generar células específicas que generarán las moléculas antígeno-específicas [Chaplin, 2010]. Por lo tanto, este sistema se expresa automáticamente un periodo después de activado el SII. Algo importante que debemos resaltar es la particularidad del SIA de generar células que permanecen en estado de latencia en el organismo y que se activan de inmediato al detectar al elemento extraño invadiendo el organismo sin la necesidad de generar todo el proceso de reconocimiento, activación, rearrreglo y proliferación, generando una respuesta inmediata.

Hablando acerca de aquellas moléculas antígeno-específicas que se mencionaban anteriormente, el SIA tiene la capacidad de generar estas moléculas especiales que tienen una alta especificidad para el antígeno blanco. El SIA cuenta en su arsenal con células específicas de entre las que destacan las Células o Linfocitos T y las células o Linfocitos B, la respuesta adaptativa se basa principalmente en la capacidad de los receptores presentes en la superficie de los linfocitos T y Linfocitos B los cuales son antígeno específicos, estos receptores son codificados por genes que son ensamblados por un rearrreglo somático de la línea germinal basal del Linfocito T y/o B para generar un receptor de la célula T o TCR por su siglas en inglés (*T cell receptor*) o inmunoglobulinas también llamadas anticuerpos (como el Receptor de los Linfocitos B) [Chaplin, 2010].

La manera en la que el SIA funciona y produce las moléculas antígeno-específicas denominadas anticuerpos no es sencilla. Para que el Linfocito T se active requiere de la identificación de células infectadas en los tejidos u órganos, esto se logra mediante el reconocimiento de la superficie celular de la célula infectada y alguna estructura del patógeno que se encuentra colonizando; gracias a la presencia de las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (o MHC, por su siglas en inglés, *Mayor Histocompatibility Complex*) o Antígeno Leucocitario Humano (HLA, por sus siglas en inglés *Human Leukocyte-associated antigen*), que son glicoproteínas de membrana que unen fragmentos de proteínas que han sido sintetizadas en el interior celular (MHC de clase I) o que han sido fagocitadas y procesadas proteolíticamente para ser presentadas (MHC de clase II). Las moléculas de Histocompatibilidad se encuentran presentes en un tipo de células especiales que se encuentran distribuidas en todo el organismo y superficies corporales denominadas Células Presentadoras de Antígeno (CPA).

Para el caso del MHC de clase I, este presenta antígenos denominados endógenos pues son sintetizados en el interior de la célula, debido a que esta célula se encuentra infectada; el TCR de los linfocitos T únicamente reconoce antígenos cuando este se encuentra anclado a la molécula de HLA y así ignorar antígenos extracelulares libres y enfocarse en las células que presentan el antígeno. Para el caso en que células son infectadas por microorganismos patógenos y no son CPA, el reconocimiento de estas células permitirá enfocar la respuesta. Por su parte, el MHC de clase II presenta antígenos que han sido fagocitados o sufrido de endocitosis y posteriormente proteolizados al fusionar el fagosoma o endosoma con los lisosomas de la CPA y los fragmentos resultantes son acumulados para ser presentados en el MHC de clase II. Cabe resaltar que esta clase de moléculas se presenta constitutivamente en células B, células dendríticas, monocitos y macrófagos [Chaplin, 2010].

Existen dos tipos de Linfocitos T principales, los CD4⁺ diseñados para ser cooperadores y los CD8⁺ que tienen actividad citotóxica para infecciones intracelulares. Los CD4⁺ están diseñados para activar tanto la respuesta inmune humoral, mediada por Linfocitos B, y celular, de tipo tardía mediada por hipersensibilidad. Además, los CD4⁺ tienen la capacidad de diferenciarse, dependiendo del estímulo químico del medio, en Th1 (se encargan de auxiliar y mediar la respuesta celular), o Th2 (se encargan de mediar las respuestas alérgicas y la respuesta inmune humoral). Para efectos de esclarecer el camino que conlleva la activación de las células B para la producción de anticuerpos, los Linfocitos Th2 son esenciales en este proceso.

Ahora, como ya se ha mencionado, las células encargadas de producir anticuerpos en el organismo son los Linfocitos B, que constituyen aproximadamente el 15% de los leucocitos en sangre periférica. La diferenciación de los Linfocitos B de la célula troncal ocurre en el proceso hematopoyético por la presencia de la citocina IL-17 producida por el estroma de la médula ósea y estas células, por acción de enzimas somáticas como la recombinasa (o la TdT por su abreviación del inglés, *Terminal deoxynucleotidyl transferase*), son las encargadas de generar los diferentes rearrreglos génicos que darán pie a la generación de los diversos tipos de anticuerpos.

Anticuerpos.

Los anticuerpos son moléculas que están compuestas de dos cadenas pesadas idénticas de 50 kDa y dos cadenas ligeras idénticas de 25 kDa ya sean kappa (K) o lambda (λ). En cada una de las cadenas ligeras y pesadas, la porción N-terminal varía de anticuerpo en anticuerpo con respecto a la secuencia de aminoácidos. A las porciones de variabilidad se le han denominado como V_H, V_K & V_λ, siendo la primera para la porción variable de la cadena pesada y las últimas dos para las cadenas ligeras kappa (K) y lambda (λ), respectivamente. La yuxtaposición de un segmento V_H & un segmento de V_K o V_λ genera una porción de unión antigénica

para cada molécula de inmunoglobulina. Ambas regiones variables de las cadenas ligeras y de las cadenas pesadas tiene tres subregiones que tienen una capacidad de variabilidad altísima y propicia la gran gamma de anticuerpos específicos para los diversos antígenos endógenos y exógenos, estas subregiones de hipervariabilidad se unen en la formación de los anticuerpos para generar el dominio de unión antigénica de cada molécula. Por su parte, la región C-terminal de cada cadena son constantes entre ellas y entre subclases de anticuerpos. Las secciones constantes de las cadenas pesadas se unen para formar el denominado dominio Fc o Fracción constante, esta región tiene la característica de contener la gran mayoría de las funciones efectoras de cada anticuerpo, incluyendo las regiones activadoras del complemento y aquellas que son reconocidas por receptores para la unión a superficies celulares.

Para poder explicar cómo es que las células B producen los diversos tipos de anticuerpos es necesario mencionar que los genes que codifican para las cadenas ligeras K están codificadas en el cromosoma 2, mientras que para las cadenas λ están se encuentran codificadas en el cromosoma 22. El complejo locus de las cadenas pesadas se encuentra codificada por la serie de elementos génicos V (variable), seguido del segmento D (diversidad), estas únicamente para el gen de las cadenas pesadas; algunos segmentos J (unión) y exones C (regiones constantes). Los genes para las regiones constantes de ambos tipos de cadenas ligeras K y λ se encuentran codificadas como exones únicos [Chaplin, 2010]. El gen para las cadenas pesadas, a diferencia, contiene diferentes exones que codifican para 9 diferentes regiones constantes que son empleadas para generar las diversas clases y subclases.

Las células B, a diferencia de las células T que maduran en el Timo, se diferencian en la médula ósea en el proceso hematopoyético, ahí mismo maduran y salen al torrente sanguíneo con los receptores antigénicos ya formados (inmunoglobulinas en la superficie celular funcionan como sus receptores). En este caso, la porción N-terminal de cada cadena pesada es generada por la unión somática de los

segmentos génicos codificantes variables (V_H), diversas (D_H) y de unión (J_H). La unión de las regiones constantes y variables en diferentes combinaciones dan paso a la generación de la porción terminal de las cadenas ligeras. Las uniones entre las tres regiones (VDJ) y su recombinación permite la generación de las tres regiones de hipervariabilidad, antes mencionadas, que contribuyen a la formación del sitio de unión antigénica. Estas regiones de hipervariabilidad se encuentran dentro de la región variable de los anticuerpos, y son denominadas CDR o Regiones Determinantes de Complementariedad, las cuales son las encargadas de unirse a los diversos antígenos. La unión de estas tres regiones conforma una zona llamada parátipo. Cada trío se encuentra ubicado en la región variable de cada cadena (CDR1, CDR2y CDR3) y cada brazo del anticuerpo en forma de “Y” contiene, por lo tanto, seis CDR; generando en total 12 CDR en una única molécula de anticuerpo, como se observa en la Figura 1, ilustrando la estructura general de un anticuerpo de tipo IgG [National Institutes of Health (NIH), 2011].

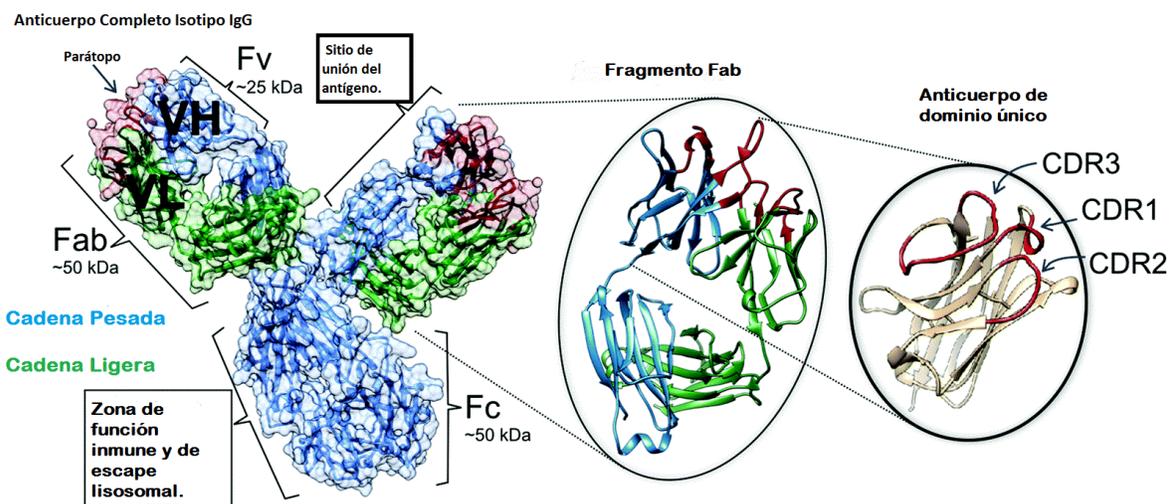


Figura 1. Estructura general de un anticuerpo del isotipo G [Sormani, P. et.al., 2018].

Ahora, es necesario explicar los diferentes rearrreglos que ocurren en el material genético de las células B para esclarecer el cómo es que se generan las diversas clases y subclases de anticuerpos. Primero, el complejo enzimático de la

recombinasa cataliza la fusión de una de las regiones génicas de D_H con un segmento de la región J_H con la delección de las secuencias de ADN que intervienen, dicha recombinación ocurre en ambos cromosomas del material genético de la célula B. El siguiente paso es la recombinación en ambos cromosomas de la región V_H con el complejo recombinado D_HJ_H por la acción de la recombinasa nuevamente. Hecho este arreglo, la enzima TdT comienza su expresión, resultando en la adición de nucleótidos aleatorios en los sitios de recombinación D_H-J y $V_H-D_HJ_H$, permitiendo la generación de diferentes secuencias de aminoácidos tras la transcripción de la región recombinada $V_HD_HJ_H$.

Esta sección génica recombinada forma la región 5' del exón que codificará para la cadena pesada del futuro anticuerpo, que es seguida río abajo por exones que codifican la región constante de la cadena m que se une con la recién sintetizada cadena ligera para producir un anticuerpo de tipo IgM, río más abajo se encuentran los exones que codifican para la región constante de la cadena d que se usa para generar anticuerpos IgD. La cadena μ & δ son producidas como resultado de un splicing alternativo del ARN (Ácido Ribonucleico) del exón $V_HD_HJ_H$ generando el exón μ o el exón para δ ya transcrito en ARN [Revista *Nature (milestone 7)*, 2016].

La manera en la que las células B se diferencian para producir un solo isotipo de anticuerpo (IgM, IgD, IgG, IgA o IgE) es mediante la expresión de un transcrito funcional a partir de $V_HD_HJ_H$ y la síntesis de una cadena pesada funcional, esta cadena pesada recién sintetizada es pareada con dos proteínas, $\lambda 5$ y VpreB, que actúan como una cadena ligera subrogada la cual se moviliza a la superficie celular para prevenir que ocurra el rearrreglo genético de V_H con D_HJ_H en el otro cromosoma asegurando que el Linfocito B naciente produzca un anticuerpo específico para los diversos epítomos [Chaplin, 2010].

Una vez que la cadena pesada es funcional, la síntesis de la cadena ligera comienza. Primero, los elementos génicos V_K y J_K sufren de arreglos para generar una secuencia que codifique para una cadena ligera funcional K que será unida con la cadena pesada funcional (m, d, e, a o g) ya sintetizada y así producir los 5 diferentes isotipos de anticuerpos. Si el rearrreglo de K no genera una cadena funcional, el rearrreglo ocurre en el otro cromosoma. Si esto falla nuevamente, ocurre el rearrreglo para generar cadenas ligeras λ .

Existen 5 isotipos de anticuerpos producidos por los Linfocitos B, las inmunoglobulinas M (IgM), inmunoglobulinas G (IgG), inmunoglobulinas A (IgA), inmunoglobulinas E (IgE) e inmunoglobulinas D (IgD). Cada isotipo de anticuerpo tiene un papel inmunológico: las inmunoglobulinas del isotipo M (IgM) y las IgD funcionan como la primera línea de defensa; las IgA son secretadas desde tejidos mucosos para prevenir la colonización de microorganismos potencialmente patógenos; las IgE se unen a alérgenos y parásitos para ser eliminados; mientras que los IgG y sus varias subclases provee la inmunidad contra la gran mayoría de los patógenos existentes. Los diferentes isotipos van desde los 150, 000 dalton (IgG) hasta los 900, 000 dalton (IgM), aproximadamente; representando un tercio del peso la fracción constante (50, 000 dalton aprox.) y todos teniendo una estructura similar a una "Y".

Cabe señalar que, en el ciclo de vida de los Linfocitos B, tras el rearrreglo de $V_H D_H J_H$, la cadena pesada funcional que primero se expresa es la m (Linfocito pre-B), ocurriendo después el rearrreglo $V-J_K/V-J_\lambda$ y así generar en la superficie únicamente IgM para luego ser expresada la cadena d y generar en el Linfocito B inmaduro anticuerpos del isotipo IgD e IgM. Hasta este punto, el Linfocito B se le considera maduro al expresar únicamente en superficie anticuerpos IgM e IgD, este Linfocito maduro migra a los tejidos linfoides y bajo influencia del microambiente químico de citocinas generado por los Linfocitos T (IL-4 e INF- γ) ocurren mutaciones somáticas que permiten el cambio de isotipo a anticuerpos

IgA, IgE o IgG y la maduración final a células plasmáticas que son las que se mantienen en el organismo en estado de latencia y funcionan como memoria inmunitaria.

Las mutaciones somáticas para generar el cambio de isotipo se llevan a cabo por el proceso descrito como Recombinación para cambio de clase o por sus siglas de inglés CSR (Class-switch recombination) [Revista *Nature (milestones 8)*, 2016]. La CSR fue descubierta en 1970 por Alfred Nisonhoff y su colega, que descubrieron cadenas ligeras idénticas en IgG e IgM aislados de un paciente con mieloma, además de una secuencia de 27 aminoácidos idénticos en las cadenas pesadas. Dado que las regiones V son de alta variabilidad, la presencia de estas secuencias compartidas indicaba que ambos isotipos de anticuerpos tenían el mismo origen; por lo que se dedujo que durante la activación y expansión clonal de los Linfocitos B ocurría un evento de cambio estructural para generarlos. Los linfocitos B naive o pre-B producen únicamente cadenas pesadas con la región constante C_{μ} (IgM) y posteriormente es expresada la región C_{δ} (IgD), pero durante la maduración y diferenciación es activado el proceso CSR, el cual consiste en un evento de recombinación de ADN en el locus para las cadenas pesadas que permite la sustitución de la región C_{μ} por la región C_{γ} (IgG), por la región C_{ϵ} (IgE) o por la región C_{α} (IgA) y es por ello que el Linfocito B es capaz de producir un diferente tipo de anticuerpo.

Los Linfocitos T juegan un papel importante para que ocurra el cambio de isotipo, la presencia de IL-4 o INF- γ influye mucho en el proceso, mientras el primero promueve la expresión de los isotipos IgE e IgG1 (una subclase del isotipo IgG por pequeñas variaciones en la cadena pesada); la segunda, inhibe la producción de los primeros y promueve la generación de IgG2a [Revista *Nature (milestones 8)*, 2016].

Con base en lo anterior, la generación de anticuerpos funcionales de manera biológica es un proceso altamente complejo, regulado y bien estructurado. Por lo tanto, para antes de 1975, la generación de anticuerpos *in vitro* era un proceso complicado de establecer, manejar y realizar. La manera en que se estudiaba el funcionamiento de estas moléculas era a través de modelos animales con muestras sanguíneas o de tejido y se tenía poco entendimiento de cómo es que estas moléculas son tan específicas y de cómo se realizaba su producción.

ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Un anticuerpo monoclonal, es llamado así por ser producido por una única clona de Linfocito B, y tienen la capacidad de unirse al mismo epítopo que es reconocido con alta especificidad gracias a la selectividad de la fracción variable o Fab del anticuerpo [Liu, 2014].

Historia de la producción.

El 7 de agosto de 1975 César Milstein y George J.F. Kohler publicaron en la Revista *Nature* el método para generar una gran cantidad de anticuerpos monoclonales altamente específicos a su blanco. A grandes rasgos, como se muestra en la Figura 2, esta técnica consiste en inmunizar a cierta especie animal contra cierto epítopo o antígeno para luego obtener Linfocitos B del bazo del animal inmunizado. Los Linfocitos B se fusionan (ya sea por métodos químicos o con virus) con una línea celular inmortal de mieloma que posea una característica especial como se ilustra en la Figura 2, por ejemplo, carecer del gen para codificar la hipoxantin-guanin-fosforibosiltransferasa (HGPRT), que es una enzima presente en mecanismos de “salvación” cuando son requeridos nucleótidos *de novo* y sin contener alguna otra célula productora de inmunoglobulinas, lo que provoca que en un medio con aminopterina, el crecimiento de este tipo de células sea inhibido y la selección de aquellas células productoras de anticuerpos sea más sencilla. A esta nueva línea celular generada se le denomina hibridoma, el cual posee la capacidad de producir anticuerpos ilimitadamente gracias a las características conferidas por las Células B, ser inmortal por las células con mieloma y no verse inhibido su crecimiento con aminopterina por tener la enzima HGPRT conferida por la línea parental de Células B [Liu, 2014].

El medio original de hibridomas contiene una mezcla de anticuerpos producidos por la diversas clonas del Linfocito B primario, es decir, cada Linfocito B secreta su anticuerpo específico en el medio (los anticuerpos siguen siendo policlonales, es decir, son diversos anticuerpos y reconocen diferentes epítopos). Cada clona

puede ser separada mediante diluciones en diferentes pozos con medio de cultivo. Posteriormente, dichos pozos pueden ser analizados para determinar cuál de ellos tiene el anticuerpo con la actividad específica por la cual se diseñó, seleccionar la clona de donde proviene y promover su crecimiento mediante la activación de su expansión clonal para después evaluar la actividad del anticuerpo, asegurando que la clona seleccionada es la adecuada. Las clonas de hibridomas seleccionadas, que producen el anticuerpo monoclonal de elección, se almacenan en nitrógeno líquido para poder preservarlos hasta su uso.

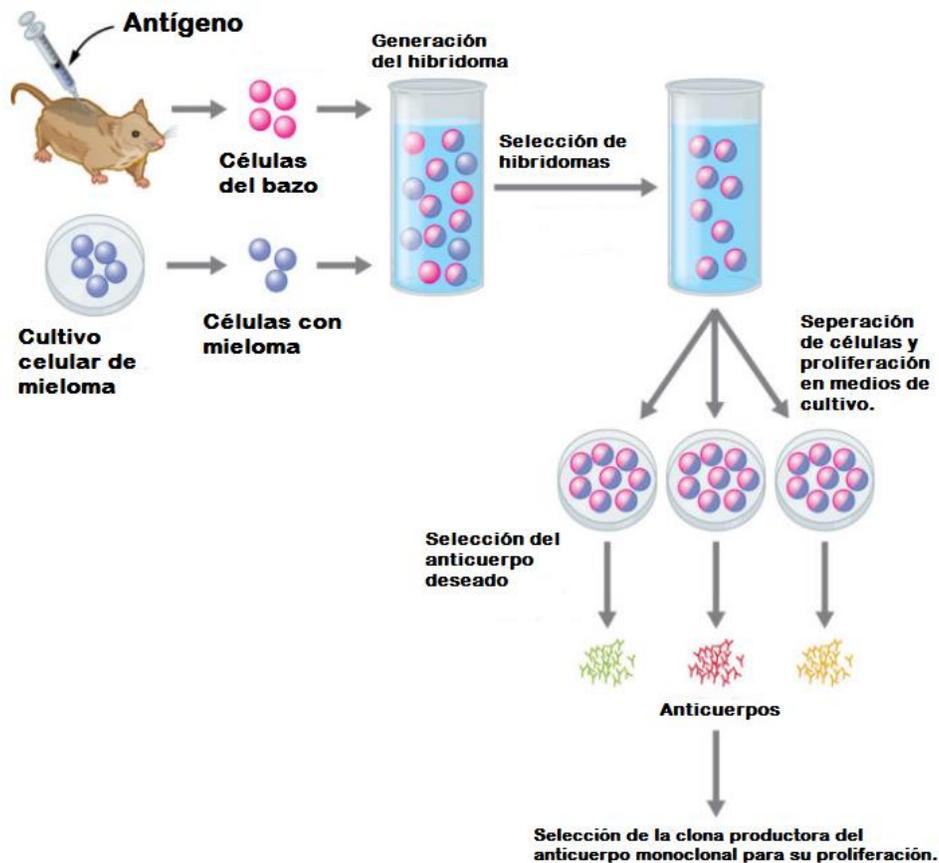


Figura 2. Esquema del uso de hibridomas para la producción de anticuerpos monoclonales descrita por Milstein y Kohler en 1975 [Lumen Learning. Microbiology, 2019].

Sistemas de expresión mamíferos.

A partir del descubrimiento de César Milstein y George J.F. Kohler, el mundo científico se encargó de modificar, innovar y mejorar la producción de anticuerpos monoclonales. Con el paso del tiempo, la idea consistió en eliminar el uso de animales vivos para la generación de anticuerpos y hacer técnicas más limpias y bioéticas. Por lo que, en la actualidad, se han establecido las líneas celulares de mamíferos como la forma predilecta para la producción de mAbs (anticuerpos monoclonales), de entre las que destacan NS0 (células con mieloma murino), línea celular humana PER.C6® y la línea celular de Ovario de Hámster Chino (CHO). La línea celular NS0 es una línea no secretora de inmunoglobulinas y es auxótrofa a colesterol y ausente de glutamin sintetasa (sin embargo, hay ciertas versiones que son protótrofas y que poseen la enzima). NS0 tiene la capacidad de producir ácido N-glicolineurámico, anteriormente se creía que era inmunogénico hasta que se descubrió que es adicionado a las proteínas sintetizadas *de novo* y se extrae de otros alimentos. Desafortunadamente tienen la capacidad de producir uniones alfa-Gal-alfa (1,3) que son un blanco para el sistema inmune y la generación de anticuerpos anti-anticuerpos, por lo que esta línea celular no es tan empleada para la producción en gran escala, es más utilizada para investigación primaria a nivel *in vitro*.

Las células PER.C6® son derivadas de células embrionarias de retina humana que han sido inmortalizadas por técnicas de biología molecular y pueden proliferar sin necesidad de adicionar sueros enriquecidos. La línea celular CHO, por su parte, son las predilectas para generar mAbs de entre todas las líneas celulares, son más estables que las otras líneas, de fácil escalamiento y conservación.

Los sistemas de expresión de mamíferos típicamente contienen más de un casete; usualmente contienen un casete de genes que codificarán para el futuro mAb y genes que codificarán para marcadores de selección y otro casete que tiene los genes necesarios para permitir la replicación autónoma como lo hacen aquellos

plásmidos autoreplicativos presentes en bacterias. Para alcanzar altos niveles de expresión, suelen tener potentes promotores y enhancers como el promotor aislado del CMV (citomegalovirus) y un promotor de elongación factor alfa (EF1 α).

Una secuencia de un intrón en la región 5' sin traducir es incluida después del promotor y enhancers para incrementar la exportación del mRNA (ARN mensajero) al citoplasma desde el núcleo y un intrón más en la región 3' en la secuencia de poliadenilación son incluidas para maximizar los niveles de mRNA. La secuencia de poliadenilación es comúnmente extraída el SV40 y/o de la presente en la secuencia codificante de la hormona de crecimiento bovina. [Li, 2010]. Para mejorar la transcripción, traducción y secreción del mAb se coloca, comúnmente, una secuencia Kozak (GCC GCC (A/G) GC) en frente del primer codón de traducción para potenciarla seguido de una secuencia codificante para un péptido señal que permitirá dirigir la proteína hacia el exterior.

Con respecto a los marcadores de selección, la producción de anticuerpos se puede llevar a cabo usando dos diferentes marcadores juntos colocados en el mismo constructo que codifica para las cadenas pesadas y ligeras o en plásmidos separados en donde cada uno contiene los genes codificantes para ambas cadenas, de esta manera la selección de clonas productoras es más eficiente y selectiva.

Avances Tecnológicos en la Producción.

La necesidad de generar nuevos métodos de producción radicó en que, a pesar del avance médico y tecnológico que el uso de hibridomas representaba, un mayor problema se presentaba con su uso. Las opciones para producir anticuerpos monoclonales se limitaban al uso de hibridomas provenientes de líneas celulares usualmente de modelos murinos, esto implicaba que los anticuerpos producidos no fueran humanos y tuvieran un perfil de eventos adversos debido a reacciones inmunes agudas severas. Otro problema que presentan los hibridomas es que son

genéticamente inestables, en términos de escalamiento y capacidad de manufactura. Las líneas celulares de mamíferos, durante la historia, se han caracterizado por solo poder crecer en medios altamente complejos y ser de gran costo, tener bajos rendimientos, requerir aditamentos especiales como sueros que permitan y ofrezcan los nutrientes necesarios para el crecimiento celular adecuado y ser muy sensibles a la humedad relativa que las rodea [Li, Vijayasankaran, Shen, Kiss & Amanullah, 2010].

Es conveniente mencionar que el proceso general de producción a partir de cultivos celulares para la mayoría de los anticuerpos monoclonales utilizados con fines terapéuticos comienza con la selección de la línea celular, seguida de la generación del hibridoma y proliferación. Una vez seleccionada, el siguiente paso consiste en generar un sistema de expresión a baja escala que incluirán hasta placas con 96 pozos, matraces con agitación continua y biorreactores de pequeño escalamiento para el análisis y selección de las células productoras del anticuerpo deseado y evaluar sus condiciones óptimas de crecimiento y producción. Cuando las condiciones de trabajo y producción han quedado establecidas, las clonas seleccionadas son almacenadas apropiadamente para generar un Banco Celular Maestro del cual se extraerán clonas y se generará un Banco Celular de Trabajo con el cual comenzará el escalamiento para que los anticuerpos producidos sean empleados para evaluaciones de toxicidad preclínica y así escalar nuevamente la producción para generar biomedicamentos requeridos para los estudios clínicos. Como último, se realiza el escalamiento final para la fase de comercialización [Li, 2010].

El descubrimiento en 1975 de Milstein y Kohler fue capaz de producir anticuerpos en gran cantidad y de una manera relativamente eficaz, en comparación con los métodos anteriores. Sin embargo, como se mencionó con anterioridad, los anticuerpos monoclonales producidos eran completamente murinos y su perfil de eventos adversos por la generación de anticuerpos anti- proteínas de origen

murino se presentaba en la gran mayoría de los casos, provocando que el uso de esta terapia innovadora no fuera una gran opción de tratamiento. Por ello, la necesidad de una síntesis de anticuerpos más seguros y de mejores tecnologías empleadas para su producción, evolucionaron con el fin de producir anticuerpos monoclonales con secuencias proteicas de origen humano.

Recientemente, múltiples sistemas de expresión han sido desarrollados alrededor del mundo. De entre estos, uno de los más destacables es el desarrollado en una cepa de *Escherichia coli*, la cual fue modificada genéticamente para poder generar un sistema de expresión de fragmentos de anticuerpos como fragmentos variables de cadena única (scFv por sus siglas en inglés *single-chain variable fragments*), así como fragmentos de unión antigénica o Fab por sus siglas en inglés (*antigen-binding fragments*), dicha técnica está íntimamente ligada con la técnica de generación de anticuerpos por Presentación de Fagos (APD, por sus siglas en inglés *Antibody Phage Display*). Sin embargo, este sistema de expresión está lejos de poder sintetizar anticuerpos completos (generar ambas cadenas pesadas y ligeras, así como la generación de puentes disulfuro que una las cadenas sintetizadas); esto se debe al pequeño tamaño del microorganismo y a la maquinaria de síntesis saturable y no tan compleja como la que tienen las células eucariotas. Estos sistemas procariontes suelen estudiarse más para la producción de fragmentos de anticuerpos ausentes de glicosilación y, si de alguna manera se lograran sintetizar anticuerpos completos en estos sistemas, las posibilidades de producción serían mejor enfocados en la síntesis de anticuerpos ausentes de glicosilación, pues el sistema de expresión de *E. coli* carece de enzimas glicosilantes y los anticuerpos producidos se dirigirían a terapias bloqueantes de interacción proteína-proteína que a terapias que involucran la interacción con receptores para desencadenar respuestas efectoras inmunes para el reconocimiento o destrucción celular mediado por el sistema inmune.

La ingeniería de la fabricación de anticuerpos monoclonales cambio por completo después de Winter y Milstein, en 1991, gracias a los avances tecnológicos en materia de biología molecular de la época, lograron clonar los genes codificantes para los anticuerpos IgG y lograron recombinarlos genéticamente en sistemas de expresión eucariontes. Esto significó la posibilidad de generar anticuerpos recombinantes de diversas líneas celulares y solucionar los problemas de seguridad que suelen presentarse con anticuerpos de origen murino.

Una de las aplicaciones de la nueva ingeniería genética fue la posibilidad de crear anticuerpos monoclonales quiméricos, gracias a que la actividad de unión-reconocimiento de los anticuerpos IgG se debe a los dominios variables de las cadenas pesadas y de las cadenas ligeras. Los anticuerpos a través de la evolución han conservado su estructura, gracias a esto, la fusión de dominios variables producidos en líneas celulares murinas, responsable de la actividad específica de los anticuerpos, y de los dominios constantes de anticuerpos humanos es posible; esto conlleva a la generación de una gran cantidad de posibilidades terapéuticas [Chames, Regenmortel, Weiss & Baty, 2009]. Estos anticuerpos quiméricos son 70% humanos, poseyendo fracciones Fc completamente humanas, esto le confiere al nuevo anticuerpo la capacidad de ser menos inmunogénico (defínase inmunogénico como la capacidad de una molécula para generar una respuesta inmune completa), al emplearse como terapia en humanos; esto último se debe a que las fracciones completamente humanas son capaces de interactuar libremente con receptores celulares del sujeto y desencadenar respuestas celulares efectoras completas.

Con la nueva ingeniería genética se intentó disminuir la fracción murina, el reto fue reemplazar las zonas de hipervariabilidad de los anticuerpos monoclonales murinos por las zonas de hipervariabilidad de anticuerpos humanos conservando la selectividad que su producción tiene por objetivo. Esta nueva tecnología en la producción de anticuerpos fue posible gracias al llamado injerto de la región

determinante-complementaria, más reconocida en inglés con el nombre de *complementary-determining region grafting*, generando anticuerpos 85-90% humanos y siendo denominados anticuerpos monoclonales “humanizados” [Malbris, Davies, Glasebrook, Tang, Glaesner & Nickoloff, 2016]. El gran avance tecnológico que los anticuerpos humanizados representó, al ser menos inmunogénicos que los anticuerpos quiméricos y, a su vez, menos que los murinos; implicó pasos extras para crear estos biotecnológicos, siendo uno de los más complicados la mutagénesis dirigida para regenerar la afinidad presente en las líneas celulares murinas parentales, debido a que este proceso era mucho más complejo que la fusión de dos fracciones en los anticuerpos quiméricos.

Otra gran novedad biotecnológica devino a la par del descubrimiento de los hibridomas para la producción de anticuerpos monoclonales, esta nueva técnica fue descrita por Smith en 1985 pero establecida y patentada tiempo después por Winter, McCafferty, Lerner y Barbas en 1990, y consiste en la generación de anticuerpos por presentación de fagos. Esta técnica, como cualquier otra técnica desarrollada *in vitro*, depende en gran parte de la capacidad o habilidad de establecer un vínculo físico entre una proteína y la secuencia genética que codifica para la misma (ver Figura 3). El proceso de APD comienza con la generación de una librería de anticuerpos seguido por la unión de los productos de PCR de la cadena pesada (V_H) y la cadena ligera (V_L) con el vector de fago apropiado culminando en el análisis de las clonas productoras de mAb presente en la cápside de bacteriófago. Cabe resaltar que esta es una de las técnicas más específicas, complejas y mejor estructuradas para la generación de anticuerpos monoclonales.

Como se muestra en la Figura 3, todo comienza con la selección de la línea celular indicada o deseada de la cual se extraerá el RNA codificante proveniente de los genes de interés a producir V_H y V_L , la clave del éxito para esta técnica es la selección del ARN indicado, su aislamiento y purificación. Este ARN se transcribe

en cDNA con una transcriptasa inversa, el cDNA transcrito será usado para aislar las regiones codificantes para las denominadas scFv, en este caso Fab, mediante la técnica de PCR y obtener los scFv amplificados. La generación de la biblioteca de anticuerpos se logra generando diferentes primers para aislar múltiples regiones del cDNA considerando todos los posibles rearrreglos que dan lugar a los diferentes isotipos de anticuerpos; de esta manera se pueden generar dos tipos de bibliotecas dependiendo del set de primers utilizados: bibliotecas de constructos para los diferentes isotipos o bibliotecas de constructos para diferentes scFv o Fab, que son en sí las fracciones V_H y V_L que después se unen mediante ligadores.

Los productos de PCR, son ligados en un vector de fago (usualmente el pComb3X) que está diseñado para expresar las fracciones V_H y V_L como scFv fusionados a pIII, la cual es una proteína filamentosa menor de la cápside del bacteriófago de *E. coli*, originalmente derivado del bacteriófago M13. Sin embargo, el vector empleado, pComb3X, no tiene los genes necesarios para codificar un bacteriófago completo e ir por un ciclo lítico; por ello, se adiciona un fago auxiliador de *E. coli* el cual es transfectado para formar parte de la biblioteca. Este nuevo vector tiene la capacidad de producir mAb sin estar anclados a la cápside del bacteriófago y encontrarse en el citoplasma de ciertas cepas de *E. coli*, generando scFv y mejorando la capacidad de producción de nuevos bacteriófagos con anticuerpos anclados en su cápside. Adicionalmente, al vector se le pueden adicionar marcadores de selección como secuencias codificantes para hemaglutinina o polihistidina para hacer más fácil su selección, aislamiento y purificación.

El siguiente paso, ejemplificado en la Figura 3, consiste en generar células de *E. coli* competentes (usualmente por electroporación) e introducir el vector altamente modificado y listo para ser transcrito. Una vez expresado el vector, es tiempo de seleccionar aquellos fagos que tengan anclados anticuerpos y así generar un

medio de cultivo de anticuerpos policlonales. Para realizar esto se recurre a la técnica bio-panorámica, la cual consiste en cuantificar el título producido en la mezcla de anticuerpos y generar muestras de aproximadamente 10^8 títulos, que son incubadas mediante la técnica de ELISA inmovilizando en el plato antígenos, el marcador de selección o ambos y así eluir las clonas no productoras. El proceso se realiza varias veces para asegurarse de tener únicamente las clonas altamente productoras.

Al plato con el anticuerpo antifago se le puede adicionar una enzima conjugada, por ejemplo, la peroxidasa de rábano que, al momento de anclarse a las células productoras de fagos, permite eluir a aquellas que no tengan esta capacidad mediante un cambio de color en el medio producido por la oxidación de un sustrato cromógeno a través de la enzima conjugada al anticuerpo antifago. Para este punto, se han seleccionado las clonas productoras de anticuerpos, generando un medio policlonal, el siguiente paso es realizar una nueva serie de bio-panoramas, pero ahora fijando a la placa de ELISA el antígeno específico para el mAb deseado y eluyendo aquellas clonas que no tengan ese anticuerpo anclado a la cápside del bacteriófago.

Como último paso, la clona productora es lisada y el vector es purificado para analizar la secuencia codificante del anticuerpo de interés, amplificarla e introducirla a un nuevo vector del bacteriófago para infectar una nueva línea celular y producir scFv específicos. Las ventajas que este método representa es que ofrece la capacidad de generar Fab poco comunes en células circulantes humanas para antígenos bastante raros o difíciles de reconocer y desencadenar una respuesta inmune; permite realizar análisis genéticos y funcionales de los mAb seleccionados, facilitar el estudio mecánico del sistema inmune y los arreglos que se requieren para la producción de esa clona en específico. Desafortunadamente, esta técnica es demandante, complicada y consume mucho tiempo y tecnología. Por lo anterior, Adalimumab es el único anticuerpo

monoclonal aprobado por esta técnica que ha tenido el reconocimiento mundial por su acción terapéutica [Hammers & Stanley, 2014].

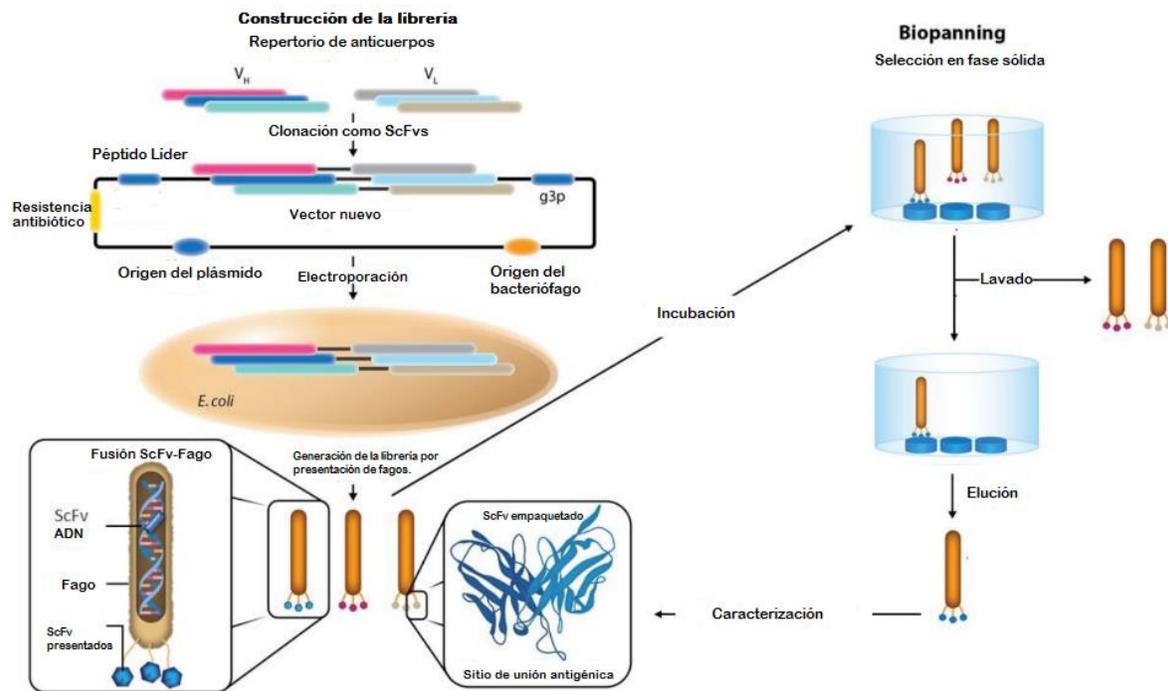


Figura 3. Esquema del proceso de la generación de anticuerpos por presentación de fagos [Almargo, J. et.al., 2019].

Para principios del siglo XXI, las innovaciones tecnológicas para la creación de anticuerpos monoclonales alcanzaron el punto de poder crear anticuerpos completamente humanos y disminuir al mínimo los eventos adversos generados por reconocimiento de secuencias murinas heterólogas.

La producción actual de mAb humanizados y humanos se puede realizar casi de la misma manera; mientras que el proceso para generar anticuerpos completamente humanos puede iniciar mediante APD o inmunización en modelos murinos; como se muestra en la Figura 4. El proceso para generar anticuerpos humanizados siempre inicia con la inmunización en modelos murinos, para continuar con la inmunización empleando el blanco terapéutico (antígeno), se extrae el bazo, se detectan, identifican y aíslan las clonas productoras del mAb y posteriormente

continúa su producción en líneas celulares CHO. El punto de quiebre entre ambos métodos radica en que los mAbs completamente humanos son realizados en ratones transgénicos, a los cuales se les reemplazó el locus codificante para IgG por el mismo locus, pero con la secuencia presente en humanos [Mallbris, Davies, Glasebrook, Tang, Glaesner & Nickloff, 2016]. Mientras que los anticuerpos humanizados son inicialmente generados en modelos murinos salvajes, producidos y aislados. Una vez aislados, porciones iniciales del anticuerpo producido, que confieren especificidad y afinidad al anticuerpo, son escindidas mediante técnicas de biología molecular y son acoplados a secuencias génicas de anticuerpos humanos, resultando en mAb con múltiples secuencias homologas para los humanos difiriendo en las Regiones Complementarias Determinantes en las regiones variables del anticuerpo.

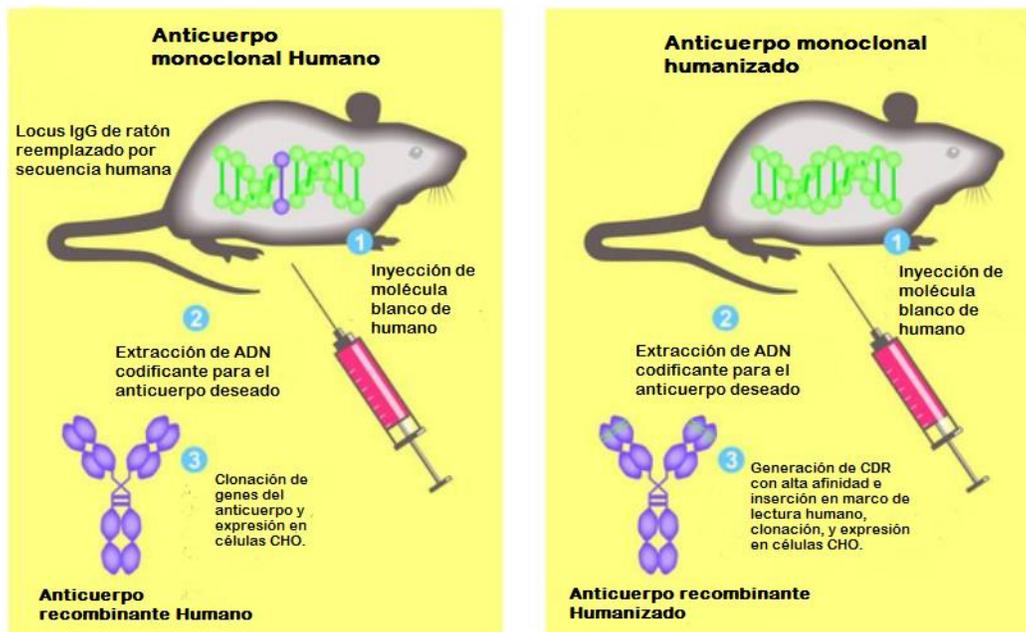


Figura 4. Esquema de generación de mAbs humanizados y humanos [Malbris, 2016].

Una de las desventajas de este método es que los anticuerpos completamente humanos tienen marcos de lectura libres en su totalidad de mutaciones somáticas derivadas de células germinales, pero las mutaciones pueden generarse por la

propia maquinaria del modelo productor, generando problemas de producción. Por su parte, los mAbs humanizados pueden ser manejados de tal manera que no presente mutaciones durante su producción pues conlleva una gran manipulación y empleo de ingeniería genética [Mallbris, 2016].

En la actualidad, el proceso de producción a nivel comercial de anticuerpos monoclonales inicia con la generación del anticuerpo a través de la inmunización de un animal o a través de métodos de biología molecular que involucran la identificación y optimización de la secuencia codificante de ADN y la construcción e identificación de la clona con mayor rendimiento de producción [Carvalho, da Silva, Carneiro, de Oliveira, Parachin & Carmo, 2017].

TERAPIA.

La técnica de producción de anticuerpos a lo largo de los años ha evolucionado, volviéndose cada vez más específica y compleja, gracias a la aplicación de herramientas de biología molecular. De igual forma, los sistemas de expresión cada vez son más complejos y mejores, lo que ha derivado en sustituir el uso de animales por líneas celulares. A pesar esto, la lista de medicamentos biotecnológicos vio un crecimiento hasta inicios de 1990.

Como se ha remarcado con anterioridad, tras el gran descubrimiento realizado por Milstein y Kohler en 1975, 11 años después, en 1986 fue aprobado el primer anticuerpo monoclonal para su comercialización. Muromonab-CD3, mejor conocido como Orthoclone OKT3, es un anticuerpo monoclonal que previene el rechazo al hígado recién trasplantado. Este anticuerpo monoclonal es totalmente murino y es un anticuerpo del tipo IgG2a específico para unirse a su antígeno cognado CD3 [Weiner, 2015]. Este anticuerpo funciona uniéndose y bloqueando los efectos de los receptores CD3 expresados en los Linfocitos T provocando una disminución en el rechazo generado por el reconocimiento del órgano recién trasplantado identificado como amenaza. Sin embargo, su uso se limitó exclusivamente para casos de rechazo agudo debido al perfil de eventos adversos que este presentaba, los cuales incluía la generación de reacciones anafilácticas y reacciones de hipersensibilidad.

La comercialización de este anticuerpo monoclonal inicio la carrera por la producción de más y mejores anticuerpos, la expansión a terapias que se creían imposibles y la generación de nuevas tecnologías ultra innovadoras. La industria farmacéutica se vio altamente beneficiada y magnificada por el enorme suceso de los “5 Grandes”, conformados por [Leavy, O. *Nature reviews*, 2010]:

1. Anticuerpos específicos contra en el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), Infliximab (1°), Adalimumab (2°);

2. Anticuerpo específico contra el Receptor 2 del Factor de Crecimiento Epidermal (HER2), Trastuzumab (3°);
3. Anticuerpo contra el Factor A del Crecimiento Vascular Endotelial (VEGFA), Bevacizumab (4°) y;
4. Anticuerpo específico contra CD20, Rituximab (5°)

Se debe destacar que estos “5 grandes” no son los únicos medicamentos aprobados, pero sí son los que han tenido un mayor éxito en ventas a nivel mundial.

Debido a la amplia naturaleza de los anticuerpos monoclonales (quiméricos, quiméricos/humanizados, humanizados o completamente humanos) surgió el problema de la nomenclatura. Así como los medicamentos de origen por síntesis química, estos medicamentos debían tener reglas de nomenclatura para armonizar el entendimiento de la naturaleza de la proteína y para que la comunidad científica y aquella enfocada en el cuidado y prevención de la salud, pudieran tener un mejor referente de la molécula sin tener que aprenderse el nombre comercial de esta.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) decidió encargarse de generar una Denominación Común Internacional (DCI), mejor conocida por sus siglas en inglés como INN, *International Nonproprietary Name*: para agrupar a los anticuerpos dependiendo de su naturaleza. De esta manera contar con un mejor control de identidad para los profesionales de salud y no basarse únicamente en el nombre que las industrias farmacéuticas les dan.

Las asignaciones del DCI descritos por la OMS generó cuatro grandes grupos: anticuerpos quiméricos (-xi-), quiméricos/humanos (-xizu-), humanizados (-zu-) y completamente humanos (-u-), terminado todos con el sufijo ab que indica ser un anticuerpo. Cabe resaltar que los actuales lineamientos que establece el DCI, el

nombre genérico de la molécula no depende ya del método biotecnológico empleado, sino es dependiente de la naturaleza de la región Fab de las inmunoglobulinas [Mallbris, 2016]. Por ello, la OMS en conjunto con el consejo USAN han intentado definir estos grupos:

1. Anticuerpos Quiméricos (-ximab): anticuerpo en el que ambas cadenas (ligeras y pesadas) son quiméricas como resultado del método biotecnológico empleado. Una cadena quimérica es aquella que contiene dominios variables (Región V-D-J) de origen diferente al humano o de manera sintética, unida a una región constante (Región C) de origen humano. La región V del dominio variable de la cadena quimérica tiene una secuencia de aminoácidos el cual, al ser analizado, corresponde a una secuencia no humana [International Nonproprietary Names (INN), 2014].

2. Anticuerpos Humanizados (-zumab): es aquel anticuerpo en el cual ambas cadenas (ligeras y pesadas) son humanizadas como resultado del método biotecnológico empleado. Una cadena humanizada se caracteriza por tener sus fracciones variables, en específico sus regiones CDR de origen diferente al humano o de manera sintética mientras que las regiones complementarias al CDR en el Fab son de origen humano, incluyendo la fracción Fc. La evaluación de humanización es con base a la secuenciación de aminoácidos en la fracción Fab, en donde en la secuenciación resultante de la región V, analizada como un todo, es más cercana a una secuencia humana que de otra especie [INN, 2014].

Aunque se organizaron en cuatro grupos, solo estas dos definiciones se han aceptado a nivel mundial por el ámbito científico, las definiciones para los otros tipos de anticuerpos siguen sin ser del todo adecuadas para las diversas opiniones involucradas. Para la actualización realizada en 2017, la OMS tiene una definición de anticuerpos completamente humanos, pero no tiene información que respalde

dicha definición. Por lo antes mencionado, muchos ocupan la designación realizada por la Asociación Médica Americana que se basa en el grado de igualdad de secuencias del anticuerpo producido y la secuencia presente en los anticuerpos humanos; denotando que si la similitud es menor igual al 85% corresponde a un anticuerpo quimérico (no discriminando entre quimérico y quimérico/humanizado). Por su parte, si el grado de igualdad es >85% y <90% estamos hablando de un anticuerpo humanizado y si el grado de homología es mayor al 90%, estamos hablando de un anticuerpo completamente humano. Para el caso de los anticuerpos quiméricos/humanizados, el INN se ha conformado con establecer que estos anticuerpos (- xizumab) pueden tener tanto cadena quimérica como humanizada.

La OMS y el consejo USAN (quienes designan las reglas para establecer el DCI), en sus últimos reportes, no planean realizar una actualización a estas definiciones y, según datos reportados pareciera que prefieren seguir dejando en la ambigüedad muchos términos [Parren, Carter & Pluckthun, 2017], generando errores en la nomenclatura. Se puede creer que un anticuerpo completamente humano debería ser eso, que toda su secuencia fuera 100% homóloga al del humano, pero se ha visto que hay variación en puntos importantes como el perfil de glicosilación presente o estructura secundaria y/o terciaria no “natural”.

Para ejemplificar la relevancia del punto anterior, Dinituximab beta es un anticuerpo con dominios V murinos fusionados a una fracción C humana y, por ello, representa el ejemplo perfecto de un anticuerpo quimérico. Por otro lado, Rozanolixizumab indica una designación -xizu- para un anticuerpo quimérico/humanizado siendo que las alienaciones de las secuencias variables del anticuerpo con las del *Homo sapiens* VH y VL solo parecen en un 86.5% y 76%, respectivamente, sin indicar de que origen es el restante. Si se realiza una comparación de este mismo anticuerpo con el presente en el *Macaca mulatta* o macaco, se presenta un ligero aumento en la homología de la cadena VL (79%).

Esto evidencia que denominar a un anticuerpo por el grado de homología con la secuencia humana, no es la mejor opción; Rozanolixizumab debió tener una DCI de anticuerpo humanizado gracias a que el CDR3 presenta una pequeña disimilitud con la secuencia humana debido al proceso de humanización llevada a cabo en el modelo murino empleado, siendo responsable de la disminución de la homología con el humano [Parren, 2017].

Se podrá pensar que el problema en nombrar a los anticuerpos es meramente trivial y es únicamente un requisito más que el control sanitario y las industrias farmacéuticas piden y hacen; que lo importante del anticuerpo es el efecto terapéutico. Por desgracia, el nombrar correctamente al anticuerpo involucra el designar una serie de requisitos específicos para la solicitud de una autorización sanitaria, implica derogar un perfil de seguridad empírico que varía dependiendo de la naturaleza y la homología con el humano. Por ello, el nombrar al anticuerpo adecuadamente debe tratarse con gran cuidado para tener la información más adecuada al momento de solicitar una autorización sanitaria y esperar o no ciertos eventos adversos.

Retomando el tema de la nueva terapia que llegó con el descubrimiento de los mAbs; la primera implicación terapéutica fue la hipótesis de su uso contra el cáncer, se realizaron diversas investigaciones con mAbs murinos para evaluar el potencial terapéutico alrededor del mundo pero, desafortunadamente, debido a la naturaleza de los primeros anticuerpos, hubo muchos problemas con su uso, como: la generación de una respuesta inmune en contra de los anticuerpos, la rápida depuración y corto efecto, baja potencia y problemas de selectividad.

La era del éxito terapéutico de los anticuerpos monoclonales devino hasta la llegada de la secuenciación de los genes codificantes para los anticuerpos IgG. La particularidad de estos anticuerpos es que tienden a ser menos inmunogénicos [Weiner, 2015] según diversos estudios realizados con estos; además, el tiempo

de vida media de estos anticuerpos generados en un laboratorio parecen tener la misma duración que aquellos sintetizados naturalmente en el organismo (generalmente de 2-4 semanas) e interactuar de forma completa y eficaz sobre el sistema inmune generando una respuesta inmune completa. Lo anterior, fue la base de la innovación farmacéutica para los anticuerpos monoclonales, de ahí que todos los aprobados hasta el momento son IgG. Otra de las grandes ventajas de este tipo de anticuerpos es que permiten generar esquemas y frecuencias de dosificación “prácticas” para los pacientes (la gran mayoría se basa en regímenes de una administración cada semana o mensualmente, existen sus excepciones); y una vez alcanzada la concentración plasmática máxima, este se mantiene en circulación durante horas o incluso de semanas. La distribución de estos anticuerpos se realiza tanto en los compartimentos intravasculares como extravasculares permitiendo tener un efecto en cualquiera que sea su blanco farmacológico.

En 2017, 76 medicamentos biotecnológicos con anticuerpos monoclonales como biofármaco se han aprobado a nivel mundial por las Agencias Regulatorias más representativas (*Food Drug Administration, FDA & European Medicine Agency, EMA*), según la Plataforma Industrial de Tecnología con Células Animales mejor conocida por sus siglas en inglés como ACTIP (*Animal Cell Technology Industrial Platform*). Esta plataforma, año tras año se encarga de actualizar dicha lista y enlistar los medicamentos más representativos a nivel mundial. Según investigaciones de la Sociedad Americana de Anticuerpos, el 2018 fue uno de los años que registro el mayor número de nuevas autorizaciones sanitarias para nuevas indicaciones terapéuticas con anticuerpos monoclonales, con el número récord de 13 autorizaciones sanitarias, siendo lo común, un promedio de 5 autorizaciones anuales aunado a un promedio de 20 solicitudes de inclusión.

Para el mes de Noviembre de 2018, un número récord de mAbs solicitaron la autorización sanitaria [erenumab (Aimovig), fremanezumab (Ajovy), galcanezumab

(Emgality), burosumab (Crysvita), lanadelumab (Takhzyro), caplacizumab (Cablivi), mogamulizumab (Poteligeo), moxetumomab pasudodox (Lumoxiti), cemiplimab (Libtayo), ibalizumab (Trogarzo), tildrakizumab (Ilumetri, Ilumya) y emapalumab (Gamifant)], para el tratamiento de diversas patologías; algunos fueron aprobados, ya sea en la Unión Europea o en Estados Unidos o en ambos, mientras que algunas otras solicitudes fueron postergadas. Para ese mismo mes, 4 nuevas terapias basadas en el uso de mAbs se encontraban recabando toda la información necesaria para la solicitud de autorización sanitaria (sacituzumab govitecan, ravulizumab, risankizumab, romosozumab), en la Unión Europea o en Estados Unidos; adicionalmente, 3 terapias con mAbs de origen chino (tislelizumab, sintilimab, camrelizumab) fueron sometidas a investigación para aprobación por la Agencia Sanitaria China.

Para finales del 2018, 3 candidatos (leronlimab, brolocizumab, polatuzumab vedotin) se postulaban para ser evaluados. El apogeo de esta nueva tecnología y la prisa por el registro de nuevas presentaciones e indicaciones sigue presente. Tan solo para el mes de marzo del 2019, la FDA ha aprobado ya dos nuevas terapias: el 16 de enero se aprobó romosozumab (Evenity), para el tratamiento de osteoporosis en pacientes con alto riesgo de fractura al tener como blanco farmacológico la escleratina, se aprobó principalmente para pacientes femeninas postmenopáusicas con osteoporosis avanzada y alto riesgo de fractura. Para el 6 de febrero se aprobó caplacizumab-yhdp (Cablivi) que se administra en combinación con terapia inmunosupresora e intercambio de plasma para pacientes adultos con púrpura trombocitopénica adquirida o aTTP [Antibody Society (AS), 2019]. Se estima que, para finales del 2019, al menos 12 nuevas presentaciones de mAbs han solicitado autorización sanitaria en las diversas partes del mundo (eptinezumab, teprotumumab, crizanlizumab, satralizumab, tanezumab, isatuximab, spartalizumab, MOR208, oportuzumab monatox, TSR-042, enfortumab vedotin, ublituximab).

La secuenciación de los genes codificantes para los anticuerpos IgG no fue la única razón por la cual el auge en los anticuerpos monoclonales ocurrió, también fue gracias a las técnicas biotecnológicas de humanización que ayudó con la explotación de esta terapia. Gracias a esta aproximación, la generación del anticuerpo quimérico anti-GPIIb/IIIa denominado abciximab para inhibir la agregación plaquetaria en enfermedades cardiovasculares, fue aprobado en 1994, siendo el segundo anticuerpo monoclonal con aplicaciones terapéuticas aprobado [dos Santos, Quintillo, Manieri, Tsuruta & Moro, 2018]. En la Tabla A1 (anexo 1) se puede apreciar una lista actualizada hasta el 2017, compuesta por 76 anticuerpos monoclonales aprobados a nivel mundial, extraída de la página oficial de ACTIP. La Organización Mundial de la Salud estima para 2019 que alrededor de 150 medicamentos biotecnológicos con anticuerpos monoclonales como principio activo, incluyendo ScFv, fragmentos de anticuerpos y proteínas de fusión se encontrarán aprobados.

A pesar de que han sido un número importante de anticuerpos monoclonales aprobados por FDA y/o EMA tras Orthoclone OKT3®, (aproximadamente 350) no todos tienen aplicación terapéutica sino de diagnóstico. La innovación biotecnológica que devino en 1975 con la técnica de Kohler y Milstein puso en marcha la generación de anticuerpos específicos para marcadores cancerígenos. La característica de alta afinidad que los anticuerpos monoclonales tienen por un antígeno permitió el desarrollo y aprobación de la primera terapia de imagen para el diagnóstico de cáncer. Satumomab es producido en modelos murinos y es conjugado a un radioisótopo para poder generar una imagen tangible. El antígeno TAG-72 se encuentra presente en la mayoría de los carcinomas de mama, células pequeñas de pulmón, páncreas, estómago y esófago, y ha demostrado una alta selectividad y reactividad con el de colon y ovario [Bohdiewicz, 1998]. Las características de este anticuerpo propiciaron que fuera adaptado para funcionar como agente diagnóstico y no como medicamento biotecnológico, conjugando a una molécula quelante (pendetide) que atrapa al indio-111 para así generar un

anticuerpo detectable en técnicas de radioinmunoterapia (RIT) o radioinmunografías (RIS). Esto debido a que para 1992, el cáncer de colon era uno de los cuatro principales tipos de cáncer, solo después del cáncer de pulmón, mama y próstata. La incidencia de este tipo de cáncer es similar en varones como en mujeres, aunque se ha descubierto ser ligeramente más común en varones. Por su parte, el cáncer ovárico es el más común desorden ginecológico, teniendo en 1992 una prevalencia del 4% en frecuencia a nivel mundial y representando el 5% de las muertes; el gran problema del diagnóstico es que, en su gran mayoría, este tipo de cáncer suele ser asintomático hasta etapas metastásicas, generando una tasa de muerte de hasta el 70% de los casos. Se estimaban en ese tiempo 26, 700 nuevos casos por año con un aproximado de 14, 800 defunciones debido a esta malignidad en Estados Unidos. Esta problemática supuso la necesidad de nuevas técnicas de diagnóstico para realizarlo de manera oportuna e iniciar el tratamiento requerido a la brevedad [Bohdiewicz, 1998].

A diferencia de Orthoclone OKT3® y el gran perfil de eventos adversos que presenta, este anticuerpo denotó no ser reactivo para tejidos adultos normales, pero si para glándulas del conducto salival, endometrio postovulatorio normal, tumores benignos ováricos y tejido gastrointestinal fetal: además de la generación de anticuerpos anti-anticuerpos murinos en el 67 % de los pacientes en las fases clínicas pasados 6 meses de su administración intravenosa. Pero en su balance riesgo-beneficio, resultó ser más necesario para el diagnóstico aceptando el riesgo de la generación de una respuesta inmune.

Al igual que Satumomab, otros anticuerpos fueron aprobados para el diagnóstico de patologías que son detectables hasta etapas avanzadas o su detección es complicada. Algunos de estos ejemplos se encuentran en listados en la Tabla A1 en la sección de anexos, tales como Nofetumomab, Capromab, Imciromab, entre otros. En los que, su balance riesgo-beneficio se inclinaba más hacia el beneficio (en la gran mayoría de los casos), mientras que las reacciones adversas

generadas eran toleradas por los pacientes, resultando en que su venta no fuera suspendida en la gran mayoría de los casos.

Después de Orthoclone OKT3® y Abxicimab; el tercer anticuerpo monoclonal aprobado con fines terapéuticos fue Rituximab, un anti-CD20, anticuerpo excepcional perteneciente a los 5 medicamentos más vendidos y con un perfil terapéutico muy bueno. Tiene un origen quimérico IgG1, siendo su principal indicación terapéutica el Linfoma No-Hodgkin, fue aprobado en 1997 representando el primer anticuerpo monoclonal con indicación oncológica [dos Santos, 2018]. Rituximab, innegablemente, representa una buena opción terapéutica contra procesos malignos en Linfocitos B. Por sí solo se ha observado que tiene la capacidad de inducir una gran tasa de respuesta farmacológica y remisiones a largo plazo, asimismo, cuando se adiciona a tratamientos quimioterapéuticos existentes en el paciente, mejora y completa la respuesta anticancerígena, la tasa de remisiones a largo plazo y la tasa de curación.

Tras la aprobación de Orthoclone OKT3®, los anticuerpos autorizados con fines terapéuticos fueron pocos a comparación con los autorizados con fines diagnósticos. Esto se debió principalmente a que los anticuerpos con fines diagnósticos, aunque presentan un perfil de eventos adversos importante y la generación de respuestas inmunes por la presencia de anticuerpos anti-anticuerpos, suelen ser de administración única y cualquier problema generado puede controlarse y eliminarse de una manera mucho más fácil. En cambio, los anticuerpos con fines terapéuticos requieren de diversas administraciones con diferentes lapsos entre administraciones y por periodos que pueden ir de semanas hasta ser una terapia de por vida. Por ello, la generación de anticuerpos con fines terapéuticos vio frenado su avance y la necesidad de tener anticuerpos más seguros, de los cuales su balance beneficio-riesgo estuviera más inclinado al primero [*Food And Drug Administration, Annex 13cb, 2016*], fue una prioridad.

La respuesta de diversas industrias farmacéuticas contra las contradicciones autoinmunes presentes en aquellos pacientes que recibían las primeras terapias aprobadas fue el desarrollo de técnicas de humanización y generación de anticuerpos casi por completo de origen humano. Para ello, fue necesaria el uso de modelos tridimensionales *in sillico*, que permitiera identificar aquellos residuos murinos con relevancia en características como: afinidad, potencia y, en menor manera, avidéz y así, generar variantes durante la humanización y conservar la mayor homología posible de dichos residuos. El primer anticuerpo al que se le reemplazo el CDR por uno con mayor homología humana fue Daclizumab, en 1997, el cual se encarga de inhibir el receptor para IL-2 y así evitar el rechazo al injerto recién trasplantado. A diferencia de Muromonab-CD3, este anticuerpo fue mejor aceptado por los pacientes y la generación de anticuerpos anti-anticuerpos disminuyó gradualmente hasta llegar a un 9% para 2017, con el uso de anticuerpos humanizados.

La tecnología de presentación de fagos permitió generar anticuerpos monoclonales humanos de manera *in vitro*, siendo Adalimumab el primer y único anticuerpo actualmente aprobado con el mayor éxito terapéutico y que tiene como indicación terapéutica el tratar la artritis reumatoide al inhibir al Factor de Necrosis Tumoral alfa. Otra manera de generar anticuerpos con una alta homología humana es con el uso de animales transgénicos, esta técnica empezó a ocuparse a finales del siglo XX; el reto más grande que esta técnica implica es el reemplazo del locus murino por el humano, pero el éxito en la técnica permite la generación de anticuerpos monoclonales con alta eficiencia. Panitumumab fue el primer anticuerpo completamente humano aprobado en 2006 para la inhibir el receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR), que fue realizado con esta técnica. Algo que es de consideración, es que la técnica de reemplazo de locus no depende de un solo protocolo, por lo menos en el mercado hay 3 diferentes protocolos de reemplazo derivados de 3 diferentes compañías:

1. Abgenix Xenomouse (adquirida por Amgen en 2005),
2. Medarex UltiMAb y,
3. HuMAb (ambas adquiridas por Bristol Myers Squibb en 2009), y la más reciente Sanofi/Regeneron VelociMouse® [dos Santos, 2018].

Estas 4 compañías son las poseedoras de la gran mayoría de los protocolos de humanización y de las Autorizaciones Sanitarias para aquellos anticuerpos completamente humanos.

Dos Santos, en su publicación del 2018, considerando todos los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, ScFv y proteínas de fusión aprobados por las diversas Agencias Internacionales como: EMA, FDA, *Health Canada*, Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA, de Brasil), por mencionar algunas, estableció que existen 350 medicamentos aprobados con anticuerpos (o sus derivados) como principio activo. En general, la mayoría de los anticuerpos de uso clínico se han desarrollado para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer (38.9%), seguido de enfermedades autoinmunes (25%), desordenes genéticos (6.9%), infecciones (5.5%), asma (4.2%) y degeneración macular (2.8%). Otras indicaciones (8.3%), como impedir el rechazo agudo al injerto recién trasplantado (2.8%), pérdida ósea, antídotos, eczema y diabetes tipo 2. Aproximadamente, la mitad de los anticuerpos de uso clínico aprobados y que se encuentran en el mercado son de origen humano (44%), de los cuales, 49% son generados por animales transgénicos y 20% por tecnología similar a la presentación de fagos, el otro 31% son anticuerpos que tienen anclados en la fracción Fc proteínas de fusión.

Por su parte, el 34.7% del resto de los anticuerpos son humanizados, el 12.5% quiméricos y un 2.8% murinos. Para el 2018, todos los anticuerpos aprobados son de isotipo IgG de las variantes 1, 2, 4 o hibridando 2/4. Estas subclases o variantes difieren entre sí en la región de la bisagra de los anticuerpos y pequeñas variaciones en los residuos de aminoácidos en la región Fc; estas variaciones

permiten tener diferentes interacciones con los receptores Fcγ, diferentes perfiles farmacocinéticos e influir en la actividad farmacológica.

Debido al menor tiempo de vida media, con respecto a las otras subclases, los IgG3 que tienen un gran poder citotóxico mediado por células y genera eficazmente una citotoxicidad mediada por el complemento, no perfilan entre las subclases aprobadas ya que su producción es un poco más complicada por la zona de la bisagra, además de que el tiempo que permanece en el organismo es menor, generando problemas de administración y de niveles de concentración plasmáticos [dos Santos, 2018]. Como se mencionó, la indicación para el tratamiento oncológico es la que mayor investigación y medicamentos aprobados tiene actualmente. Estos anticuerpos tienen, en un principio, 7 diferentes mecanismos de acción, los cuales se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 1. Terapias anticancerígenas basadas en el uso de anticuerpos.

Terapia	Estructura del anticuerpo	Características del antígeno
Antitumoral	IgG sin modificar o modificación de la fracción Fc para intensificar su función mediadora/activadora de citotoxicidad mediada por células.	Antígenos de superficie asociados a propagación de tumorigénesis.
Inhibición de la angiogénesis	IgG sin modificar.	Moléculas endógenas que controlen la angiogénesis
Bloqueo de un “ <i>checkpoint</i> ” en Linfocitos T	IgG1 (bloquean y median citotoxicidad mediada por células) o IgG4 (bloquean).	Moléculas que limitan la respuesta anticancerígena de los Linfocitos T
Radioinmunoterapia	IgG o fragmentos (ScFv)	Antígenos tumor-asociados no presentes en circulación
Anticuerpos conjugados a fármacos	IgG con sitio “ligador” hidrolizable y un fármaco.	Antígenos altamente específicos asociados a tumorigénesis que puedan internalizarse cuando se une un anticuerpo
Anticuerpos bi-específicos	ScFv (Fab) de mAbs anticancerígenos unidos a Fc específicos para la activación de receptores en Linfocitos T.	Antígenos tumor-asociados que se presenten inclusive en variantes de cáncer con vertientes de pérdida y evolución antigénica.

Receptores antigénicos quiméricos en Linfocitos T (CAR)	Terapia génica dirigida a Linfocitos T mediante secuencias específicas de ADN, que codifiquen para péptidos específicos, ancladas a mAbs.	Antígenos tumor-asociados que se presenten inclusive en variantes de cáncer con vertientes de pérdida y evolución antigénica.
---	---	---

Los mAbs han sido empleados en su gran mayoría para unirse a cierta variedad de antígenos expresados en la superficie celular de las células cancerígenas. Para que un receptor sea tomado como blanco farmacológico dependerá de la densidad y capacidad de expresión de dicho anticuerpo, la selección de ciertos receptores en las células cancerígenas puede inducir la apoptosis por diversas vías de señalización, activar la vía del complemento o inducir citotoxicidad mediada por células, como se resume en la Figura 5.

1. Mediadores en la señalización: inducción de muerte celular mediante la estimulación o bloqueo de ciertos receptores, esta respuesta puede verse potenciada por el número de receptores localizados y las interacciones secundarias que puedan llegar a ocurrir entre anticuerpos o receptores. Este proceso se puede lograr mediante la interrupción entre un ligando activador y el receptor, inhibiendo la dimerización del receptor o impidiendo una respuesta al bloquear el receptor e inclusive, activar al receptor para generar apoptosis.
2. Activación del complemento: efecto parcialmente dependiente de la concentración de antígenos presente en la superficie como monómeros o polímeros, también depende del isotipo de anticuerpo empleado y las características de la célula blanco. Rituximab, por ejemplo, se fija a tetrámeros de CD20 y al formar esta unión, tiene la capacidad de activar al complemento mientras que Obinutuzumab no tiene la capacidad de unirse a tetrámeros de CD20 ni activar al complemento. Estos dos anticuerpos únicamente difieren en el isotipo, mientras uno es IgG1 tipo 1, el otro es

IgG1 tipo 2. Lo anterior, implica el porqué del éxito terapéutico de Rituximab, en comparación con otros anticuerpos que tienen el mismo blanco.

Otro aspecto que afecta la capacidad de activación del complemento es el grado de glicosilación y la presencia de proteínas adicionadas al anticuerpo.

3. Citotoxicidad inducida por anticuerpos: está bien establecido que existen diversas interacciones, tanto sinérgicas como antagónicas, y diferentes mecanismos por los cuales se generan los efectos antitumorales [Weiner, 2015].

Estos efectos dependen en su gran mayoría de la concentración de antígenos en la superficie celular para así permitir la generación de una respuesta efectiva y de gran magnitud. Sin embargo, la selección de este antígeno no deberá expresarse en la misma cantidad en células benignas, prefiriéndose aquellos antígenos que solo se expresen en células tumorales; de igual manera, este antígeno debe encontrarse de manera soluble para evitar respuestas inmunes no deseadas.

Esta misma actividad de inducción de citotoxicidad mediada por células asesinas, se puede presentar en CPAs a través de su acoplamiento con la fracción constante del anticuerpo y receptores celulares de estas, tras este acoplamiento la función de fagocitosis se activa y la célula tumoral es fagocitada [Gul, N. & Egmond, M., 2015].

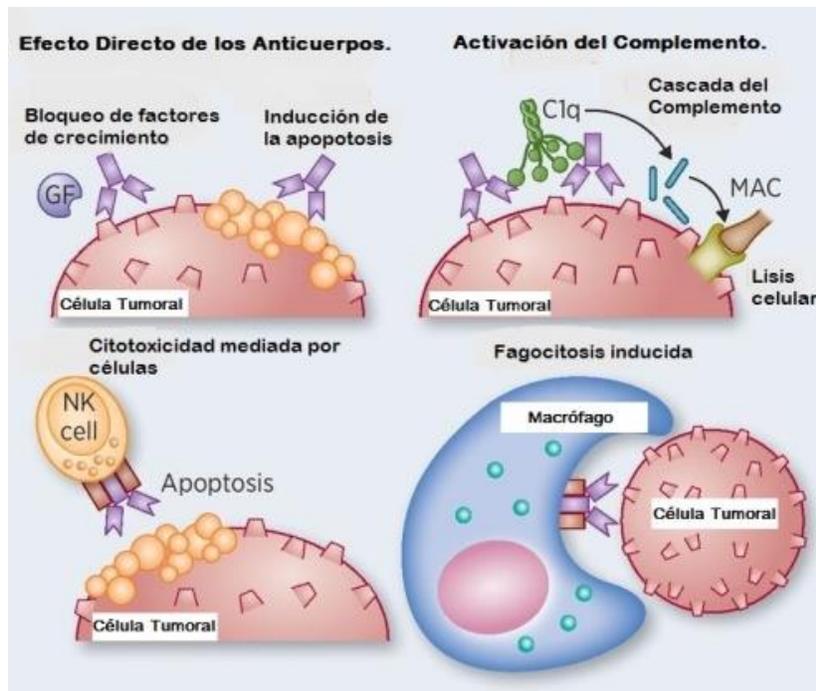


Figura 5. Mecanismos de acción de los anticuerpos monoclonales sobre células cancerígenas [Gul, N. & Egmond, M., 2015].

Cada año que pasa, nuevas terapias se están generando alrededor del mundo para el tratamiento tumoral, de 1986 hasta la actualidad, tres nuevos tipos de terapias se han generado para mejorar la eficacia del tratamiento con el uso de anticuerpos:

- a. Anticuerpos conjugados a fármacos: consiste en la unión de un fármaco citotóxico para el tratamiento tumoral y su anclaje a un anticuerpo monoclonal, de esta manera, se aprovecha la selectividad del mAb para que, al anclarse al receptor en la célula tumoral, propicie la endocitosis del anticancerígeno y este actúe directamente en el interior de la célula propiciando la apoptosis.
- b. Anticuerpos bi-específicos: tiene como principio generar un anticuerpo en el que uno de los brazos tenga una especificidad por receptores celulares

activadores de células citotóxicas, mientras que el otro brazo del anticuerpo tenga alta especificidad para la célula tumoral.

- c. Antígenos de receptores quiméricos de células T: consiste en generar linfocitos T modificados genéticamente en sus receptores para captar antígenos específicos en células cancerígenas y propiciar una respuesta inmune completa de citotoxicidad a través de la generación de receptores antigénicos quiméricos (CAR) [Weiner, 2015].

Con base en lo anterior expuesto, como respuesta a las demandas del mercado, los anticuerpos monoclonales han tenido una gran expansión con respecto a blancos farmacológicos. La indicación oncológica es uno de los principales temas de investigación a nivel mundial, quedando como una de las áreas más complejas y diversas. Aun así, indicaciones terapéuticas para el tratamiento de enfermedades autoinmunes han comenzado a escalar entre los temas de investigación fisiopatológico y farmacológico más relevante. A pesar de lo anterior mencionado, este tipo de terapia aún se encuentran en la demanda de terapias más efectivas y selectivas para tipos de cáncer cada vez más fármaco-resistentes y de alta capacidad metastásica.

Limitaciones.

A pesar de todas las ventajas terapéuticas que los mAbs representan y acarrear con su presencia en el mercado farmacéutico, no todos estos medicamentos tienen un historial de éxito. A medida que más medicamentos eran aprobados y entraban en contacto con un mayor número de pacientes, en comparación con los que se estudió la molécula en las Fases Clínicas, se descubrieron problemas relacionados a la seguridad, efectividad y manejo adecuado de los mismos.

El primer ejemplo fue Muromonab-CD3 cuyo perfil de seguridad generaba un balance beneficio-riesgo muy estrecho, restringiendo su uso a tan solo la indicación de rechazo agudo al injerto y limitando sus ventas. Esto tuvo tal impacto en el mercado farmacéutico, que es el único anticuerpo que actualmente tiene una aprobación diferente entre países y condados/estados.

Muromonab-CD3, al ser un anticuerpo de origen murino, generado por hibridomas, mostró en los estudios clínicos iniciales y en informes clínicos posteriores, que a dosis iniciales de este anticuerpo la presencia de TNF α e INF- γ aumentaba exponencialmente en el tratamiento profiláctico para trasplante de riñón propiciando el Síndrome por Liberación de Citocinas [Sgro, C., 1995], que es una respuesta inflamatoria sistémica que puede poner en peligro la vida del paciente. Este síndrome se presenta frecuentemente en el tratamiento con mAbs o linfocitos T CAR y se asocia con la velocidad de infusión y distribución del anticuerpo en el torrente sanguíneo [National Cancer Institute, NIH. 2019].

Aunado a lo anterior, se demostró que el 50% de los pacientes en los estudios también presentaron un Síndrome pseudogriposo, que puede generar manifestaciones isquémicas. Otros eventos adversos asociados con el uso del anticuerpo son: nefropatía por deterioro de la función renal evidenciado con el aumento de creatinina sérica; edema pulmonar debido a un aumento en la liberación de citocinas, activación del complemento, activación de neutrófilos y

daño al endotelio vascular pulmonar, complicaciones a nivel del Sistema Nervioso Central, desordenes de coagulación y trombosis. Otro evento adverso muy común era las infecciones oportunistas por el grado de inmunosupresión generada, la generación de anticuerpos anti-anticuerpos y, en ciertos casos, la presencia de linfoma [Sgro, C., 1995].

Se podría ir de anticuerpo en anticuerpo explicando el perfil de reacciones adversas que se descubrió que generaban. Sin embargo, las limitaciones de los anticuerpos no solo son eventos adversos que cambian de anticuerpo en anticuerpo dependiendo su indicación, composición y naturaleza sino también se encuentran involucrados otros factores como son:

- Costo de producción: La terapia biológica supera en costos a la de cualquier otro medicamento. Implica instalaciones totalmente asépticas con un control biológico y microbiológico estricto, tanques de producción altamente capacitados y bien calificados en su instalación, diseño y operación. La producción de un solo tipo de anticuerpo implica múltiples procedimientos, con un alto gasto en recursos para asegurar la obtención de un producto puro y bien caracterizado. Por ello, el presente trabajo solo mencionará esta limitación y no profundizará en ella.

- Farmacocinética contra penetración tisular: en estudios empleando xenoinertos de modelos murinos, se observó que, en el empleo de ciertos anticuerpos en contra de antígenos específicos presentes en células cancerígenas, la mayor cantidad se mantiene en sangre y solo el 20% de la dosis administrada perfunde tejidos y llega a las células cancerígenas [Beckman *et. al.*, 2007]. Posteriormente, se descubrió que la llegada del anticuerpo a los tejidos tumorales dependía en el balance de una buena farmacocinética y una eficiente penetración y retención en el tejido blanco; esto depende en su gran mayoría de las barreras del organismo (los

anticuerpos suelen permanecer en el torrente sanguíneo por largos periodos de tiempo debido a que no presentan filtración glomerular).

A pesar de ello, existen maneras de favorecer la permanencia del anticuerpo en sangre, la penetración tisular y su estadía en el blanco farmacológico o en la periferia de este, algunas de las modificaciones que se descubrieron y pueden realizarse son: adición de polietilenglicol o PEG, adición de proteínas (como las proteínas de fusión) o la generación de formas farmacéuticas que funcionen como sistemas de transporte y liberación modificada/retardada [Chames, 2009].

- Mecanismo de acción y limitaciones asociadas: cuando un anticuerpo se encuentra en desarrollo, este puede tener diferentes mecanismos de acción innatamente, como es el caso de Rituximab, que son observadas *in vitro*; y cuando es administrado en un organismo, estos mecanismos pueden cambiar por completo o simplemente desconocerse en su totalidad la forma en la que actúa sobre receptores o antígenos específicos [Borrebaeck & Carlsson, 2001]. El mecanismo de acción de los anticuerpos no se limita a la administración del mAb, su penetración tisular y llegada al blanco farmacológico, sino también puede incluir que el antígeno sea un ligando soluble, como Infliximab, Adalimumab y Certolizumab (anti-TNF α) o Bevacizumab. Por lo que el mecanismo consistirá en la distribución del anticuerpo a través del torrente sanguíneo y la capacidad de penetración a través de los diferentes compartimentos para llegar al ligando soluble. Otra posibilidad, es la unión con receptores en la superficie celular de células específicas que, con la interacción anticuerpo-ligando, se desate cierta reacción inmunológica o bloqueante, este mecanismo se verá altamente afectado por la difusión de la zona de aplicación hacia el blanco, de proteínas bloqueantes o sistemas no permisibles al paso del anticuerpo.

Uno de los mecanismos por el que los anticuerpos mejor ejercen su función citotóxica se ve impedida por la disponibilidad del Fc, la selectividad de este y la afinidad del Fc con el receptor. Este mecanismo implica la activación del complemento o la generación de una respuesta celular citotóxica, esta acción se da gracias al Fc del anticuerpo que se ancla a receptores celulares específicos FcYR, también se ve implicada la afinidad con ciertos receptores presentes en células del sistema inmune (FcYRIIb), los cuales tienen la capacidad de inhibir el efecto del anticuerpo e impedir que ejerza su efecto farmacológico dirigiendo al anticuerpo a la degradación proteolítica [Chames, 2009].

El desarrollo del anticuerpo, por lo tanto, también debe incluir una maquinación de la estructura terciaria a adquirir y el cálculo de la superficie del Fc disponible para llevar acabo su función citotóxica.

Inmunogenicidad: Generación de Anticuerpos Anti-Anticuerpos (ADAs).

La inmunogenicidad es otra limitante del uso de anticuerpos y se ha considerado como la de mayor impacto a nivel farmacoterapéutico para discernir si el producto se usa o no se usa; esto repercute en la decisión de permanencia o retirada del mercado. Como se ha descrito, la inmunogenicidad está íntimamente relacionada con la naturaleza del anticuerpo, si es de origen murino, quimérico, humanizado o humano.

La inmunogenicidad se ha definido como la capacidad de alguna molécula para despertar una respuesta inmune completa; con respecto al uso de mAbs, existen dos diferentes tipos de ADAs (por sus siglas en inglés *Anti-Drug Antibodies*) dependiendo del epítipo al que el anticuerpo se dirija:

1. Neutralización de anticuerpos: anticuerpos se unen a la fracción Fab específica para el blanco farmacológico por el que fue diseñado, neutralizando su acción.
2. Anticuerpos de unión: se unen a diversas fracciones del mAbs propiciando un aumento en la depuración de este o disminuyendo su biodisponibilidad.

La titulación o detección de estos anticuerpos es un reto analítico [Gómez-Mantilla, Trocóniz, Parra-Guillén & Garrido, 2014], la manera en la que este efecto biológico se puede detectar es con la presencia y cuantificación de títulos altos de IgG, bajos y transitorios títulos de IgM y, raramente, títulos bajos de IgE, los cuales son responsables de respuestas anafilácticas. El anticuerpo que más neutraliza a otros anticuerpos se ha descubierto ser IgG4 y se la ha atribuido como el responsable de la falla terapéutica de diversos mAbs. Es conveniente esclarecer que la generación de ADAs no es inmediata, los eventos adversos asociados a estos se observan de semanas a meses tras la administración de la terapia biológica y el tiempo e intensidad de la respuesta variará entre los diferentes anticuerpos y pacientes expuestos.

La generación de inmunogenicidad no depende únicamente de la presencia de ADAs por la naturaleza del anticuerpo, estos también pueden verse inducidos por la composición de la forma farmacéutica que acompaña al anticuerpo (formulación, excipientes), la presencia de agregados y contaminantes adyuvantes influyen en gran medida la generación de inmunogenicidad. Por otro lado, los anticuerpos son moléculas proteicas con un tamaño considerable, con puentes disulfuro y modificación postraduccionales como la glicosilación. Se ha observado que la presencia de ciertos glicanos o patrones de glicosilación, potencia la inmunogenicidad de una proteína.

Cetuximab, un anticuerpo quimérico, ha reportado la capacidad de generar reacciones anafilácticas en ciertos pacientes debido a una glicosilación en la fracción Fab del anticuerpo (galactosa-alfa-1,3-galactosa), este evento se ha visto disminuir con la adición de polietilenglicol al anticuerpo gracias a que “desaparece” esta glicosilación.

La presencia de ADAs se ha asociado con bajas concentraciones plasmáticas de mAbs, falla terapéutica y progresión de la patología a tratar. De entre los anticuerpos que mayor problema presenta son: Tositumomab (CD20, IgG2a1 murino, 99% inmunogénico), Muromonab (CD3, IgG2a K murino, 86% inmunogenicidad), Abciximab (GP IIb/IIIa-R, quimérico, 6-44% inmunogenicidad), entre otros (Daclizumab, Infliximab, Natalizumab, Certolizumab, Efalizumab, Alemtuzumab, Adalimumab, Cetuximab, Golimumab, Panitumab). Mostrando una clara tendencia con respecto a la naturaleza de cada uno, siendo los más inmunogénicos los de menor homología con el humano.

La generación de ADAs, en especial los tipos neutralizantes, no solo generan una falla terapéutica sino también modifican por completo la farmacocinética y farmacodinamia de los mAbs, su biodisponibilidad y su depuración. Es complicado, y se han realizado muy poco, establecer ensayos de biodisponibilidad, farmacocinética y/o farmacodinamia; principalmente por la dificultad de cuantificación de estos anticuerpos, el tiempo de respuesta y los interferentes presentes. En general, niveles bajos y transitorios de ADAs no suelen afectar la respuesta clínica, el problema es cuando los títulos de estos aumentan. Este aumento suele propiciarse con la formación de agregados (aumento de peso molecular), glicosilaciones expuestas (patrones de reconocimiento) y respuestas idiopáticas por reconocimiento casual [Gómez-Mantilla, 2014].

A pesar de esto, la nueva legislación internacional recomienda que este tipo de anticuerpos deban cuantificarse, se debe establecer un nivel de riesgo y calcular la

probabilidad de ocurrencia, principalmente por todas las complicaciones que la presencia de estos anticuerpos puede llegar a acarrear: falta de apego terapéutico por falla terapéutica, progreso de la patología, dermatitis, rash, fiebre, hipertensión cíclica, taquicardia, cefaleas, hasta reacciones anafilácticas de moderadas a severas que pueden llegar a shock y causar la muerte del paciente.

Selectividad: Cardiotoxicidad de Trastuzumab.

La selectividad durante algún tiempo se creyó que no influiría en el uso de anticuerpos, se pensaba que al estar diseñados para fijarse o anclarse a un antígeno específico, solo ocurriría eso. Además, que el objetivo farmacológico por el cual estaban siendo diseñados y producidos sería único y exacto. La implicación de la terapia biológica con anticuerpos consiste en tener la ventaja de no presentar múltiples efectos en diversos blancos farmacológicos, como una molécula por síntesis química suele presentar y, de esta forma, disminuir el perfil de eventos por falta de selectividad a un solo blanco. Posteriormente, estudios clínicos de Fase III y Fase IV descubrieron que ciertos eventos adversos asociados con el uso de mAbs tenían que ver con efectos farmacológicos generados por la unión del anticuerpo a ligandos o antígenos que no eran el principal objetivo por el que fueron generados [Zeglinski, Ludke, Jassal & Singal, 2011]. El ejemplo más estudiado y que más impactó en su uso clínico a principios del Siglo XXI es Trastuzumab, anticuerpo humanizado dirigido contra HER2, aprobado para tratar condiciones oncológicas como el cáncer de mama, solo o en combinación con anticancerígenos orales como las antraciclinas (comúnmente doxorubicina). HER2 se sobre expresa en un 20-25% de tipos de cáncer de mama, este tipo de cáncer está caracterizado por ser de crecimiento agresivo y prognosis pobre [Mohan, Jiang, Dokmanovic & Wu, 2018].

El mecanismo de acción de Trastuzumab consiste en unirse al dominio IV de HER2 extracelular y desencadenar funciones efectoras antitumorales a través de diferentes mecanismos: disrupción de HER2, inhibición de la homodimerización y

heterodimerización de HER2, activación de citotoxicidad mediada por células a través de su fracción Fc, abrogación de vías de señalización oncogénicas, regulación génica de mecanismos de reparación de ADN, supresión de la angiogénesis y proteólisis celular de HER2. En la actualidad, algunas vías de señalización de HER2 se desconocen, este receptor está asociado a una tirosin cinasa, pero no está del todo claro el papel que desempeña, se cree que Trastuzumab logra sobre excitar a la tirosin cinasa, fosforilándola en exceso y activando la propia fosforilación de HER2. La fosforilación excesiva de HER2 incrementa la interacción con Csk (enzima homóloga) que tiene la capacidad de regular negativamente la actividad de HER2 e inhibir el crecimiento tumoral.

Alrededor del mundo son reconocidos los beneficios de este anticuerpo para el tratamiento de cáncer de mama. Su uso es ampliamente difundido por el mundo, pero su limitación radica en la falta de selectividad y la generación de cardiotoxicidad [Mohan, 2018].

En estudios clínicos de Fase I y Fase II, con el uso de Trastuzumab (solo o combinación con cis platino), aparentó una muy buena tolerancia y no hubo incidentes relacionados con efectos cardiotóxicos. Fue hasta estudios de Fase III en que se asociaron efectos cardiotóxicos de Trastuzumab con el uso de antraciclina; en este estudio se asociaron disfunciones y fallas cardíacas en más del 27% de las pacientes con cáncer de mama metastásico HER2 positivo, mientras que aquellas que solo recibían antraciclina presentaron estos eventos en un porcentaje menor al 7%. Alrededor del mundo se hicieron los mismos descubrimientos y se asoció principalmente al uso combinado con antraciclina, presentando una relación de riesgo de 1:4 (una de cada cuatro pacientes en tratamiento con Trastuzumab tiene la posibilidad de presentar eventos cardiotóxicos).

Se desconoce el verdadero mecanismo por el cual Trastuzumab induce cardiotoxicidad, estudios *in vivo* con modelos murinos mostraron que de alguna manera el uso de este anticuerpo propicia modificaciones en la estructura de los cardiomiocitos que propician su malfuncionamiento y muerte. De igual manera, al realizar un análisis de funcionamiento y expresión génica, se descubrió que este anticuerpo propicia modificaciones genéticas en los mecanismos de reparación del ADN y funcionamiento correcto de las funciones celulares de los cardiomiocitos.

La manera en que logra desregular al corazón, como se muestra en la Figura 6, es debido a la modificación en la vía de señalización de HER2, al disrumpir esta vía, es inhibido el proceso de autofagia presente en los cardiomiocitos y propicia la acumulación de especies oxidantes en el citoplasma, ocasionando su muerte. La combinación de Trastuzumab con doxirubicina potencia la generación de especies oxidantes y la disminución de especies reductoras, este desbalance sobre regula al angiotensinógeno II circulante, esta molécula tiene la capacidad de inhibir la señalización de HER de manera natural e intensificar el aumento de moléculas oxidantes. Por ello, Trastuzumab tiene la capacidad de inducir cardiotoxicidad como efecto secundario a su mecanismo principal de acción, pero este efecto aumenta cuando se combina con antraciclinas. Esta es la teoría más aceptada acerca de cómo es que el anticuerpo genera daño cardíaco, pero no se ha elucidado ni comprobado al 100% [Zeglinski, 2011].

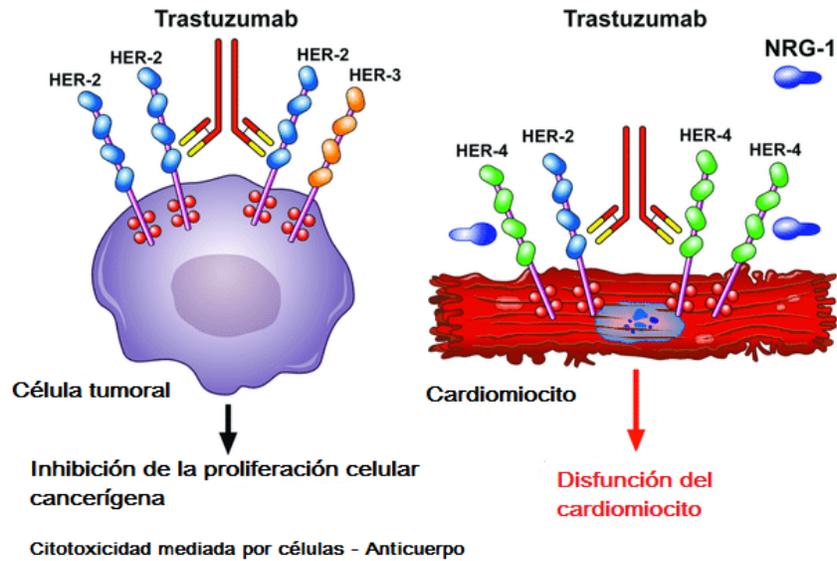


Figura 6. Mecanismo general más aceptado por el cual Trastuzumab genera daño celular en los cardiomiocitos [Varricchi, G. et. al., (2018)].

El mecanismo innato de Trastuzumab parece que es efectivo para la eliminación de células cancerígenas, pero también para propiciar cardiotoxicidad, esto mismo no pasa con Pertuzumab, otro anti-HER2, el cual tiene un epítipo diferente al de Trastuzumab y parece ser que este anticuerpo no presenta eventos de cardiotoxicidad, pero tampoco presenta los beneficios terapéuticos de este.

PROTEÍNAS DE FUSIÓN.

Hasta este punto, se ha descrito la manera en el que el Sistema Inmune funciona, como se producen los diferentes anticuerpos y la complejidad de síntesis de los mismos en el organismo, se ha descrito como esta producción natural se ha transferido y adaptado para su manipulación en el laboratorio, las técnicas más empleadas de producción de anticuerpos, las diversas naturalezas de estos (murino, quimérico, humanizado y humano), y se han expuesto algunos de los medicamentos biotecnológicos que tienen un anticuerpo como principio activo, así como enlistado los anticuerpos aprobados para 2017 por las Agencias Regulatorias de mayor impacto a nivel mundial y las principales limitaciones que involucra el uso anticuerpos monoclonales.

La industria farmacéutica se percató de que los mAbs, aunque son una terapia innovadora y benéfica, tienen ciertas limitaciones que afectan su auge en el mercado interaccional. A inicios del S. XXI, el uso clínico de anticuerpos monoclonales se encontraba bastante limitado para aquellas personas que podían costearlo y aceptaban el riesgo que implicaba la terapia. No pasó mucho tiempo cuando científicos alrededor del mundo comenzaron a hacer modificaciones en la estructura de los anticuerpos a manera de propiciar moléculas altamente específicas y con perfiles de seguridad aceptables. La idea consistió en disminuir el perfil de eventos adversos, abarcar terapias no existentes y suplantar a los medicamentos de origen por síntesis química no selectivos y establecer a la terapia biológica como la primera opción de tratamiento.

El problema devino cuando los diversos experimentos alrededor del mundo y con base en miles de historias clínicas empleando diversos medicamentos (no solo anticuerpos) mostraron una realidad que tiraba la idea del uso de anticuerpos como una terapia perfecta: selectiva y eficaz.

Esta realidad consiste en que una proteína completamente humanizada (>90% de homología) es capaz de generar inmunogenicidad, a pesar de que entre más humana sea la proteína, esta será menos inmunogénica, sin embargo, el riesgo jamás quedará eliminado. La inmunogenicidad es capaz de generarse con moléculas compuestas por residuos de aminoácidos idénticos debido a factores extrínsecos como diferentes patrones de glicosilación, el acomodo tridimensional, aspectos relacionados con la vía de administración (velocidad de infusión), la capacidad de perfusión, parámetros farmacocinéticos e inclusive idiopáticos. Se ha observado que pese a que un anticuerpo o producto biotecnológico tenga un perfil de seguridad aceptable en los estudios clínicos iniciales, factores como la vía de administración (diferentes perfiles de absorción, distribución o almacenamiento/acumulamiento), el tratamiento (continuo o intermitente), la polifarmacia (interacciones medicamentosas) o la dosis administrada, entre otros; son las que impactan en mayor medida con la presencia o ausencia de ciertos eventos relacionados con la seguridad del biomedicamento. Algunas de las soluciones que se han ido generando con el paso del tiempo y que han destacado, con el fin de disminuir las limitaciones mencionadas son [Lee, Chinen & Kavanaugh, 2010]:

- Adición de PEG: consiste en adicionar a la proteína cadenas de polietilenglicol para enmascarar patrones de glicosilación o residuos de aminoácidos con potencial inmunogénico, aumentar su tiempo de vida media en el organismo al disminuir su depuración y así generar un mejor efecto terapéutico y disminuir el perfil de eventos adversos.
- Sistemas de liberación modificados: Micro y nanopartículas de diversas naturalezas, hechas con polímeros biocompatibles que encapsulan a la proteína y es liberada hasta su llegada al blanco farmacológico por diversos mecanismos de liberación. Tienen como intención aumentar su tiempo de

vida media, mejorar la farmacocinética y realizar una terapia más sensible al blanco farmacológico.

- Liposomas: que consiste en generar estructuras lipídicas que encapsulen a la proteína en cuestión. Este sistema fue descrito por primera vez en 1961 por el biofísico Alec Bangham, son sistemas de liberación esféricos caracterizados por estar compuestos de lípidos en bicapa generando un interior acuoso para la proteína a transportar.
- Proteínas de fusión:

Es una técnica de biología molecular empleada en la producción de anticuerpos monoclonales con la intención de hacer una terapia más selectiva, potente y efectiva. Es una de las técnicas más empleadas y ampliamente difundidas. Consiste en el uso de polímeros de aminoácidos <50 aminoácidos con dominos efectores acoplados a acarreadores para complementar y dar estabilidad al dominio efector.

Estas proteínas de fusión se acoplan a la fracción Fc de un mAb con el fin de mejorar la estabilidad del anticuerpo, incrementar su vida media, mejorar localización del blanco farmacológico y subsecuente anclaje a receptor, así como mejorar la citotoxicidad o, al menos, inhibir el deterioro celular. El uso de estas proteínas puede implicar la escisión de la fracción Fab del mAb o su conservación y anclaje a la zona del Fc que entra en contacto con receptores tipo FcRn.

Esta innovación terapéutica resultó ser llamativa para el mercado farmacéutico y planteó una solución efectiva para las limitaciones que presentan los anticuerpos monoclonales. Estos nuevos anticuerpos modificados continúan teniendo las ventajas de los anticuerpos monoclonales, al permitir funciones citotóxicas, de

señalización y neutralizante/bloqueante. La novedad radica en las implicaciones terapéuticas para patologías autoinmunes y cáncer, así como nuevos mecanismos por los cuales estos anticuerpos pueden actuar.

Fracción constante-proteína de fusión.

Una de las terapias que involucra el uso de proteínas de fusión consiste en acoplarlas a la fracción constante de un anticuerpo monoclonal escindiendo las fracciones variables para dejar la zona de reconocimiento-acoplamiento de la fracción constante a receptores de superficie libres.

La razón por la cual esta terapia es innovadora y plausible se debe a la naturaleza del receptor FcRn. Una de las funciones primordiales que este receptor tiene es la protección contra el catabolismo de sus dos ligandos principales, la albúmina y los anticuerpos de tipo IgG. Esto se comprobó con uso de ratones *knock-out* (sin el gen codificante para este tipo de receptores) en los cuales la vida media de los IgGs producidos por estos modelos se redujo de 9 días a 1.4 días, acompañado de una reducción de casi cuatro veces en las subclases de IgGs. En humanos, la deficiencia de FcRn produce pacientes con hipoproteinemia hipercatabólica familiar con bajos niveles séricos de IgG, con vida media de 3 días, pero con un nivel o capacidad sintética de IgGs normales [Rath, Baker, Dumont, Peters, Jiang, Qiao, Lencer, Pierce & Blumberg, 2015].

Por otra parte, la idea de anclar proteínas a la fracción constante de anticuerpos es posible gracias a que se ha visto que el anclaje de haptenos a esta fracción puede generar tolerancia y no despertar reacciones inmunes en el organismo, aunado a que la tecnología de fabricación no difiere en gran medida en la involucrada para la producción de cualquier otra proteína. Por lo regular, la síntesis de estas proteínas se realiza en sistemas de expresión mamífero ya que permite generar proteínas menos inmunogénicas, con patrones de glicosilación más controlados y estructuras terciarias más acordes a lo deseado. La línea

celular CHO, hibridoma NS0, HEK o Sp2/0 son las más empleadas en la actualidad [Rath, 2015] el detalle más importante a cuidar en estos medicamentos es la composición del Fc, esta debe ser precisa para ser reconocida por el FcRn, el grado de homología dependerá entonces del sistema productor y la capacidad de este para glicosilar o doblar a la proteína.

Una vez producida la proteína, el paso más complicado que se ha encontrado en diversos estudios acerca de la producción de estos anticuerpos modificados es el diseño de un puente que una la proteína al anticuerpo, así como escoger la zona perfecta de la fracción constante a la cual se unirá la proteína de fusión. La zona perfecta debe ser aquella que se encuentre más estable en la estructura terciaria de la proteína durante la circulación sistémica, que no interfiera con sitios de reconocimiento a receptores, de localización o efectores, que evite la generación de regiones potencialmente inmunogénicas y, que una vez unida la proteína, permita una libre interacción del biotecnológico con el blanco farmacológico. Por ello, la selección de la zona y la molécula encargada de ligar ambas proteínas pasa de ser algo trivial, a uno de los pasos más esenciales del diseño de estas formas terapéuticas. Actualmente, existen tres maneras en las que se realiza la unión de las proteínas de fusión a las fracciones constantes: a través de moléculas capaces de generar puentes disulfuro, hidrazonas sensibles a ambientes ácidos y con el uso de otros péptidos ligadores [Lyer & Kadambi, 2011].

Medicamentos aprobados y sus limitaciones.

El primer anticuerpo con proteínas ancladas al fragmento Fc que fue aprobado es Etanercept (Enbrel®), el cual consiste en el dominio extracelular del receptor TNFp75 humano (dominio extracelular) fusionado al fragmento Fc de IgG1 humano. Este anticuerpo Fc-proteína, inhibe la unión del TNF α y TNF β a los receptores de superficie, inhibiendo la cascada de inflamación. Este medicamento fue aprobado en 1998 para el tratamiento de la artritis reumatoide y otros tipos de artritis o variantes de esta.

A pesar de ser una terapia innovadora y más específica para el tratamiento de la patología, infortunadamente, conforme el medicamento era comercializado y empleado por pacientes alrededor del mundo se descubrió y confirmó la idea que se tenía con los anticuerpos monoclonales: cualquier proteína exógena tiene el riesgo de ser potencialmente inmunogénica.

Esto se confirmó con anticuerpos anti-etanercept, que se reportaron en diversos estudios post-comercialización, teniendo una frecuencia del 3 - 5.6 % en pacientes con artritis reumatoide, 8 % en infantes con artritis idiopática juvenil y, 18 % en pacientes con psoriasis [Rath, 2015]. Aun así, para 2015 la presencia de estos anticuerpos no se asoció a falta de eficacia terapéutica suponiendo la falta de capacidad neutralizante de estos.

Pese a que el problema de eventos adversos no logró eliminarse por completo con el uso de esta nueva terapia, la industria farmacéutica optó por seguir adelante en la investigación y desarrollo de nuevas moléculas, con el fin de abarcar enfermedades huérfanas, difíciles de tratar o ser una mejor opción terapéutica que la terapia actual.

El siguiente medicamento con proteínas de fusión aprobado fue Alefacept (Amevive®) en 2003, este biotecnológico se diseñó con el dominio extracelular de la porción de unión a CD2 del antígeno-3 asociado a la función linfocitaria (LFA-3) que es el co-receptor primario a CD2 de los leucocitos T, esta porción se asocia a los dominios CH2 y CH3 de anticuerpos IgG1. Este anticuerpo al tener fusionada esta proteína inhibe la intercomunicación de las CPAs y los Linfocitos T lo que conlleva la supresión de la activación de estos últimos e induce la apoptosis de la memoria efectora celular de los Linfocitos T en procesos patógenos de tipo CD45R0⁺. Este tipo de linfocitos asociado a procesos patogénicos predomina en enfermedades inflamatorias crónicas con presencia de lesiones psoriásicas.

Gracias al blanco farmacológico por el que fue diseñado, fue aprobado por la FDA en 2003 para el tratamiento de psoriasis en placa de moderada a severa, esta indicación terapéutica solo fue el inicio para este medicamento biotecnológico, estudios posteriores en 2005 mostraron que este anticuerpo también tiene la capacidad de disminuir la respuesta de CD8⁺ y CD11c⁺, esta disminución se ve acompañada de una inhibición en la expresión génica de moléculas proinflamatorias causantes de las lesiones cutáneas presentes en la psoriasis en placa. Con el uso de este anticuerpo [Rath, 2015] la presencia de anticuerpos neutralizantes solo se presentó en <1 - 6 % de los pacientes tratados con este medicamento, el medicamento durante la fase de investigación y durante la fase de post-comercialización fue bien tolerado, sin embargo, en 2011 su producción y comercialización se descontinuo. De acuerdo con el laboratorio productor, este hecho fue ajeno al perfil de seguridad asociado al medicamento o eventos adversos no reportados que fueran graves sino simplemente por conveniencia del laboratorio.

El siguiente medicamento aprobado fue Abatacept (Orencia®), diseñado al fusionar el dominio extracelular de la molécula-4 asociada a la función linfocitaria T citotóxica (CTLA-4) y el fragmento constante del anticuerpo IgG1 humano. Este medicamento fue el primer modulador, co-estimulador, aprobado en 2005 para el tratamiento de artritis reumatoide refractaría a la terapia. La particularidad de este anticuerpo modificado radica en su mecanismo de acción, el CTLA-4 se une al CD80 y CD86 en CPAs con hasta 100 veces mayor avidéz que el propio ligando endógeno CD28. La eficacia terapéutica de este anticuerpo se extendió para evaluar su actividad en el tratamiento de artritis psoriásica, esclerosis múltiple, diabetes, lupus eritematoso, alopecia totalis y, más reciente, enfermedad inflamatoria de Bowel. Gracias a la amplia aplicación terapéutica de este anticuerpo modificado, al ser un co-estimulador de la defensa celular citotóxica, Belatacept (Nulojix®) surge en 2011 para el tratamiento de rechazo al riñón recién

trasplantado al modificar únicamente dos residuos de aminoácidos en la fracción extracelular del estimulador citotóxico (L104E y A29Y), esta pequeñísima modificación permite a Belatacept una lenta disociación durante la estimulación a CD80 y CD86 por igual.

Para este punto, la ausencia de anticuerpos anti-anticuerpos se establece como imposible, las nuevas terapias lo que buscan es que este tipo de respuesta se disminuya, tanto la presencia de anticuerpos neutralizantes como aquellos que despiertan una respuesta inmune de rechazo. Abatacept, durante su análisis en estudios de Fase II y III, mostró una incidencia de 2.8 - 3 % en la presencia de anticuerpos anti-abatacept, de los cuales algunos mostraban capacidad neutralizante pero que no afectaban la eficacia terapéutica [Haggerty et al., 2007] o la seguridad de este. En un estudio a largo plazo de estudios en Fase II, con un seguimiento mayor a los 5 años de tratamiento, anticuerpos anti-belatacept se reportaron en una frecuencia de 12 y 23 % en pacientes con administraciones únicas cada 4 a 8 semanas, respectivamente [Vincenti, et al., 2010]. Sin embargo, pacientes incluso cero positivos que recibían la terapia estuvieron ausentes de pérdida del órgano trasplantado o reacciones adversas severas autoinmunes, incluidos dos pacientes cero positivos con presencia de anticuerpos neutralizantes. Este anticuerpo demostró que, aunque no está exento de reacciones inmunes, la presencia de anticuerpos neutralizantes no afecta en gran medida la eficacia terapéutica, este factor se atañe al mecanismo de acción del medicamento al actuar sobre la función de los Linfocitos reguladores (Treg).

Otro medicamento que significó una completa innovación terapéutica y un nuevo campo de investigación en la terapéutica implicada en el uso de anticuerpos es el llamado Fc-proteína de fusión trampa para citocinas: Riloncept (Arcalyst®) es el medicamento que incorpora los dominios extracelulares de ambos receptores para IL-1, la región C-terminal de la zona de unión de la proteína accesoria para el receptor de IL-1 (IL-1RAcP) y la región N-terminal del dominio extracelular del

receptor de IL-1 tipo 1; ambas proteínas se unen a la fracción constante del anticuerpo IgG1 humano. Este medicamento funciona como un receptor soluble para IL-1 β , hasta 100 veces con mayor afinidad que el receptor nativo, además de unirse en menor medida a IL-1RA y IL-1 α . Este medicamento se prescribe como medicamento huérfano (la patología se presenta en 1 de cada 2, 000 pacientes) para síndromes periódicos asociados a criopirina incluyendo el síndrome de Muckle-Wells y el Síndrome de resfriado familiar auto inflamatorio.

Respecto a la seguridad del anticuerpo, en estudios clínicos mostraron que la presencia de anticuerpos anti-rilonacept se presentaban en el intervalo del 28 al 43 %. Sin embargo, al finalizar el estudio, pruebas séricas demostraron que estos anticuerpos desaparecieron y que la presencia de anticuerpos neutralizantes no afectaba la eficacia del medicamento.

El siguiente medicamento en la lista es una modificación a una tecnología ya existente pero que permitió generar un medicamento más efectivo para el tratamiento de la patología para la cual se prescribe. Aflibercept (Eylea®, Zaltrap®) está diseñado mediante la fusión de una trampa del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF) a un dominio Ig del VEGFR1 (receptor) humano y el tercer dominio del Ig del VEGFR2 humano, permitiendo una mejor farmacocinética y la disminución de interacciones no específicas generadas por el anticuerpo original. Estudios de mercado revelaron que es efectivo [Papadopoulos et. al, 2012] al inhibir la angiogénesis, actuando como un señuelo para unirse a la molécula de VEGF-A y B impidiendo su unión a receptores celulares. Su primera aprobación terapéutica fue para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (preparado farmacéutico inyectable intravítrea isoosmótico y ultra purificado). Recientemente, este anticuerpo fue aprobado para el tratamiento de cáncer colorectal metastásico en combinación con ácido folínico, 5-fluoracilo e irinotecan en diferentes regímenes terapéuticos.

En el 2011, romiplostim (Nplate®) fue aprobado como un cuerpo peptídico estimulante de la trombopoyesis al ser la unión de cuatro péptidos idénticos que son similares y mimetizan la acción de la estructura de la trombopoyetina, a la fracción constante del IgG1 humano (dos péptidos en cada fracción constante del anticuerpo) y se unen a través de la fracción C-terminal de la fracción constante. Este anticuerpo tiene la característica de producirse en *E. coli* por una tétrada de péptidos, además emplea la técnica de presentación de fagos para seleccionar péptidos no homólogos a la trombopoyetina humana, pero adoptar una estructura terciaria que permita su reconocimiento por receptores de trombopoyetina humana para su activación, una vez estimulado el receptor, romiplostim estimula de manera dosis-dependiente la producción de plaquetas.

En el 2003 este anticuerpo compuesto fue aprobado como medicamento huérfano por la FDA pues se desconocía las implicaciones terapéuticas que podría llegar a tener [Rath, 2016]. Fue hasta el 2008 que se le implicó en el tratamiento para la trombocitopenia púrpura crónica idiopática, con la particularidad de ser uno de los medicamentos que tienen una tasa muy baja con respecto a la aparición de anticuerpos neutralizantes (con base en estudios a largo plazo y de farmacovigilancia).

Perspectivas de aplicación.

Anticuerpo monoclonal – proteína de fusión (citocinas): Terapia inmunomodulatoria.

A pesar de que la terapia con fracciones de anticuerpo y proteínas de fusión es innovadora y representa nuevas opciones terapéuticas para patologías difíciles de tratar, no significó una mejora clave en el perfil de seguridad de estos medicamentos, pues la presencia de anticuerpos anti-anticuerpos no logro ser anulada de estas nuevas opciones terapéuticas, así como la presencia de reacciones adversas derivadas por el mecanismo de acción e idiosincráticas (estas últimas no se pueden descartar).

Por ello, la investigación terapéutica con las proteínas de fusión ha desviado su atención a su uso con fines inmunomoduladores, esto se logra utilizando citocinas. Las citocinas son producidas naturalmente en el cuerpo y funcionan como mediadores y reguladores químicos solubles del SII y SIA actuando incluso como factores estimuladores hematopoyéticos, de igual manera, las citocinas tienen la capacidad de actuar como agentes inmunomoduladores de manera local (vía endocrina o paracrina) generando una respuesta proliferativa, de diferenciación, quimiotaxis, inflamatorias o muerte celular.

El uso de citocinas con fines terapéuticos no es nuevo, esta opción terapéutica comenzó su exploración y desarrollo en conjunto con los anticuerpos monoclonales; las primeras citocinas aprobadas con fines terapéuticos fueron el INF- α y la IL-2. Novedosas estrategias han sido desarrolladas para hacer más efectiva la terapia con citocinas y la que ha tenido un mejor impacto terapéutico es con su anclaje a anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, ScFv o a receptores antigénicos quiméricos de Linfocitos T.

Es importante recalcar que la innovación terapéutica que devino con esta nueva terapia se debe a que naturalmente una gran cantidad de citocinas actúan de manera soluble y son capaces de unirse a sus receptores celulares de manera efectiva y, por lo tanto, al emplearlas como tratamiento antitumoral vía intravenosa es requerido que la molécula difunda a través del torrente sanguíneo y permita que se acumule en el tejido blanco [Valedkarimi, Z., Nasiri, H., Aghebati-Maleki, L. & Majidi, J., 2017]. La solución más aceptada a este inconveniente fue la unión a los anticuerpos aprovechando los efectos terapéuticos antitumorales de ambas moléculas.

Los primeros estudios para evaluar el efecto antitumoral de un anticuerpo IgG2 anclando IL-2 en su porción constante realizados en modelos murinos, demostró

una gran acumulación en el blanco farmacológico y alta actividad antitumoral. Para inicios del 2018, alrededor de 10 moléculas con estas características se encontraban desde en estudios *in vitro*, hasta clínicos de Fase II. Siendo la mayoría para indicaciones terapéuticas de tratamiento tumoral avanzado o metastásico, indicaciones terapéuticas poco exploradas por la complejidad de tratamiento debido al avance tumoral como se observa en la Tabla 2.

Tabla 2. Anticuerpos monoclonales con proteínas de fusión (citocinas) en estudios clínicos como inmunomoduladores.

Nombre de rastreo	Composición	Citocina	Antígeno	Indicación	Fase de estudio
hu14.18-(IL-2) (EMED 273063)	IgG-IL-2	IL-2	GD2	Neuroblastoma y melanoma	Fase II
DI-Leu16-(IL-2)	IgG-IL-2	IL-2	CD20	Linfoma No-Hodgkin	Fase I/II
L19-(IL-2)	Bianticuerpo-IL-2	IL-2	ED-B	Cáncer de colon, teratocarcinoma, de pequeñas células de pulmón y otros tumores sólidos.	Fase I/II
F16-IL-2 ⁺	Bianticuerpo-IL-2	IL-2	Dominio A1 de la Tenascina C	Cáncer de mama y de pulmón	Fase Ib/II
HRS3-scFv-hi-(IL-2)	scFv-IL-12	IL-12	CD30	Linfoma de Hodgkin	<i>In vitro</i>
AS1409 (huBC1-huIL12)	IgG-IL-12	IL-12	ED-B (fibronectina)	Carcinoma de células renales metastásico y melanoma metastásico.	Fase I
hu14.18-(GM-CSF)	IgG-(GM-CSF)	GM-CSF	GD2	Neuroblastoma	Fase I
L19-TNF α	scFv-TNF	TNF	ED-B	Tumores sólidos avanzados	Fase I/III
NHS-IL12	IgG-IL-12	IL-12	ADN	Neoplasmas epiteliales, tumores epiteliales malignos y tumor mesenquimal maligno.	Fase I

Anti-CD20 INF α , (IGN002)	IgG-INF α	INF α	CD20	Linfoma No-Hodgkin de células B	Fase I
---	------------------	--------------	------	------------------------------------	--------

*F16-IL2 se emplea en combinación con Doxorubicina

La idea de anclar la interleucina o citocina a un anticuerpo tiene como principal objetivo favorecer la acumulación del medicamento en el blanco farmacológico, como se aprecia en la Tabla 2; este objetivo se logra no solo con anticuerpos monoclonales completos (usualmente anti-tumorales) sino también con fracciones constantes del anticuerpo o scFv (producidos en *E.coli*) hasta bi-anticuerpos.

Las citocinas más empleadas para este fin terapéutico son la IL-2 y la IL-12, según lo reportado por la página *ClinicalTrials.gov*, debido a que la acumulación de estas en ciertas zonas o tejidos es indicio de muerte celular o de procesos inflamatorios [Valedkarimi, Z., Nasiri, H., Aghebati-Maleki, L. & Majidi, J., 2017]. Por su parte, la IL-2 es producida naturalmente por Linfocitos T y potencia la respuesta inmune en contra de células anormales o no reconocidas; mientras que la IL-12 es producida por macrófagos y Linfocitos B para estimular la respuesta inmune a través de un aumento en la proliferación y actividad de Linfocitos T.

Cada medicamento nuevo en investigación tiene un alto potencial terapéutico, las indicaciones para cada nueva molécula dependerá de la composición del biomedicamento, por ejemplo el uso de un anticuerpo y una interleucina proporciona una molécula nueva bivalente que será específica (por la naturaleza del anticuerpo) y tendrá la capacidad de ser reconocida por receptores específicos en células (por la naturaleza de las citocinas) y de desencadenar respuestas inmunes completas, generando un biofármaco altamente selectivo y potente. La terapia inmunomoduladora despegó para finales del 2015 segmentándose en el uso de las siguientes moléculas:

1. Interleucina 2: citocina principalmente producida por Linfocitos T CD4⁺ tras ser estimulados por la presencia de un antígeno, es un potente factor de maduración y crecimiento de Linfocitos T y se ha observado que tiene la capacidad de estimular directamente la activación de células citotóxicas y la apoptosis de células tumorales [Boyman, O. & Sprent, J. 2012].

Como se puede apreciar en la Tabla 2, la mitad de las nuevas moléculas que se encuentran en investigación tiene la citocina IL-2 anclada a anticuerpos, scFv-Fc, scFv e incluso bianticuerpos selectivos a múltiples blancos farmacológicos empleados como marcadores tumorales (antígeno carcinoembrionario, HER2, receptor de folatos, ADN, CD30, entre otros). Observando que mejora en general el perfil farmacocinético (menos reacciones adversas, mejor distribución y llegada al blanco farmacológico), produciendo una terapia en la que las citocinas administradas se acumulan mejor en el microambiente tumoral, aumentando el efecto citotóxico antitumoral y limitando los efectos adversos severos.

Dentro de las terapias en estudio, existe una molécula en particular que promete ser altamente efectiva y señala un marco de referencia acerca de cómo puede ser la molécula ideal construida a través de biotecnología para el tratamiento tumoral. La molécula hu14.18-IL2 que consiste en un anticuerpo monoclonal de clase IgG se diseña genéticamente para tener anclado en cada fracción constante la IL-2 y ser selectivo (fracción variable) para el antígeno GD₂ (presente en la superficie de células tumorales) que es un carbohidrato sobre expresado en la superficie de neuroblastomas o melanomas; la implicación terapéutica que esta molécula describe se ejemplifica mejor en la Figura 7.

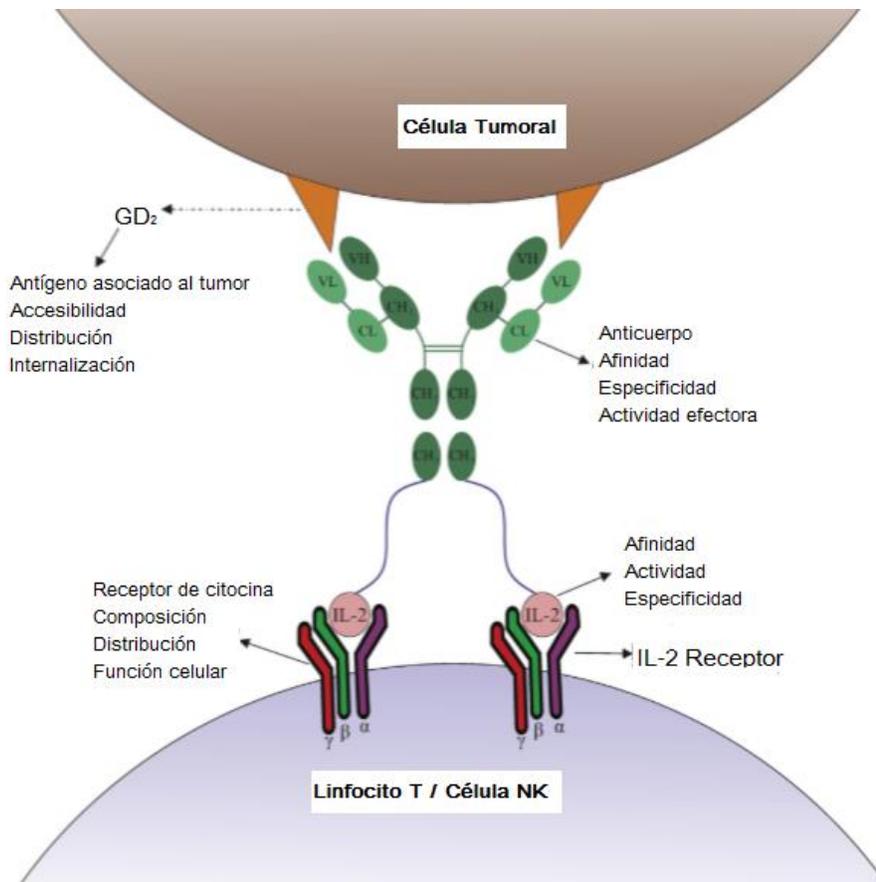


Figura 7. Molécula prototipo que ilustra el potencial de la terapia inmunomoduladora [Valedkarimi, 2017].

El diseño de este tipo de moléculas promete que la selectividad del anticuerpo guiará a la célula tumoral específicamente para dejar libre a las citocinas que entrarán en contacto, eventualmente, con células del sistema inmune y desatará una respuesta citotóxica completa para la eliminación de esa célula maligna.

2. Interleucina 12: proteína heterodimérica proinflamatoria compuesta por las subunidades p40 y p35 unidas por un puente disulfuro. En diversos estudios se han expuesto capacidades antitumorales al inducir la activación y multiplicación de Linfocitos T y células NK así como de citocinas como INF- γ ; esta actividad se observa principalmente para aquellas células malignas MHC-negativo, provocando un efecto inhibitor de la angiogénesis,

aumento en la producción de ácido nítrico por macrófagos y la activación de Linfocitos T.

Esta interleucina es compleja de manipular y generar *in vitro* debido a su naturaleza, por ello, su estudio es uno de los más complejos, pero de los más prometedores por su efecto en el organismo. La IL-12 humana no es funcional en modelos murinos, lo cual genera un problema en su estudio, por lo que se realizan estudios con la IL-12 murina anclada a anticuerpos humanizados IgG3 y fracciones variables de Trastuzumab para evaluar el efecto anti-angiogénico combinado del biofármaco.

El anticuerpo L-19, mostrado en la Tabla 2, es uno de los primeros anticuerpos con esta citocina anclada funcionalmente y tiene la capacidad de unirse a dominios humanos de fibronectina, marcador tumoral, y ejercer el efecto deseado. El uso de las subunidades ha sido analizado para evaluar su posible efecto anti-tumoral, uniendo la subunidad p40 a un scFv de L-19 a través del amino terminal y p35a otros scFv de L19 a través del carboxilo terminal para generar una molécula que se mantenga en el microambiente generado por células malignas y así ejercer su efecto directamente. Ambas moléculas han demostrado una potencia y biodisponibilidad buena en estudios *in vivo* tempranos.

3. Interleucina 15: Interleucina pro-inflamatoria perteneciente a la familia de la IL-12; juega un papel importante en la homeostasis, función biológica y actividad memorial de los CD8⁺, además de ser un potente factor de crecimiento para Linfocitos T. En estudios realizados con estas moléculas, se ha descubierto que disminuye la activación de la muerte celular programada, pero se le ha encontrado un potencial especial al anclarla a la fracción alfa del dominio extracelular de su receptor (debido a que esta citocina no se secreta en forma soluble sino debe anclarse a un receptor

para ser excretada). Gracias a esta unión previa, se ha observado en diversos estudios clínicos un alto potencial anti-tumoral de acción local y no por la infiltración de Linfocitos T (como suele suceder), siendo inclusive eficaz para el tratamiento de melanoma refractario o carcinoma de células renales metastásicas.

Estudios preclínicos han mostrado ciertas particularidades con respecto al perfil de seguridad de esta citocina, al parecer, llega a ser más segura que la IL-2, generando los mismos efectos terapéuticos, pero con reacciones adversas latentes y no de fácil resolución. Por esto, es una de las citocinas más estudiadas para la terapia inmunomoduladora [Jakobisiak, M., Golab, J. & Lasek, W. 2011]. En el 2017, esta interleucina se encontraba en estudios preclínicos y clínicos de Fase I anclándola a un bi-anticuerpo. La información disponible acerca de esta última molécula y su manipulación es limitada por cuestiones de confidencialidad.

4. GM-CSF: El factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (mejor conocido por sus siglas en inglés *Granulocyte-Macrophage Colony- Stimulating Factor*) es una citocina monomérica glicoprotéica que desempeña un rol importante en la diferenciación de células hematopoyéticas, es un potente estimulador inmune pleiotrópico que aumenta la capacidad de presentación de antígenos por CPAs, aumenta la capacidad citotóxica del sistema inmune y aumenta la producción de proteínas de adhesión para granulocitos y monocitos. El uso de esta citocina tiene como intención principal el aumento en la producción de IL-12 que propicie, a su vez, un aumento en la actividad de Linfocitos CD4⁺; induciendo la necrosis tumoral y el encogimiento de este en modelos murinos.

Al anclarla a un anticuerpo monoclonal permite una administración selectiva y que el perfil de eventos adversos (mialgia, fiebre, retención de líquidos y

efusiones serosas) disminuya. Su unión a anticuerpos tiene dos mecanismos de acción principales: unión a un anticuerpo quimérico afín a los receptores de transferrina (sobre expresados en células malignas) para propiciar la apoptosis celular, o su unión a anticuerpos humanizados a través de las fracciones constantes, escindiendo la fracción variable para aprovechar las capacidades de actividad citotóxica mediada por células capaz de desencadenarse a través del reconocimiento del Fc del anticuerpo, la presencia de esta citocina no hace más que potenciar la respuesta y disminuir el tiempo de respuesta farmacológica.

5. Interferón γ : citocina homodimérica glicoprotéica (contiene dos sitios de N-glicosilación) que une sus monómeros por interacciones no covalentes, tiene la particularidad de sufrir degradación proteolítica postraduccional en su extremo C-terminal lo cual genera cierto grado de heterogeneidad en su estructura. Es producida por Linfocitos T y células NK, es un potente inmunomodulador al estimular la presencia de MHC de clase I y II, activación de monocitos/macrófagos, CD8⁺ y las mismas NK.

Se ha estudiado su uso para el tratamiento de artritis reumatoide, enfermedad granulomatosa crónica, osteoporosis maligna y cáncer (uso conjunto con quimioterapia). Estudios preclínicos realizados con el anclaje de esta citocina a L19 reveló eficacia antitumoral contra teratoma murino y, en su uso conjunto a L19-IL2, se observó una notable mejora, sin embargo, no se cuentan con resultados concluyentes [Jakobisiak, M. 2011].

Uno de los grandes impedimentos en su uso, radica en la modificación postraduccional, se ha observado que durante el escalamiento el grado de degradación proteolítica se ve modificado y la eficacia de la molécula generada varía en cierto grado de lote a lote.

La terapia inmunomoduladora busca generar moléculas sitio específicas nucleares que activen procesos apoptóticos o moléculas que tengan la capacidad de modificar los microambientes que se generan en las zonas tumorales. La investigación en este campo centra su atención a nuevos blancos farmacológicos, siendo el más destacado la investigación contra antígenos específicos asociados a la presencia tumoral como: receptor para el factor de crecimiento epidermal, moléculas de adhesión celular epidermal, proteína de activación de fibroblastos y variantes por splice de fibronectina [Valedkaimi, 2017].

Desde 1986, hasta la actualidad, la terapia con anticuerpos monoclonales ha generado un gran impacto en el tratamiento de patologías complicadas o poco estudiadas (huérfanas); en menos de 50 años esta terapia ha dejado en el mercado una huella importante (Ver Figura 8) con 5 tratamientos esenciales: anticuerpos monoclonales (siendo los de naturaleza humanizada los más aprobados con el paso del tiempo), proteínas de fusión ancladas a anticuerpos monoclonales en sus diferentes modalidades, incluyendo la terapia inmunomoduladora (dejando al anticuerpo intacto, escindiendo la fracción variable para anclarse a la fracción constante), scFv (la gran mayoría producidas en *E. coli*) y los anticuerpos biespecíficos.

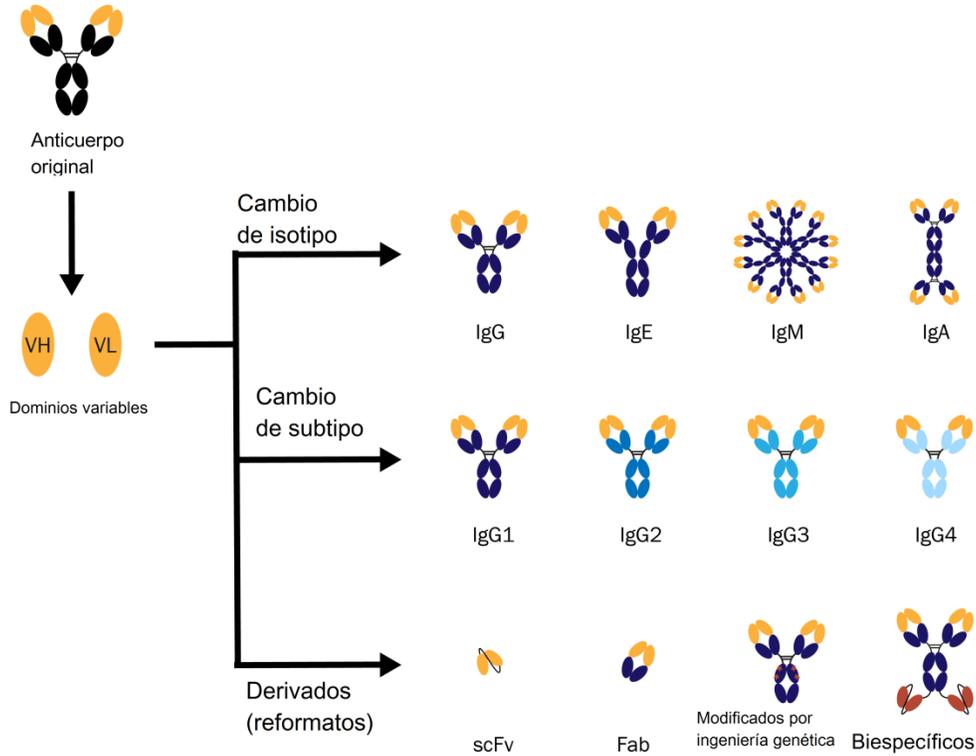


Figura 8. Esquema general de los tipos de anticuerpos en el organismo y los generados por ingeniería genética.

Aún existen muchas limitaciones con el uso de estas nuevas terapias, sin embargo, no ha impedido que alrededor del mundo la industria farmacéutica dedique cada vez más tiempo, dinero y personal en la mejora de las terapias ya existentes y en el desarrollo de nuevas que cuenten con nuevos alcances farmacológicos, con la generación de moléculas cada vez más específicas y con perfiles de eventos adversos menores.

Debido a la complejidad de las técnicas de biología molecular y biotecnológicas, una vez desarrollada cualquiera de las opciones terapéuticas arriba mencionadas, es necesario que se supervise y se asegure que el producto farmacéutico cumpla con los requisitos mínimos de calidad, seguridad y eficacia. En cada país, agencias gubernamentales se encargan de cubrir el punto anterior, creando su

propio sistema de control sanitario para proteger al potencial consumidor de cualquier posible riesgo que acarree el uso de estos productos.

Lo anterior se logra mediante la solicitud de información técnica, científica, administrativa y legal del fabricante, que confirme que el nuevo producto no sea un riesgo para la salud y cumpla con la función por la que fue diseñado. Del mismo modo es necesario asegurarse que el laboratorio fabricante cumpla con las condiciones de calidad necesarias para generar productos con el mayor estándar posible.

LEGISLACIÓN FARMACÉUTICA.

Normatividad Mexicana y sus limitaciones.

En el marco legislativo que rige a México, el Art. 4 de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos, que establece las bases y modalidades para el acceso a los servicios de salud; se indica que todos los mexicanos tienen acceso a los Servicios de Salud, dentro de los cuales se encuentran los insumos para la salud como son los medicamentos biotecnológicos.

Jerárquicamente, la Ley General de Salud establece en su capítulo XII Bis, en el artículo 282 bis, que todos los medicamentos biotecnológicos o derivados de estos que se destinen al uso o consumo humano deberán ser notificados a la Secretaría de Salud, deberán tener un control sanitario y, su investigación, producción y comercialización deberá ser notificada y estrictamente controlada con un control de calidad lo más extenso posible. Esta misma Ley, en el artículo 229, establece qué son los productos biológicos:

“Art. 229. Para los efectos de esta Ley, los productos de origen biológico o sustancias análogas semisintéticas se clasifican en:

- I. Toxoides, vacunas y preparaciones bacterianas de uso parenteral;
- II. Vacunas virales de uso oral o parenteral;
- III. Sueros y antitoxinas de origen animal;
- IV. Hemoderivados;
- V. Vacunas y preparaciones microbianas para uso oral;
- VI. Materiales biológicos para diagnóstico que se administran al paciente;
- VII. Antibióticos;
- VIII. Hormonas macromoleculares y enzimas, y
- IX. Las demás que determine la Secretaría de Salud.”

Fuera del Artículo 229 y el capítulo XII bis, no hay una mayor indicación acerca del uso y regulación de los medicamentos o productos biotecnológicos. La Ley General de Salud tiene como uno de los documentos anexos el Reglamento de Insumos para la Salud, en el cual profundiza en diversos temas tocados en esta Ley, de entre ellos, acerca del uso y regulación de estos medicamentos. En el Capítulo VII, artículo 81, se define por primera vez lo que es un biofármaco en términos legales mexicanos:

“Art 81. Se considera biofármaco toda sustancia que haya sido producida por biotecnología molecular, que tenga actividad farmacológica, que se identifique por sus propiedades físicas, químicas y biológicas, que reúna condiciones para ser empleada como principio activo de un medicamento o ingrediente de un medicamento.”

De igual manera añade, por primera vez, la definición de biomedicamento, que es análogo al término de medicamento biotecnológico:

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

Confiriéndole características únicas que permitan diferenciarlos de los medicamentos de origen biológico, alopático, homeopático y natural. En este mismo artículo, se define por primera vez a todos aquellos insumos que serán considerados como biofármacos y/o biomedicamentos, estableciendo una clara diferencia entre un producto biológico y un producto biotecnológico:

“Los biofármacos y los biomedicamentos podrán ser:

- I. **Proteínas recombinantes:** Las proteínas producidas por cualquier ente biológico procarionte o eucariote al que se le introduce, por técnicas de ingeniería genética, una secuencia de ácido desoxirribonucleico que las codifica;
- II. **Anticuerpos monoclonales:** Las inmunoglobulinas intactas producidas por hibridomas, inmunoconjugados, fragmentos de inmunoglobulinas y proteínas recombinantes derivadas de inmunoglobulinas;
- III. **Péptidos sintéticos:** Los péptidos constituidos por menos de cuarenta aminoácidos producidos por técnicas de biotecnología molecular;
- IV. **Ácidos nucleicos sintéticos o de plásmidos:** Los ácidos nucleicos obtenidos de plásmidos naturales o modificados por técnicas de ingeniería genética, y
- V. **Los demás que, en su caso, determine mediante acuerdo la Secretaría, conforme a los avances técnicos y científicos.”**

Dentro de esta lista, se encuentran los anticuerpos monoclonales, los cuales según el artículo 113 de este mismo Reglamento, indica que todo establecimiento que los fabrique necesitará de una licencia sanitaria expedida por la Comisión Federal para la Protección Contra el Riesgo Sanitario (COFEPRIS), deberán ser realizados con base en los principios de las Buenas Prácticas de Fabricación, así como contar con laboratorio(s) de control de calidad donde se realicen análisis químicos, físicos, biológicos y microbiológicos para asegurar un nivel de calidad en los productos fabricados.

También menciona, en el artículo 178 que para liberar un lote de biofármacos deberá requerir de un control externo y deberá cumplir con lo que establezca la

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos en cuanto a calidad, pureza, identidad y potencia o, en su defecto, de las farmacopeas de otros países.

Otro de los grandes puntos que contiene este Reglamento, son los requisitos básicos para la solicitud y obtención de una Autorización Sanitaria para la comercialización de anticuerpos monoclonales en México, el artículo 177 del Reglamento establece lo siguiente:

“Art. 177. Para obtener el registro sanitario de biomedicamentos, se requiere presentar solicitud en el formato oficial, al que se anexará la información documental siguiente:

- I. La monografía del biofármaco, composición y fórmula;
- II. El origen e historia del banco celular maestro, el gene, la construcción del sistema de expresión vector-hospedero para la proteína de interés y la caracterización relevante del genotipo y fenotipo;
- III. El resumen del proceso de fabricación: cepa o línea celular, fermentación, separación y purificación;
- IV. Los métodos analíticos: físicos, químicos y biológicos;
- V. La validación del proveedor de acuerdo con buenas prácticas de fabricación, que el producto cumple con las especificaciones predeterminadas;
- VI. La monografía del medicamento: forma farmacéutica, especificaciones cualitativas y cuantitativas;
- VII. El proceso de fabricación: formulación, llenado y acondicionamiento;
- VIII. Proyectos, en su caso, de Etiqueta y del instructivo correspondiente, así como las especificaciones de los Envases Primario y Secundario, y
- IX. Los estudios *in-vitro* o clínicos que señale la Secretaría.”

Este Reglamento, a pesar de que define, establece nuevos términos y aplicaciones regulatorias para el control sanitario de estos productos, no profundiza lo suficiente en aspectos de control de calidad como el manejo y control de los equipos, sistemas, personal, métodos analíticos y de limpieza, así como implicaciones de calidad que deban considerarse durante la producción y acondicionamiento de estos productos. De igual manera, no actualiza continuamente los requisitos para una autorización sanitaria ni para otros procedimientos de regulación sanitaria.

Debido a esta necesidad, surge una de las Normas que más impacta en la calidad de los insumos para la salud y en los requisitos que las plantas productoras, distribuidoras, acondicionadoras y de maquila, deben cumplir para poder comercializar sus productos en México: la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1 con su última actualización en el 2015, acerca de las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) que los establecimientos que tengan intención de producir medicamentos deberán de cumplir. Esta Norma pretende armonizar los requisitos y principios de las BPF internacionales y asentarlos en una norma de carácter obligatorio para los establecimientos en México; estas BPF deberán ser atendidas y empleadas tanto en establecimientos que pretendan producir anticuerpos monoclonales (en general, medicamentos) en México o establecimientos internacionales, para aquellas empresas trasnacionales con y sin requisito de planta en México que, de igual manera, quieran comercializar en el territorio mexicano.

A grandes rasgos, pues la intención del presente no es profundizar en los sistemas de calidad necesarios para una planta productora, la NOM introduce nuevas definiciones al marco legal, que son esenciales para la producción de medicamentos biotecnológicos, dichas definiciones se encuentran enlistadas en el Anexo 2.

Esta Norma, tiene la particularidad de introducir los términos “Lote semilla de trabajo”, “Lote semilla maestro” y, “Medicamento en investigación”. La introducción de nuevos y viejos términos en la NOM tiene como intención armonizar dichos términos empleados a nivel internacional con respecto a la información que es sometida para la solicitud de una Autorización Sanitaria en México, y no generar una tergiversación con los mismos. Los términos “Lote semilla de trabajo” y “Lote semilla maestro”, fueron introducidos como respuesta a aquellos medicamentos que son solo fracciones proteicas producidos en células eucariotas, como el caso de las ScFv que suelen producirse en *Escherichia coli*.

Además de lo antes mencionado, esta NOM, con respecto a medicamentos biotecnológicos, menciona aspectos que deben considerarse durante la manipulación de estos insumos, desde la obtención del biofármaco, hasta la producción del producto terminado, de entre la información disponible es pertinente mencionar lo siguiente:

- La fabricación de medicamentos se debe llevar a cabo siguiendo un Sistema de Gestión de Calidad soportado por una política de calidad y por un sistema de documentación que haya sido diseñado, planificado, implantado, mantenido y sometido a mejora continua, que permita que los productos sólo podrán ser comercializados o suministrados una vez que hayan sido liberados por el Departamento de Calidad con los atributos de calidad apropiados.
- Los medicamentos se deberán diseñar y desarrollar teniendo en cuenta los requisitos de las BPF. Se establece y mantiene un estado de control de la ejecución del proceso y la calidad del producto mediante medidas de monitoreo y los resultados de dichas medidas se tienen en cuenta para la liberación del lote, para la investigación de las desviaciones, y para llevar a

cabo acciones preventivas que permitan eliminar la recurrencia. Ningún medicamento se vende o se suministra sin la certificación de que cada lote de fabricación se ha producido y controlado según los requisitos establecidos.

- El sistema HVAC, incluyendo las unidades manejadoras de aire, debe ser diseñado, construido y mantenido para minimizar los riesgos de contaminación cruzada entre las diferentes áreas de fabricación.
- El bioterio, para la generación de hibridomas y demás vectores para la producción de los anticuerpos, debe encontrarse separado físicamente y ser independiente de las demás áreas. Deben existir medidas de descontaminación efectivas, incluyendo el cambio completo de indumentaria.
- Las especificaciones de los insumos empleados para la preparación de los bancos celulares maestro y de trabajo, deben incluir su fuente, origen y los controles necesarios para asegurar que son adecuados para su uso. La producción de medicamentos de origen biológico obtenidos por cultivo microbiano, cultivo celular o propagación en embriones o animales debe realizarse con base en bancos celulares maestros y de trabajo, y cuando así aplique, en base a lotes semilla maestros y de trabajo. De igual manera, deberán seguirse las siguientes indicaciones,
 - Debe documentarse el origen de los bancos celulares, la construcción del sistema vector-hospedero para la proteína de interés, contarse con la caracterización del genotipo y fenotipo y el número de pases celulares que garantizan la estabilidad bajo las

condiciones evaluadas. El origen y pase celular del lote semilla maestro y de trabajo debe ser documentado.

- También deberá documentarse la información sobre la estabilidad genética de los bancos celulares maestro y de trabajo o de los lotes semilla maestro y de trabajo. Algunos de los parámetros a considerar son la retención del segmento genético de interés y la pureza, mediante controles que demuestren que están libres de agentes microbianos adventicios y de otros contaminantes celulares ajenos al cultivo objeto.
- Los bancos celulares y/o lotes semilla deben ser mantenidos de forma separada de otros materiales, bajo condiciones de almacenamiento diseñadas con el objetivo de mantener su viabilidad y evitar su contaminación.
- Los contenedores de almacenamiento de los bancos celulares y/o lotes semilla deben estar cerrados herméticamente, etiquetados y mantenidos a la temperatura establecida. La temperatura de almacenamiento debe ser registrada de forma continua. Se debe registrar cualquier desviación de los límites establecidos y toda medida correctiva que se tome. Así como contar con un plan de contingencia en caso de falla de los sistemas de criopreservación.
- La caracterización de los bancos celulares debe incluir: identificación en cuanto especie, retención del plásmido y expresión de la proteína de interés, características del crecimiento y morfología, cariotipo de líneas celulares y número de pases.

- Otro de los puntos importantes tocados en la NOM, es el Control de la producción, en este control se deberán establecerse medidas adecuadas para las siguientes etapas del bioproceso: propagación, fermentación o cultivo celular, cosecha, purificación e inactivación, y cualquier otra involucrada con la generación del biofármaco o producto terminado. Entre algunos de los controles mencionados se encuentran,
 - La adición de insumos o medios de cultivo en los procesos de fermentación o propagación se deberá realizar bajo condiciones controladas que aseguren la no contaminación del producto.
 - La adición de sustratos, soluciones reguladoras, antiespumantes, soluciones para el ajuste de acidez o alcalinidad deberá realizar a través de un puerto que garantice la transferencia estéril de esos componentes o a través de filtros de esterilización de estos componentes.
 - Los procesos de inactivación y remoción viral deberán estar validados. Evitando la potencial contaminación viral desde los pasos pre-inactivación, eliminación viral y post-inactivación.
 - Se debe establecer el método utilizado para la separación de la biomasa de la fase líquida, que incluya los parámetros de control para la obtención de cosechas, así como los rendimientos obtenidos.
 - Se debe validar el proceso de purificación, mediante el cual se demuestre que los contaminantes residuales se reducen sistemáticamente a un nivel establecido que no represente un riesgo de toxicidad o afecte la seguridad del producto.

- Realizar un seguimiento del proceso de crecimiento celular, pureza, viabilidad celular y cuando aplique, niveles de endotoxinas y/o pirógenos.
- Todos los contaminantes deben identificarse, investigarse, documentarse, determinar la(s) causa(s) y establecer las Acciones Correctivas- Acciones Preventivas (CAPA).
- El manejo de los cultivos debe llevarse a cabo a través de sistemas de contención, que por diseño sean capaces de mantener la viabilidad, pureza y evitar su dispersión.
- Cuando se utilice un cultivo continuo, se tendrán especialmente en cuenta los requisitos de control de calidad que corresponden a este tipo de método de producción.
- Cuando el proceso de fabricación no sea continuo, deben proporcionarse datos de estabilidad que fundamenten las condiciones y tiempo de almacenamiento de los productos intermedios almacenados durante el proceso.
- Deben controlarse también el crecimiento celular, la pureza, rendimiento, así como la renovación de medio de cultivo cuando se trate de cultivos continuos.
- Los procesos de cosecha, inactivación y/o purificación, deben asegurar que el producto intermedio o el biofármaco se obtienen con una calidad consistente.

- Los materiales biológicos de referencia deben ser trazables a un estándar reconocido por la Organización Mundial de la Salud o por un Centro de Referencia Internacional. Si no están disponibles, podrán emplear materiales de referencia internos debidamente caracterizados. Los controles de proceso que no puedan realizarse en el producto terminado, como la ausencia de virus, podrán realizarse en una etapa previa y esto deberá justificarse.
- Cuando el fabricante cuente con un certificado de BPF del biofármaco y del medicamento, emitido por la Secretaría con alcance al sitio de análisis del producto terminado presentará sólo el certificado analítico del fabricante.
- Para el caso de medicamentos biológicos y biotecnológicos no pueden ser maquiladas las etapas de: fabricación del biofármaco, antígenos, graneles monovalentes o cualquier etapa previa a la formulación y llenado.

En general, la NOM-059:2015 inicia un cambio con respecto a su última actualización en 2013, sin embargo, no profundiza en los requisitos especiales para la producción de los medicamentos biotecnológicos, establece muy bien las características mínimas de calidad que la producción de un medicamento de esta naturaleza debe tener e incluye dentro de los requisitos de calidad las necesidades básicas regulatorias para los medicamentos biotecnológicos. Sin embargo, es necesario recalcar que los controles de producción no son los mismos para una proteína recombinante que para un anticuerpo monoclonal, inclusive, dentro de los mismos anticuerpos monoclonales la producción de un lote de anticuerpos monoclonales quiméricos no serán los mismos establecidos para un anticuerpo humanizado. El problema radica en el grado de profundidad implicado en la redacción de la NOM-059:2015, los medicamentos biotecnológicos

difieren por completo de aquellos de origen por síntesis química, desde la adquisición de materia prima, la instalación, el personal, los procesos de producción, purificación y acondicionamiento. Esto se explica al analizar los diversos procesos de producción para los anticuerpos monoclonales, como ya se mencionó, no existe un método único para generar mAbs y debido a esto la regulación no es tan específica como se quisiera.

Gracias a esta necesidad, y previa actualización de la NOM-059, la legislación mexicana decidió generar una NOM exclusiva para los medicamentos biotecnológicos, la Norma Oficial Mexicana NOM-257-SSA1 en materia de Medicamentos Biotecnológicos, con su última actualización en 2014. Esta NOM se plantea como una extensión de la 059:2013 y para responder ciertos cuestionamientos respecto a la regulación sanitaria de estos medicamentos que se venían haciendo desde la aparición en el mercado mexicano de esta clase terapéutica pero no habían tenido una respuesta concreta. Esta norma es aplicable tanto para medicamentos innovadores (medicamentos con biofármacos únicos en el mercado) y medicamentos biotecnológicos biocomparables (medicamentos con el mismo biofármaco que el medicamento de referencia, pero difiere en su formulación, dispositivo de aplicación o método de obtención, entre otros). Cabe resaltar que para este último existe una Norma especial para la regulación de este tipo de insumos, pero el presente omitirá a esta clase.

Hablando un poco más acerca del tipo de Autorizaciones Sanitarias que estos medicamentos requieren, el artículo 376 de la Ley General de Salud establece que los medicamentos biotecnológicos deberán tener un registro sanitario siempre y cuando cumplan con los requisitos y pruebas que demuestren la calidad, seguridad y eficacia del producto. Esta idea viene reforzada en el segundo párrafo de la NOM-257:2014. Además, esta última está compuesta por 14 numerales de los cuales es destacable lo establecido en el numeral 5.1 Generalidades, el cual establece que para la Autorización Sanitaria de este tipo de medicamentos, la

Comisión Federal para la Protección contra el Riesgo Sanitario (COFEPRIS), cuenta con un Comité de Moléculas Nuevas (CMN) el cual a su vez tiene un Subcomité de Evaluación de Productos Biotecnológicos (SEPB) que se encuentra integrado por especialistas y científicos en materia de biotecnológicos y, que este, se encargará de evaluar la información técnica y científica generada durante el desarrollo del medicamento en cuestión, previo al sometimiento de la solicitud de registro sanitario, a manera de agilizar la autorización. La Secretaría de Salud, con base en la opinión generada en la cita con el CMN y SEPB, determinará la autorización o revocación de la solicitud de Registro Sanitario y comercialización en el territorio nacional.

El punto crítico que atañe a esta norma es el numeral 6, acerca del control de la fabricación de medicamentos biotecnológicos, en el cual establece que el titular del registro sanitario del medicamento biotecnológico deberá someter un programa de aseguramiento de calidad del producto que incluye un programa de validaciones y/o revalidaciones de los procesos involucrados en la manufactura además de la información de los parámetros críticos de la validación, programa de auditorías internas del producto y del proceso (reportando acciones correctivas y preventivas) de manera anual y deberá someterse dicha información para el proceso de prórroga del registro sanitario. Este numeral ha generado una serie de problemas interminables debido a que los parámetros o criterios de aceptación para esta documentación no está establecida y la emisión de prevenciones por parte de la Autoridad se ha marcado intermitentemente. Todo este problema radica en el grado de complejidad en el que los procesos de validación o revalidación son realizados, la validaciones o revalidaciones se deben realizar al personal, a los métodos (de producción y de limpieza), se deben calificar equipos y sistemas en su desempeño, diseño, instalación y operación desde la adquisición de la materia prima hasta el acondicionamiento final del medicamento y su posterior almacenamiento.

Por su parte, los siguientes numerales pasan totalmente desapercibidos en cuestión de importancia con respecto a los anteriores, el numeral 7 menciona los requisitos para la autorización de protocolos de investigación clínica estableciendo:

“... seguirán el mismo procedimiento de autorización de cualquier protocolo de investigación clínica”.

Mientras que el numeral 8, remite a que estos medicamentos deberán seguir los lineamientos establecidos en la NOM-220-SSA1-2012 en materia de Farmacovigilancia sin mencionar particularidad alguna con respecto al cuidado y vigilancia en su distribución y uso. Teniendo un numeral 9 acerca de los requisitos para el reconocimiento de medicamentos biotecnológicos de referencia que se emplean, valga la redundancia, como medicamentos referentes en la producción de biocomparables. Esta NOM generó bastante polémica pues en vez de responder cuestiones importantes acerca de la regulación de estos insumos, provocó más preguntas y huecos regulatorios.

Aprobación Sanitaria en México.

Con respecto al funcionamiento de estos comités (CMN y SEPB), el Reglamento Interno del Comité de Moléculas Nuevas implementado el 23 de febrero de 2012, establece que este es un órgano auxiliar de consulta y genera opiniones para agilizar la resolución de solicitudes. El CMN tiene como funciones: realizar evaluaciones técnicas para medicamentos con moléculas nuevas, emitir opiniones técnicas sobre las adecuaciones a los proyectos relacionados a medicamentos que no existan en el mercado nacional o se pretendan utilizar en la investigación en salud para uso humano, emitir opiniones técnicas respecto a otros insumos y acordar la creación de Subcomités (como el SEPB). El Subcomité de Evaluación de Productos Biotecnológicos es generado para el mejor desempeño de las funciones del CMN, este subcomité cuenta con 5 representantes de Asociaciones

Académicas, un Secretario Técnico, el vicepresidente y presidente del CMN; evaluará la información técnica y científica presentada para el proceso de solicitud de registro sanitario de medicamentos biotecnológicos innovadores y biotecnológicos biocomparables comprendidos en el artículo 177 bis 2 del Reglamento. Los miembros de este subcomité emitirán opiniones a título personal sin representar o actuar en nombre de instituciones u organizaciones a las que presten sus servicios.

Este comité tiene una sesión ordinaria por semana para evaluar las diversas solicitudes y sesiones extraordinarias para cuando la situación lo amerite y requiere del 100% de los participantes para validar la sesión. Terminada la sesión, es emitida un acta con el lugar y fecha de la sesión, el nombre de los asistentes, la agenda del día, acuerdos generados, inicio y termino de la sesión, tema abordado, conclusión de la reunión y opinión fina, además de observaciones finales. Esta acta, si es aprobatoria, se anexa a la solicitud de registro sanitario del medicamento biotecnológico. De esta forma, el documento CAS/DEAPE/8153/2018 acerca de los Lineamientos de Operación del Comité de Moléculas Nuevas establece que la solicitud para registro sanitario deberá estar presentada en el formato de Escrito Libre publicado en la página web de la COFEPRIS con Sello del Centro Integral de Servicio (CIS).

Ahora, un punto importante que conlleva esta solicitud es que la COFEPRIS, a manera de armonizar los requisitos necesarios para la autorización sanitaria y, para solucionar todos los huecos legislativos que la Normatividad Mexicana tiene, requiere que la información a someter cumpla y se organice con base a la guía ICH (*International Conference of Harmonisation*) M4: *Organisation of the Common Technical Document for the Registration of Pharmaceuticals for Human use*. Para ello, es necesario mencionar que la información generada debe organizarse con base en ciertos lineamientos que la COFEPRIS tiene como control interno, esta

organización se retomará posteriormente, y deberá someterse en formato electrónico (USB) durante la solicitud.

Existen dos modalidades en la que se puede someter la información técnica y científica generada durante la producción del anticuerpo monoclonal ante el Comité, previo a su sometimiento ante la Autoridad; éstas son: Opinión Técnica y Opinión Técnica Especial. La información generada durante el desarrollo hasta la adaptación a la forma farmacéutica elegida para comercializar deberá ser sometida ante el Subcomité en la modalidad de Opinión Técnica, ya que los medicamentos biotecnológicos no pueden ser ingresados como Opinión Técnica Especial, por su naturaleza de riesgo sanitario potente.

La Opinión Técnica Especial consiste en que el Coordinador del Comité con base en la información sometida con anterioridad evaluará si es necesaria la presencia o no del solicitante. Cuando no se requiere la presencia del solicitante se emitirá la Opinión Técnica en 20 días hábiles tras la fecha de solicitud. Esta opción únicamente es viable para aquellos medicamentos no biotecnológicos de bajo riesgo.

Si la presencia del solicitante es requerida, el proceso a seguir consistirá conforme a lo realizado en un sometimiento a Opinión Técnica, en este caso, en un plazo no mayor a 60 días hábiles tras la solicitud, el Subcomité evaluará si la información cumple con la solicitado por la Autoridad. Tras la aprobación, se notificará al solicitante con 20 días hábiles de anticipación la fecha de la reunión y este tendrá 5 días hábiles para confirmar la cita o reprogramar hasta una vez la misma. Confirmada la cita, se deberá enviar con al menos 5 días hábiles de anticipación a la reunión la presentación de la información a exponer ante los expertos del Subcomité que no superará a los 6 invitados.

Tras una reunión exitosa, se emitirá un documento que contenga la Opinión Técnica en un plazo no mayor de 20 días hábiles tras la reunión. Es importante mencionar que, si alguno de los puntos solicitados no cumple, la solicitud será revocada y se tendrá que realizar el proceso desde cero, de igual manera, es esencial mencionar que el documento emitido tiene la intención de facilitar la revisión de la información sometida ante la Autoridad, pero no implica que esta última emita la Autorización Sanitaria.

El Documento Técnico Común (DTC) que se somete, contiene toda la información relevante acerca del desarrollo y producción del medicamento biotecnológico innovador, su estructura se basa en la Guía ICH M4Q acerca del correcto armado del DTC con ciertas modificaciones hechas por la COFEPRIS para satisfacer los requerimientos aprobatorios. El DTC debe contener 5 módulos de información, en resumen:

Módulo 1: Información Administrativa.

Compuesto principalmente por información administrativa y técnica como lo es un índice general del contenido presente, el Oficio de Solicitud para Reunión ante el SEPBB, Carta de Solicitud a manera de prosa libre, el estatus regulatorio-aprobatorio a nivel internacional de la molécula a registrar. Proyectos de marbete e Información para Prescribir en su versión amplia, así como instructivos de uso y descripción de los dispositivos médicos empleados para la administración del medicamento con su instructivo correspondiente e información de farmacovigilancia recopilada.

Módulo 2: Resúmenes

Esta sección debe contener el resumen de las otras secciones, los cuales deben contener la información crucial para evaluar la calidad, seguridad y eficacia del medicamento.

Debe contener un resumen de la calidad del biofármaco acerca de información general estructural, de manufactura, caracterización, controles en proceso de síntesis para el biofármaco, los materiales de referencia empleados para los métodos analíticos, el sistema contenedor utilizado para almacenar el biofármaco y resúmenes de los estudios de estabilidad realizados al biofármaco.

De igual forma, la información acerca del medicamento biotecnológico deberá resumirse, incluyendo información acerca de la composición y descripción del medicamento, el desarrollo de la forma farmacéutica y adecuación del biofármaco a esta, el proceso de manufactura, los controles en el proceso, los materiales de referencia empleados en los diversos métodos analíticos utilizados en los puntos anteriores, el sistema contenedor y los resúmenes de los estudios de estabilidad realizados al medicamento.

Posteriormente, en esta misma sección, se deberá colocar un anexo resumiendo las condiciones de instalación empleadas en la producción completa, así como de validación y calificación realizadas al equipo, instrumental y personal, según sea el caso. Se deberá adicionar el resumen de la evaluación contra agentes adventicios, un resumen de la calidad de los excipientes utilizados y el resumen de alguna información adicional al medicamento requerida por la Autoridad regional.

Como siguiente punto, es requerido la información de la calidad y seguridad del medicamento, resumiendo la posible toxicidad del medicamento biotecnológico. La información contenida aquí debe mencionar el perfil farmacocinético y farmacodinámico esperado del medicamento, toxicidad unidosis y/o multidosis, potencial genotóxico, carcinogéncio, toxicidad reproductiva, así como durante el embarazo y lactancia, tolerancia local, y otros aspectos que establezcan una aproximación para el perfil de seguridad del medicamento.

Como punto final, es necesario resumir la información acerca de la eficacia del medicamento. Al final del módulo deberá encontrarse un resumen acerca de los estudios clínicos realizados con el medicamento, desde la Fase I, hasta los estudios de Farmacovigilancia temprana de Fase IV, dichos resúmenes deberán establecer información relevante acerca del biofármaco, de su farmacología, eficacia, complementar el perfil de seguridad obtenido en la fase preclínica, conclusiones acerca del balance riesgo-beneficio para la indicación solicitada y referencias bibliográficas que respalde el uso de ese biomedicamento con aproximaciones realizadas y establecidas en la literatura científica.

Módulo 3: Calidad del Medicamento

Esta sección debe contener estudios completos acerca del biofármaco y del biomedicamento.

Con respecto al biofármaco, se debe adicionar información acerca su nomenclatura internacional o código DCI, su estructura y propiedades generales; acerca del proceso de manufactura incluyendo información de los fabricantes, descripción del proceso de manufactura y controles en el proceso, materiales de control, intermediarios y control de puntos críticos, procesos de validación y desarrollo del proceso de manufactura. Se debe incluir la caracterización del biofármaco con elucidación de su estructura y otras características importantes de la molécula como impurezas presentes. Se deberá establecer el perfil de especificaciones para el biofármaco, los procedimientos analíticos para la obtención de dichas especificaciones y su validación, análisis de lote y una justificación de las especificaciones; también se debe incluir información de calidad de los materiales de referencia empleados; la descripción del sistema contenedor, así como sus especificaciones de calidad, finalizando con la estabilidad del biofármaco, así como los protocolos de evaluación post aprobación.

Para el biomedicamento, se debe describir y especificar la composición de este incluyendo los excipientes empleados; se debe incluir información acerca del proceso realizado para la conversión del biofármaco al biomedicamento incluyendo la formulación, cantidades y propiedades fisicoquímicas y biológicas del producto final. Se debe explicar el proceso de manufactura y los métodos de optimización empleados; describir el sistema contenedor del biomedicamento y su adecuabilidad a la vía de administración deseada, así como los atributos microbiológicos resultantes del proceso de manufactura y la manera en la que la forma farmacéutica mantendrá estos atributos. En el caso de un liofilizado, estudios de compatibilidad y estabilidad tras la reconstitución es necesaria. Para el proceso de fabricación, incluir a todos los fabricantes, la fórmula de lote, una descripción detallada del escalamiento y los controles en el proceso, así como una descripción y caracterización de intermediarios en el proceso. Se deben incluir los procedimientos a realizar para proteger los puntos críticos del proceso y los procesos de validación realizados a los métodos empleados.

Se debe incluir información acerca de la calidad de los primeros lotes producidos tras cada escalamiento, la caracterización de impurezas encontradas, los materiales de referencia utilizados, así como información acerca de la calidad de los excipientes y sistema contenedor que se estén utilizando para la forma final elegida. También, se debe proveer toda la información acerca de la estabilidad del medicamento y el protocolo de estabilidad post-aprobación.

Este módulo incluye un anexo que ejemplifica las instalaciones empleadas para la producción, su condición y los procedimientos empleados para mantener su integridad; ensayos para la evaluación de agentes adventicios y controles en el proceso para reducir su posibilidad de aparición, así como información regional que incluye, lista de identificación de lotes evaluados y producidos, ordenes de producción y CoAs, reportes de compatibilidad y extrapolación de datos.

Módulo 4: Estudios preclínicos (Seguridad del medicamento)

Este módulo contiene estudios realizados con modelos animales o tejidos (no vivos o vivos) para establecer un perfil de seguridad del biomedicamento, se deben incluir estudios de farmacodinamia primaria y secundaria, posibles interacciones medicamentosas y aproximaciones de seguridad farmacológica; también se deben incluir estudios de farmacocinética para establecer perfiles de absorción, distribución, metabolismo, excreción, interacciones farmacocinéticas y reportes de validación de métodos. De igual manera, deben incluirse estudios de toxicología que evalúen la posible toxicidad unidosis o a dosis repetida, la capacidad genotóxica, carcinogénica, y desarrollo de toxicidad en etapas reproductivas o del embarazo, la posible tolerancia local y otros estudios de toxicidad que evalúen la antigenicidad, inmunotoxicidad, estudios del mecanismo de acción, así como evaluar la capacidad de posible dependencia, metabolitos posibles e impacto de las impurezas presentes.

Módulo 5: Estudios Clínicos

Este módulo centrará su contenido en estudios clínicos realizados en humanos, desde la Fase I hasta la Fase IV post-comercialización para medicamentos que estén solicitando aprobación cuando ya se ha aprobado en otros. Los estudios clínicos incluidos en este módulo deberán esclarecer puntos clave en la farmacología del producto como la biodisponibilidad, la posible unión a proteínas o acarreadores en sangre, reportes bioanalíticos realizados en biomateriales, estudios que evalúen la farmacocinética en humanos (en sujetos sanos y en pacientes, así como en poblaciones), estudios de tolerancia, y la determinación de factores intrínsecos y extrínsecos farmacocinéticos. Una vez descrita la farmacocinética en humanos, se deben incluir estudios clínicos en humanos evaluando la farmacodinamia del nuevo producto y evaluación de la eficacia y seguridad del medicamento en pacientes, tanto en estudios controlados como en estudios no controlados. Todos los estudios realizados, en individuos sanos como

en pacientes, deben tener informes acerca de la seguridad del medicamento, ya sean en reporte de casos o paciente a paciente.

Toda la información mencionada, debe estar perfectamente estructurada con base en lo establecido en la página web de la Autoridad (Gobierno de México. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. Acción y programa <https://www.gob.mx/cofepris/acciones-y-programas/subcomite-de-evaluacion-de-productos-biotecnologicos>) acerca del sometimiento en electrónico (USB) de la información para evaluación ante el SEPB.

De igual manera, la COFEPRIS establece que la información a someter debe adecuarse a las Guías Internacionales de Armonización o ICH (*International Committee of Harmonisation*) cualesquiera que aplique, dependiendo de la naturaleza del medicamento pues, reconoce, que la Normatividad regional no es lo suficiente específica.

Normatividad Internacional: KEYTRUDA® (Pembrolizumab).

Comité Internacional de Armonización.

Cómo se mencionó anteriormente, la COFEPRIS ha basado sus criterios de autorización sanitaria en las recomendaciones que el Comité Internacional de Armonización ha establecido en sus diversas guías, el grado de cumplimiento determinará si es aprobado o no el medicamento solicitante. El presente se enfocará únicamente en explicar las aplicables para medicamentos biotecnológicos, las cuales se encuentran resumidas en el Anexo 3, del presente.

Para explicar el riesgo de que COFEPRIS justifique que sus criterios de aprobación en guías de recomendación y que no se cuente con una Norma Oficial Mexicana que profundice en la Autorización y Control Sanitario de medicamentos biotecnológicos innovadores, se tomará como ejemplo al medicamento biotecnológico aprobado KEYTRUDA®, perteneciente a la compañía Merck Sharp & Dohme B.V. Cabe resaltar que toda la información presentada es de acceso

libre y pertenece a la sometida ante la FDA, EMA y COFEPRIS para su aprobación, así como información extraída de las páginas web de cada Autoridad y del fabricante.

KEYTRUDA® es un medicamento biotecnológico que cuenta como biofármaco a Pembrolizumab formulado con L-Histidina, Hidrocloruro de L-Histidina monohidratado, Sacarosa y Polisorbato 80. Pembrolizumab (desarrollado con el nombre de MK-3475) es un anticuerpo monoclonal humanizado IgG4 isotipo kappa con una modificación en la secuencia estabilizadora en la fracción constante del tipo SER228PRO, presentando glicosilaciones heterogéneas del tipo Asn297 en cada cadena de la fracción constante; siendo la isoforma más común el glicano agalacto-fucosilado diantenario y siendo este anticuerpo selectivo a la molécula de la muerte celular programada-1 (PD-1), producido en líneas celulares CHO a través de ingeniería genética.

Este anticuerpo contiene 447 aminoácidos en cada cadena pesada y 218 aminoácidos en cada cadena ligera con 32 residuos de cisteína que forman doce puentes disulfuro como uniones intracatenarias y con un peso aproximado de 149 kDa en su forma glicosilada.

Se encuentra indicado para el tratamiento de las siguientes patologías:

1. Tratamiento de melanoma avanzado en adultos (monoterapia).
2. Tratamiento de primera línea para cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) metastásico en adultos cuyos tumores expresen PD-L1 con un marcador tumoral (TPS) ≥ 50 sin mutaciones tumorales en EGFR o ALK (monoterapia).

3. Tratamiento de CPNM no escamoso metastásico en adultos sin mutaciones tumorales en EGFR o ALK (combinación con pemetrexed o terapia con platino).
4. Tratamiento de CPNM escamoso metastásico en adultos (combinación con carboplatino, paclitaxel o nab-paclitaxel).
5. Tratamiento de CPNM localmente avanzado o metastásico en adultos cuyos tumores expresen PD-L1 con TPS ≥ 1 % que hayan recibido un tratamiento de quimioterapia (monoterapia).
6. Tratamiento de Linfoma de Hodgkin clásico en recaída o refractario, que no han respondido a un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos ni a el tratamiento con brentuximab vedotina o que simplemente no hayan sido candidatos (monoterapia).
7. Tratamiento del carcinoma urotelial localmente avanzado o metastásico en adultos no candidatos a quimioterapia con platino y cuyos tumores expresen PD-L1 con una puntuación positiva combinada (CPS) ≥ 10 que hayan recibido quimioterapia previa con platino (monoterapia).
8. Tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC) recurrente o metastásico en adultos con expresión de PD-L1 y TPS ≥ 50 % con progresión del tumor en tratamiento con platino (monoterapia).
9. Adyuvante para el tratamiento de melanoma en estadio III y con afectación de ganglios linfáticos que hayan sido sometidos a resección completa en adultos (monoterapia).

A pesar de tener múltiples indicaciones terapéuticas, el tratamiento de melanoma es su fuerte principal en publicidad y blanco de marketing. El melanoma es la forma más agresiva de cáncer de piel en humanos y se encuentra entre la quinta y séptima causa de muerte más común entre hombre y mujeres que padecen procesos malignos. Suele presentarse con un alto nivel de resistencia al tratamiento con quimioterapéuticos sistémicos alopáticos como es el uso de dacarbazina o derivados del platino.

Pembrolizumab es un producto secretado en el medio utilizando Células CHO, y empleando un BCM y BCT completamente caracterizado en el cual las células del BCT se expanden en matraces, después en bolsas de balanceo (*rocker bags*) para finalizar en la inoculación en el biorreactor. El proceso de purificación incluye tres pasos de cromatografía, dos pasos de depuración viral ortogonal, ultrafiltración/diafiltración y la filtración del concentrado final en 0.2 microlitros; empleando materias primas libres de componentes animales.

El biofármaco es caracterizado en su estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria y los productos relacionados generados en el proceso se eliminan en los pasos cromatográficos (tamaño, carga e hidrofobicidad), asegurando un biofármaco libre de productos relacionados, impurezas como proteínas del hospedero, ADN del hospedero y proteína A. Aunado a lo anterior, el biofármaco es caracterizado en su identidad, potencia (estudio de unión competitiva de ELISA), pureza y determinación de impurezas.

Como producto terminado, Pembrolizumab se formula con una cantidad menor de excipientes y se ajusta a un pH de 5.2 - 5.8 para ser liofilizado y empleado como polvo para reconstitución. Para el proceso de manufactura y el paso de pembrolizumab a KEYTRUDA®, el biofármaco se emplea como polvo liofilizado mantenido en congelamiento a $\leq - 35$ °C para ser descongelado, mezclado, sometido a un proceso de filtración para la reducción de carga biológica

(*bioburden*), filtración esterilizante, llenado, liofilización, sellado e inspección visual como paso final del proceso.

Pembrolizumab se almacena en un sistema cierre-contenedor en vales de vidrio tipo I, tapado con bromobutilo y sellado con sistema flip-off. Con respecto a la seguridad contra agentes adventicios, el producto terminado durante su proceso de fermentación emplea sueros libres de materiales derivados de animales, sin embargo, es necesario efectuar un escaneo acerca del contenido viral y una limpieza profunda determinando que el contaminante más persistente suelen ser partículas retrovirales intracelulares de tipo A, las cuales se conocen por ser contaminación característica de la línea celular CHO.

Pembrolizumab, salió al mercado con la intención de desplazar a Ipilimumab (Yervoy®), un anticuerpo monoclonal dirigido contra el factor CTLA-4, como primera línea de tratamiento contra melanoma así como de las opciones terapéuticas vemurafenib (Zelboraf®) y dabrafenib (Tefinlar®) que son inhibidores de la cinasa para pacientes con melanoma BRAFV600 positivos (el factor BRAF seronin-treonin cinasa presenta cierto tipos de mutaciones específicas en procesos malignos como el melanoma, 50 %, tiroides, 30 - 70 %, en ovarios, 30 %, o colorectal con 10 % de incidencia). Estas opciones terapéuticas se empleaban en conjunto o sustituyeron a la dacarbazina y al paclitaxel, los cuales son agentes quimioterapéuticos poco específicos y con baja eficacia terapéutica.

Merck apostó por el desarrollo de este anticuerpo debido a que estudios en animales revelaron que el receptor celular de PD-1 es pieza clave para la regulación y activación de Linfocitos T, como se ilustra en la Figura 9, al pertenecer a la misma familia de moléculas estimuladoras a la que pertenece el receptor CD28 (co-estimulador) y CTLA-4 (co-inhibidor) y, que al ser bloqueada la acción de PD-1 sobre su receptor, hay un mejor control de la actividad anti-tumoral. Una vez probado *in silico* e *in vitro*, Pembrolizumab demostró en estudios

de superioridad evaluando la supervivencia promedio (OS) y supervivencia en progresión libre (PFS), ser superior a su competencia en el mercado internacional, teniendo valores de OS de 10.1 a 6.4 meses, HR: 0.66 y $p = 0.003$ contra Ipilimumab, mientras que contra vemurafenib denotó OS de 13.6 a 9.7 meses, HR: 0.70 y $p < 0.0001$ con FPS de 6.9 a 1.6 meses, HR: 0.38 y $p < 0.0001$ mostrando una superioridad inclusive contra dabrafenib (FPS de 6.9 a 2.7 meses).

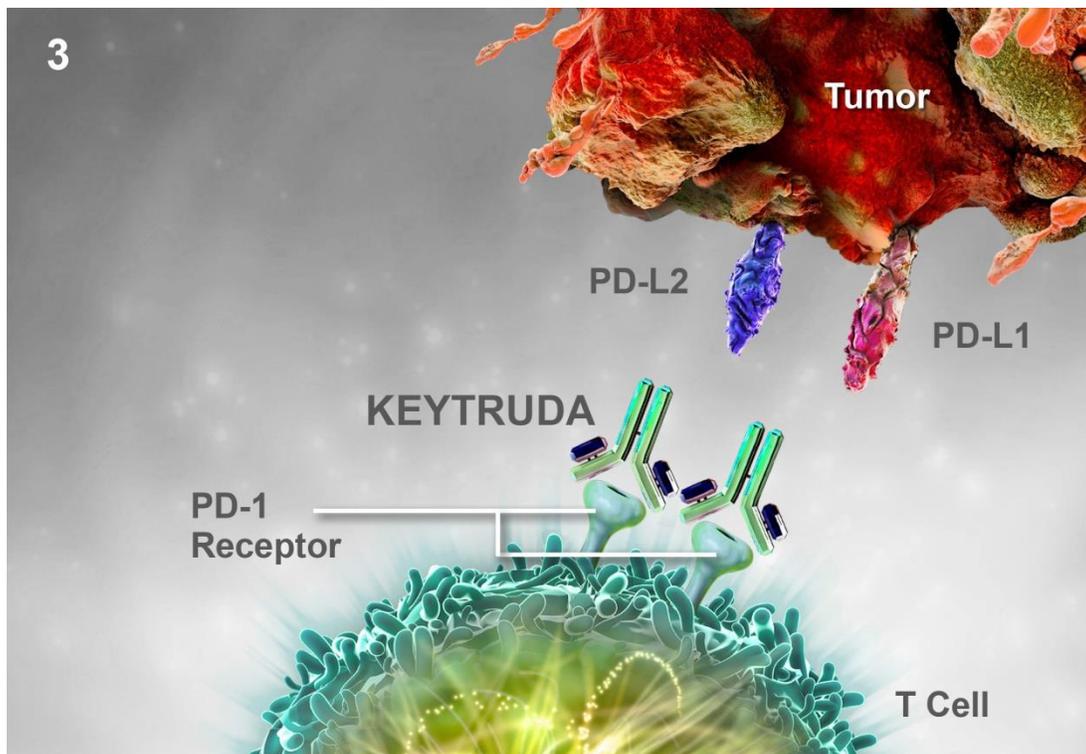


Figura 9. Mecanismo de acción de KEYTRUDA (pembrolizumab). [Merck Sharp & Dohme Corp., 2019].

Debido a lo anterior, Pembrolizumab tiene el récord de tiempo de aprobación ante la FDA con un valor menor a cuatro años contando a partir de la fecha inicial del sometimiento del expediente IND o Nuevo Fármaco en Investigación (*Investigation New Drug*), lo cual no se había visto con algún otro medicamento. La velocidad en la aprobación sanitaria se justificó por la FDA por presentar una tasa de respuesta promedio (OR) del 40 % con tan solo una duración promedio de respuesta (DOR) de 0.9 a 7.9 meses y siendo aprobado en un inicio como segunda línea de

tratamiento para melanoma metastásico que haya o no presentado fallo en el tratamiento con Ipilimumab y con mejores resultados terapéuticos si el paciente es BRAF V600 positivo; esta indicación después se modificó para ser la primera línea de tratamiento para pacientes con melanoma avanzado y como adyuvante para el melanoma estadio III.

Por su parte, el Comité para Productos Medicinales de Uso Humano o CHMP (*Committee for Medicinal Products for Human Use*), órgano regulador de la EMA. Comenzó la revisión del Dossier en junio de 2014 para emitir un Oficio en octubre del mismo año en el que cuestionaron al aplicante ciertos puntos que no quedaban claros en la información sometida acerca de la fabricación del biofármaco y el contenedor final. El solicitante respondió en febrero de 2015 y se le solicitó un reestructuración del Plan de Manejo de Riesgos (PMR) que no consideraba ciertos puntos críticos respecto a los Eventos Adversos presentes. El solicitante sometió en abril del 2015 un nuevo PMR para que en mayo del 2015 se diera la aprobación sanitaria por parte de este comité a Pembrolizumab, un nuevo medicamento para el tratamiento en monoterapia de melanoma avanzado en pacientes adultos únicamente. De igual forma, se solicitó estudios de Farmacovigilancia y Postmarketing para evaluar la eficacia terapéutica y un rediseño de los criterios por los cuales KEYTRUDA® debe ser retirado del paciente.

Durante la revisión de los expedientes de aprobación sometidos, tanto la FDA como la EMA encontraron puntos críticos que frenaron el proceso de aprobación. En la Tabla 3, se encuentran resumidos los principales problemas encontrados tanto en la información sometida para aprobación en Estados Unidos como en Europa.

Tabla 3. Puntos críticos observados durante la revisión de la información sometida para la aprobación de Pembrolizumab (Keytruda®) por la FDA y la EMA.

Puntos críticos observados.	
<i>Food Drug Administration (FDA)</i> Aprobación bajo la provisión 21 C.F.R., 601, subparte E	<i>European Medicine Agency (EMA)</i> Aprobación bajo el artículo 8.3 de la Directiva 2001/83/EC
Se desconoce la razón por la cual hay respuestas atípicas al tratamiento como aumento transitorio del tamaño tumoral o nuevas lesiones pequeñas dentro de los primeros meses del tratamiento.	Caracterización del biofármaco en sus microheterogenicidades e impurezas presentes como productos relacionados.
El aplicante indica que KEYTRUDA® debe suspenderse si hay un aumento tumoral o si la toxicidad no se recupera a Grado 0 - 1 en un plazo menor a 12 semanas cuando el mismo tratamiento indica que puede generar crecimiento tumoral.	Diferencias que no pasan desapercibidas entre dos métodos de manufactura empleados en dos diferentes sitios de manufactura e impactan en la seguridad y calidad final de biomedicamento. (Eliminación de un sitio de manufactura)
Los datos sobre la seguridad y eficacia de KEYTRUDA® en pacientes con melanoma ocular no son lo suficiente para cubrir esta patología.	Evaluación final de la calidad del producto.
No se ha limitado su uso en adultos pues no se cuentan con estudio de seguridad y eficacia en población pediátrica.	Bioensayos ortogonales para la caracterización de Fab y Fc: no se caracterizaron bien los dominios del anticuerpo.
El perfil de seguridad no profundiza en el riesgo generado durante la administración por perfusión intravenosa que dura 30 minutos de manera paulatina y lenta.	Ensayos realizados con el método de ELISA no ejemplifica lo suficientemente bien el mecanismo de acción del anticuerpo ni efecto terapéutico.
En terapias combinadas, no se indica el efecto de administrar primero el anticuerpo y después el agente quimioterapéutico o viceversa.	El sistema cierre contenedor presentó problemas respecto a los Certificados de Análisis presentados ya que uno de los componentes de este sistema se desconoce si puede llegar a generar toxicidad o eventos adversos en el paciente.
Se observa un aumento en la tendencia a presentar reacciones adversas en pacientes > 75 años, se debe reevaluar la edad en la que este medicamento debe administrarse.	Se desconoce la seguridad y eficacia en infantes por lo que su uso deberá limitarse en adultos.
Estudios preclínicos revelan rechazo al feto en modelos animales, se debe establecer la seguridad del tratamiento en mujeres embarazadas y en edad fértil.	
Evaluar el perfil riesgo beneficio del medicamento debido a que los estudios clínicos	

denotan un 66 % de incidencia de reacciones adversas Grado 3 - 5 con la quimioterapia sola, pero del 67 % con pembrolizumab.	
--	--

En la Tabla 3 se exponen los problemas encontrados en la información sometida que generaron ambas solicitudes de aprobación. Estos problemas considerables como relevantes afectaban la seguridad y calidad del producto final. Todos esos problemas lograron ser resueltos por lo que las solicitudes de aprobación fueron autorizadas en los diferentes países con sus respectivas consideraciones y modificaciones a las condiciones de aprobación solicitadas.

La FDA aprobó al medicamento bajo las siguientes condiciones:

- Realizar más estudios clínicos en el que se evalué la eficacia del anticuerpo contra el melanoma, estableciendo valores reales de OS y PFS en pacientes con melanoma clase III para extender la indicación terapéutica.
- Evaluar el efecto del anticuerpo sobre el embarazo y el posible rechazo al feto que se observa en modelos murinos.
- Se aprueba como segunda línea de tratamiento para el melanoma clase III y como primera línea para el melanoma avanzado, con el compromiso de realizar estudios de farmacovigilancia y evaluar el verdadero efecto en la población para así, posteriormente, modificar la indicación terapéutica.

La EMA autorizó al anticuerpo bajo las siguientes condiciones:

- Eliminación de uno de los sitios de manufactura del biofármaco por presentar diferencias considerables en el proceso de manufactura del anticuerpo. En este punto no se da más información de cuáles fueron las diferencias encontradas.
- Se deberán realizar estudios de Farmacovigilancia y Postmarketing para evaluar la eficacia y seguridad del anticuerpo.

- Se deberán realizar estudios en población infantil con la patología si se desea aprobar en infantes.
- Se deberá evaluar el efecto del sistema cierre-contenedor sobre el producto final y establecer su seguridad.

Ambas Autoridades concluyeron como recomendación para aprobaciones en diferentes países que dicho proceso debería basarse en un análisis del balance riesgo –beneficio para cada paciente aunado a estudios que evalúen la eficacia de este en la población a tratar.

Lo que se intenta resaltar con lo anterior, es que gracias a que la FDA y la EMA tienen sus propias leyes, reglas, directrices y reglamentos para la aprobación de productos biotecnológicos, toman a las ICH como guías de recomendación, que cuenta solamente con la información mínima obligatoria y necesaria para solicitar la aprobación de un producto farmacéutico. Por lo que es necesaria información adicional a la expresada en las ICH, y que según la indicación terapéutica aprobada es indispensable contar una vasta información clínica que nos ayude a proteger a los pacientes de posibles reacciones adversas.

La aprobación de Pembrolizumab en México se realizó en el año 2016 (dos años después de la aprobación en Estados Unidos) siendo el titular del Registro Sanitario Schering Plough. Desafortunadamente, no se pudo encontrar información de acceso público acerca de la información sometida para la aprobación en el país de KEYTRUDA®. La información pública que la COFEPRIS muestra acerca de la aprobación de este medicamento biotecnológico se limita a resoluciones de solicitud de información privada por transparencia ante el INEGI solicitada por el titular de registro o instancias gubernamentales.

Cabe señalar que en el calendario de cita ante el SEP, el titular de registro sanitario fue agendado en dos ocasiones durante el mismo año, en un periodo

menor a un año. Por lo anterior, podríamos inferir que, durante la primera sesión con el Comité, hubo observaciones críticas que requirieron de una segunda cita para ser esclarecidas y permitir la aprobación del medicamento biotecnológico. Tras la aprobación de KEYTRUDA®, su principal objetivo de mercado en el ámbito hospitalario mexicano es la primera línea de tratamiento para combatir el melanoma además de indicaciones secundarias.

Con la poca información encontrada acerca de la información sometida en el Dossier para la aprobación en México; se cree que fue la misma presentada ante las dos agencias antes mencionadas. Podemos suponer que el titular del Registro Sanitario se basó principalmente en el Balance Riesgo-Beneficio obtenido de los diversos estudios clínicos que se tenían realizados en ese momento, lo que se resume en el cuadro siguiente:

Tabla 4. Análisis riesgo-beneficio de Pembrolizumab en pacientes con melanoma refractario.

Patología	Pacientes con melanoma metastásico o irresecable que ha progresado aún con el tratamiento con Ipilimumab y, si el paciente es BRAF V600 positivo a la mutación, un inhibidor de BRAF con una condición seria y en peligro de muerte.
Necesidad médica no satisfecha	Para el momento de la solicitud, en el mercado se encontraban aprobados terapias que intentaron satisfacer las necesidades del paciente como la dacarbazina y aldeslukin (IL-2). Mientras que la dacarbazina mostraba ORR de 15 % o menos con una DOR corta; aldesleukin tiene el reporte desde toxicidad seria hasta fatal y, por ello, solo se puede administrar en pacientes selectos.
Beneficio clínico	El medicamento muestra un ORR de 24 %, con una respuesta duradera de inclusive 6 meses de seguimiento. El 86 % de los pacientes se encontraban con respuestas favorables al tratamiento.
Riesgo	Los riesgos primarios son reacciones adversas relacionadas con el sistema inmune, con una prevalencia del 23 % en los pacientes tratados

	<p>en todos los estudios clínicos. La gran mayoría fue tratada con esteroides y modificación en la frecuencia de administración (menor frecuencia). El 10 % de los pacientes tratados discontinuaron el tratamiento con pembrolizumab, y un 18 % retrasó el tratamiento por la presencia de reacciones adversas.</p>
Incertidumbres	<p>Aunque para el análisis de este medicamento, la ORR es considerado como el punto final estudiado en un ensayo clínico debido a que su valor es razonablemente un predictor de beneficio clínico para el tratamiento de melanoma metastásico, no existe una correlación fidedigna con el beneficio clínico, incluyendo la mejora de la OS. Por ello, la aprobación tradicional de pembrolizumab deberá confirmar su beneficio clínico.</p>
Conclusiones	<p>Pembrolizumab tiene un balance riesgo-beneficio favorable para el tratamiento de pacientes con melanoma metastásico o irresecable que ha progresado aún con el tratamiento con Ipilimumab y, si el paciente es BRAF V600 positivo a la mutación, un inhibidor de BRAF. Pembrolizumab resultó con una ORR del 24 % y DORs prolongadas en pacientes en condiciones severas y en peligro de muerte con una necesidad médica no satisfecha.</p> <p>Se concluye que el perfil de seguridad es aceptable dada la naturaleza de peligro de los pacientes a tratar.</p>

Con base en lo anterior, cualquier profesional de salud con especialidad en oncología podría determinar que “vale la pena correr el riesgo” con este medicamento para tratar las patologías para las que está aprobado; debido al estado de avance de esta y los síntomas que provoca en los pacientes. Algo que no debe pasar desapercibido es que este cuadro no resume en su totalidad ni de manera cruda, las razones por las cuales ese porcentaje mencionado en la Tabla 4 de la población analizada en los estudios clínicos desistió en el tratamiento o lo que pasó con aquel porcentaje de pacientes en el que no hubo efecto terapéutico.

Las agencias internacionales antes mencionadas, optaron por solicitar información adicional acerca del producto y condicionar la comercialización del producto como una segunda línea para el tratamiento de melanoma estadio III y como primera línea para el melanoma metastásico; así como la realización de estudios Postmarketing y de Farmacovigilancia para determinar la verdadera eficacia terapéutica del medicamento y también el perfil de seguridad del mismo (cabe resaltar que este medicamento suele prescribirse para pacientes > 40 años que es la población con mayor incidencia en casos de melanoma según el Centro de Control de Enfermedades en Estados Unidos).

Si la COFEPRIS hubiera revisado puntualmente los puntos críticos que la FDA y EMA encontraron en la información sometida y si solamente se presentó el mismo cuadro Balance Riesgo-Beneficio, en la emisión del Oficio de Registro Sanitario con Número 277M2016 SSA se hubiera determinado que era necesario realizar más estudios en población mexicana, con el objetivo de evaluar el verdadero balance riesgo-beneficio para nuestra población, así como cualquier otro tema pertinente a la seguridad, calidad o eficacia del medicamento innovador. A pesar de que la incidencia de esta enfermedad para 2018 fue de 3 079 casos nuevos en México, generó la muerte de 734 personas teniendo una mayor prevalencia en mujeres (55 %) [Instituto Mexicano del Seguro Social, 2019]. A pesar de que no es una enfermedad tan común como la diabetes o el cáncer de mama, ovario, estómago, colón o próstata; el número de pacientes y casos nuevos cada año va en aumento y se convierte en un problema de salud pública.

La COFEPRIS, únicamente estableció en las notas al calce del Registro mencionado anteriormente lo siguiente:

“Se le informa que deberá dar cumplimiento con lo establecido en el numeral 6 “Control de la fabricación de medicamentos biotecnológicos” de la NOM-257-SSA1-2014”, “En materia de medicamentos biotecnológicos”.”

“Se le informa que deberá dar cumplimiento a lo establecido en el Artículo 81 Bis del Reglamento de Insumos para la Salud y la NOM-220-SSA1-2012 “Instalación y operación de la Farmacovigilancia”.”

“El titular del presente Registro Sanitario deberá mantener vigente el Certificado de Buenas Prácticas de Fabricación durante la vigencia del Registro Sanitario que se otorga en este acto”

Esto podría deberse a que la COFEPRIS no puede emitir ninguna solicitud hacia algún medicamento biotecnológico en específico porque carecer de respaldo legal (numeral, artículo o reglamento) con el cual sustentar su requisito. Por otro lado, existe la posibilidad de que se desconocieran los descubrimientos realizados por las otras Agencias Internacionales, dando paso a la autorización sanitaria del medicamento sin requerimientos adicionales.

Este último punto es muy poco viable debido a que, en el calendario de citas ante el SEPBB, este solicitó la presencia del titular del Registro Sanitario en México nuevamente en dos ocasiones: el pasado 14 de julio de 2017 y 30 de noviembre del mismo; se cree (debido a que la gran mayoría de la información se encuentra privada/confidencial) que fue para solicitar información adicional acerca de este medicamento y complementar la presentada.

La principal preocupación radica, en gran medida, en que este medicamento fue aprobado en cuatro meses como primera opción en el tratamiento del melanoma cuando no se tenía suficiente información de este, de hecho, es de resaltar que en

otros países se restringía su uso para pacientes con melanoma en estado avanzado.

Asimismo, la extensión para el tratamiento de melanoma no avanzado no se encuentra aún aprobado debido a que el fabricante, actualmente, se encuentra realizando estudios de Farmacovigilancia y Postmarketing para poder solicitar la modificación de la indicación terapéutica. Lo anterior se respalda con el hecho de que al ingresar a la página web del fabricante del biomedicamento (Merck Sharp & Dohme Corp. <https://www.keytruda.com/>), este se encuentra financiando el tratamiento para los pacientes que quieran tratarse el melanoma en cualquiera de las etapas en las que se encuentre o cualquiera de las otras indicaciones por las que está aprobado.

Cabe señalar que, en el presente no se está aseverando que el medicamento sea ineficaz, inseguro o ausente de un buen control de calidad. El presente plantea evidenciar la falta de robustez en la legislación aplicable a medicamentos biotecnológicos para determinar la necesidad de solicitar o no información adicional al fabricante del medicamento cuando es evidente que, aunque “valga la pena el riesgo” por el beneficio terapéutico, es necesario condicionar la autorización sanitaria cuando existen inconsistencias o puntos rojos en la información sometida.

DISCUSIÓN

Con tan solo 44 años de antigüedad, los anticuerpos monoclonales se han posicionado como la esperanza terapéutica más investigada, vendida y comercializada en los últimos años. Estas moléculas iniciaron con la idea de ser terapias altamente específicas para patologías autoinmunes principalmente y su primera indicación terapéutica en 1986, fue para tratar el rechazo agudo al órgano recién trasplantado; sin embargo, debido a su proceso de fabricación, estas nuevas moléculas eran altamente inmunogénicas por ser de origen murino y el balance riesgo-beneficio se desviaba más al riesgo que a las bondades terapéuticas.

Con base en lo anterior, debido al perfil de seguridad de estas nuevas moléculas su avance terapéutico se vio frenado al uso diagnóstico aprovechando su alta especificidad por el blanco para funcionar como marcadores biológicos. Con el paso del tiempo, gracias a la inversión en el campo de la biotecnología, nuevos métodos para la generación de anticuerpos han permitido la producción de anticuerpos cada vez más humanos (quiméricos, humanizados y humanos), disminuyendo el perfil de reacciones adversas y mejorando el perfil de seguridad de los nuevos anticuerpos.

Una vez que se creyó se había cubierto el problema de la seguridad, la industria farmacéutica y el área científica se percataron de que las reacciones inmunogénicas (que eran las reacciones adversas más comunes y graves que presentaba con el uso de anticuerpos monoclonales, exceptuando aquellas relacionadas con la vía de administración) seguían presentes inclusive con anticuerpos humanos, esto se debe a que aún son moléculas exógenas en las que al cambiar el perfil de glicosilación o el acomodo tridimensional, la presencia de reacciones adversas de tipo inmunogénico pueden presentarse inclusive siendo anticuerpos de secuencias cien por ciento humanas. Por lo anterior, la

investigación se centró en generar moléculas que cubrieran patologías agresivas, avanzadas, huérfanas o mejorar la opción terapéutica disponible en el momento contra reacciones de rechazo a implantes recién trasplantados, patologías autoinmunes con alta incidencia y prevalencia como la artritis reumatoide hasta aquellas que no son tan comunes pero su agresividad requiere de terapia biológica como la artritis psoriásica e inclusive aquellas que su incidencia hace que los anticuerpos generados para su tratamiento sean considerados como terapias huérfanas.

La necesidad de hacer moléculas más específicas, más seguras y terapias más eficaces y duraderas, llevaron a modificar a los anticuerpos y aprovechar sus propiedades individuales de los dominios Fc y Fab; desde la generación de ScFv (en cultivos bacterianos) pasando por la adición de proteínas de fusión hasta la adición de agentes quimioterapéuticos o citocinas a la estructura original para mejorar la farmacología del anticuerpo hasta su encapsulamiento en sistemas de liberación modificada con el objetivo de manipular y generar una terapia más adecuada a la necesidades del paciente.

Una de las soluciones a los problemas de selectividad y de seguridad que más se estudia por su alcance terapéutico, son el uso de proteínas de fusión. Estas tienen la intención de aumentar la selectividad del anticuerpo aprovechando la capacidad de ambos dominios para activar al sistema inmune y anclar/bloquear receptores, ya sea conservando al anticuerpo completo u ocupando cualesquiera de sus dominios para anclar otras proteínas. El impacto de esta nueva terapia se refleja con que, en el 2018, 35 medicamentos elaborados a base de proteínas de fusión se aprobaron alrededor del mundo.

Por la naturaleza y el campo terapéutico al que los anticuerpos se dirigen, aunado a que el proceso de fabricación de estas moléculas requiere el uso de organismos vivos y múltiples procesos que incluyen la selección, escalamiento, purificación,

acondicionamiento y almacenamiento; es necesario que exista un estrecho control desde la adquisición de materias primas para la generación del banco celular maestro hasta el acondicionamiento y almacenamiento del producto final para su distribución a los pacientes. Algunos métodos destacados son: la generación de fracciones solubles de anticuerpos en líneas celulares bacterianas (*E. coli*) que carecen de glicosilaciones, la generación de anticuerpos por presentación de fagos que constituye una de las técnicas más específicas, y las técnicas de genética molecular que consiste en el reemplazo de loci murino por loci humano para generar hibridomas capaces de producir anticuerpos con secuencias altamente homologas a las presentes en los humanos.

Alrededor de 350 medicamentos biotecnológicos con anticuerpos monoclonales y sus derivados, se han aprobado alrededor del mundo y, como todo insumo para la salud, para determinar si el medicamento que solicita un registro sanitario es seguro, de calidad y eficaz es necesario presentar información científica, técnica y legal ante Autoridades competentes que tengan la capacidad y el respaldo legal requerido para discernir entre la aprobación del medicamento o la negación de solicitud de aprobación. Cada país tiene como responsabilidad generar los recursos legislativos necesarios para asegurar que las nuevas opciones terapéuticas cuentan con las condiciones de seguridad, calidad y eficacia necesarias para que su comercialización no genere un riesgo sanitario en la población a tratar.

Desafortunadamente, cuando el auge de los biotecnológicos impacto a México, este no contaba con los recursos legislativos necesarios para soportar la necesidad regulatoria del momento. Para el 11 de junio de 2009 (25 años después de aprobado el primer medicamento biotecnológico) se estableció en la Ley General de Salud la existencia de los medicamentos biotecnológicos, pero fue hasta el 11 de diciembre 2014 que se generó una legislación especial para esta opción terapéutica dejando más preguntas que respuestas.

Fue hasta la actualización a la NOM-059 en 2015 que se establecieron los requisitos de producción y del sistema de gestión de calidad para estos medicamentos siendo la primera norma en biotecnológicos en toda Latinoamérica. Para 2016 se habían aprobado 67 medicamentos biotecnológicos innovadores y 2 medicamentos biocomparables [La Jornada, 2016], con la justificación de que estas nuevas terapias tenían la intención de solventar el problema del abandono de las terapias por parte del paciente, ya que la mitad de ellos dejaba la terapia después de dos años, por diferentes razones. El gran número de aprobaciones para ese año se advirtió con que la aparición de un biotecnológico en el mercado resultaba prometedora porque ayudaría a los pacientes a alcanzar las metas de control y mejoraría la adherencia a la terapia, pues la gran mayoría de estos requiere de la administración por inyección en un periodo promedio de 15 días.

Sin embargo, para 2017, la COFEPRIS notó un severo problema con el número de aprobaciones y la información sometida para su aprobación, debido a que esta tenía muchos huecos informativos que dejaba entrever un problema en la seguridad y/o eficacia del medicamento aprobado. Debido a esto, se solicitó la revisión de los expedientes sometidos a aprobación en los años concernientes de 2015-2016 y se emitieron citas técnicas para la reevaluación de la información sometida. Aquellos productos que presentaron problemas y no fueron resueltos en tiempo y forma, se les revocó la autorización sanitaria mientras que a otros se les modificó las condiciones de aprobación. Aunque la industria de los medicamentos biotecnológicos tiene un valor global de 369, 000 millones de dólares para el 2018 según el reporte de *Biotechnology Market Analysis By Application, By Technology, And Segment Forecasts, 2018- 2025*, publicado por *Grand View Research*; México se encuentra estancado en innovación y legislación biotecnológica, la gran mayoría de los productos aprobados en México fueron autorizados al someter la misma información que fue ingresada en otras Agencias Internacionales con ciertas modificaciones de requisitos administrativos que el país solicita, pero sin

modificaciones especiales necesarias debido a que la población mexicana tiene perfiles farmacológicos y farmacocinéticos diferentes a los europeos o americanos.

Al seleccionar como ejemplo la aprobación de KEYTRUDA®, se observó que México aprobó al medicamento en un periodo de tan solo cuatro meses (en el año 2016) sin solicitar, como hicieron otras autoridades, información complementaria para asegurar su eficacia, seguridad y calidad. Posteriormente, se hizo un llamado al titular del registro sanitario, un año después de su aprobación, para que se sometiera información adicional acerca de la seguridad y eficacia del medicamento, dejando en evidencia que la aprobación se había realizado de forma ineficiente y que las autoridades no se encuentran preparadas para la revisión de este tipo de documentación por falta de guías propias enfocadas en los requerimientos que esta clase terapéutica debe cumplir. Con base en lo anterior, es indispensable que una reforma en la legislación mexicana aplicable a medicamentos biotecnológicos se realice, sobre todo debido a que un tercio de las solicitudes de registros sanitarios de nuevos medicamentos en el país (México) son biotecnológicos [La Jornada, 2018]. Aunado a que para 2018, 7 mil moléculas se encontraban en investigación a nivel mundial en donde el 80% de ellas son biotecnológicas acorde con los informes de la Asociación Mexicana de Industrias de Investigación Farmacéutica (AMIIF).

Esta modernización en la legislación aplicable es esencial y urgente debido a que México entró en el Acuerdo Comercial con Estados Unidos y Canadá (T-MEC) para garantizar la protección de los datos clínicos y los participantes deberán no solo asegurar la protección sin también garantizar la calidad, seguridad y eficacia de los 71 medicamentos biotecnológicos innovadores aprobados para el 2018 y los medicamentos nuevos que se desarrollen durante la ejecución del Acuerdo.

CONCLUSIONES

El uso de anticuerpos monoclonales y sus derivados ha mejorado el tratamiento de patologías en las que el Sistema Inmune se ve involucrado o procesos oncológicos, esto se debe en gran parte a la especificidad que estas moléculas presentan ante su blanco farmacológico. Gracias a esto, este tipo de moléculas se posicionan como una de las opciones terapéuticas más prominentes, remunerables y eficaces disponibles en el mercado.

La producción de anticuerpos ha evolucionado con base a las demandas del mercado, siendo los sistemas de expresión en mamíferos los que predominan en el mercado debido a que son accesibles, de fácil reproducción y altamente escalables.

Los anticuerpos, a pesar de sus ventajas como terapias innovadoras, no se encuentran exentos de reacciones adversas, entre las cuales destacan la generación de anticuerpos anti-anticuerpos, problemas por falta de selectividad y aquellas relacionadas con el mecanismo de acción o la vía de administración. Una forma para mejorar el perfil de seguridad y selectividad son las proteínas de fusión. Estas tienen la intención de aumentar la selectividad del anticuerpo al aprovechar la especificidad de los dominios variables y explotando las funciones del dominio constante para favorecer la activación de la muerte celular inducida por anticuerpos.

Como cualquier insumo para la salud, los medicamentos biotecnológicos requieren de autorización sanitaria. Cada país tiene la necesidad y responsabilidad de tener y generar los recursos legislativos a tal grado de satisfacer las necesidades regulatorias internacionales y del mercado actual. Al comparar la legislación mexicana con las Guías de Armonización Internacionales, en el ámbito de la autorización sanitaria para anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión, encontramos que, la extensión de la NOM-059-SSA1-2015 y de la NOM-257-

SSA1-2014, en materia de biotecnológicos, no son lo suficientemente robustas para soportar las necesidades regulatorias para asegurar la calidad, eficacia y seguridad del medicamento que solicita autorización sanitaria. Esto último se ejemplifica con la autorización sanitaria de KEYTRUDA®, la cual tuvo deficiencias durante su aprobación sanitaria a tal grado de volver a solicitar información complementaria al titular del registro sanitario pasado un año de su aprobación.

Con base en lo expuesto, la normatividad disponible no logra satisfacer las necesidades regulatorias que los medicamentos biotecnológicos demandan. Es esencial que una reforma se realice en la normatividad aplicable a medicamentos biotecnológicos para soportar los avances tecnológicos que devienen, así como profundizar en los requisitos para la autorización sanitaria en un análisis caso por caso para evitar basar los requisitos de aprobación en guías que son meramente recomendaciones y poder tener un fundamento legal con el cual autorizar o negar la aprobación sanitaria de esta nueva clase terapéutica de manera reacional.

REFERENCIAS. (Por orden de aparición)

1. BIO. Biotechnology Innovation Organization. (2019). History of Biotechnology. USA: Biotechnology Innovation Organization. Recuperado de <https://www.bio.org/articles/history-biotechnology>
2. AMGEN. (1996-2019). Timeline of Medical Biotechnology. California, USA: AMGEN Inc. Recuperado de <https://www.biotechnology.amgen.com/timeline.html#2010s>
3. Ashish, S.V., Shishir, A., Shruti, R., & Anchal, S. (2011). Biotechnology in the Realm of History. *Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences*. 3(3), 321-323. doi: 10.4103/0975-7406.84430
4. ICH Harmonisation for better health. (2019). International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Recuperado de: <https://www.ich.org/>
5. Economía Hoy. Editorial Ecoprensa, S.A. (2019). México no es potencia en biotecnología, la razón: problemas legales. *El Economista*. Recuperado de: <https://www.economiahoy.mx/nacional-eAm-mx/noticias/8051617/12/16/Mexico-no-es-potencia-en-biotecnologia-la-razon-problemas-legales.html>
6. Chaplin, D. (2010). Overview of the immune Response. *J Allergy Clin Immunol*. 125(2 Suppl 2), S3-23. doi: 10.1016/j.jaci.2009.12.980
7. NIH. National Institutes of Health, Turning Discovery Into Health. (2011). Medical Research Initiatives. National Institutes Health. Recuperado de: <https://www.nih.gov/research-training/medical-research-initiatives>

8. Nature Immunology, Nature Reviews Immunology, Nature Structural & Molecular Biology, Nature Communications. (2016). Nature milestone 7: Searching for the antibody producers. *Revista Nature*. S1-S47.
9. Nature Immunology, Nature Reviews Immunology, Nature Structural & Molecular Biology, Nature Communications. (2016). Nature milestone 8: Making antibodies work. *Revista Nature*. S1-S47.
10. Liu, J. (2014). The history of monoclonal antibody development – Progress, remaining challenges and future innovations. *Annals of Medicine and Surgery*. 3, 113-116. doi: 10.1016/j.amsu.2014.03.001
11. Li, F., Vijayasankaran, N., Shen, A., Kiss, R. & Amanullah, A. (2010). Cell culture processes for monoclonal antibody production. *Landes Bioscience*. 2(5), 466-479. doi: 10.4161/mabs.2.5.12720
12. Chames, P., Regenmortel, M., Weiss, E. & Berty, D. (2009). Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British Journal of Pharmacology*. 157, 220-233. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00190.x
13. Malbris, L., Davies, J., Glasebrook, A., Tang, Y., Glaesner, W. & Nickoloff, B. (2016). Molecular Insights into Fully Human and Humanized Monoclonal Antibodies. What are the Differences and Should Dermatologists Care? *The Journal of Clinical Aesthetic Dermatology*. Elly Lilly and Company. 9(7), 13-15.
14. Hammers, C. & Stanley, J. (2014). Antibody Phage Display: Technique and Applications. *J Invest Dermatol*. 134(2), 1-13. doi: 10.1038/jid.2013.521
15. Carvalho, S., da Silva, O., Carneiro, G., de Oliveira, J., Parachin, N. & Carmo, T. (2017). Production Processes for Monoclonal Antibodies. *INTECH*. 181-198 doi: 10.5772/64263

16. Weiner, G. (2015). Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nature. Macmillan.* 25, 361-370. doi: 10.1038/nrc3930
17. Leavy, O. (2010). Therapeutic antibodies: past, present and future. *Nature Reviews Immunology.* 10, 297. doi: 10.1038.nri2763
18. INN. International Nonproprietary Names. World Health Organization. (2014). Essential Medicines and health products: INN for biological and biotechnological substances. World Health Organization. Recuperado de: https://www.who.int/medicines/services/inn/inn_bio_inn/en/
19. Parren, P., Carter, P. & Pluckthun, A. (2017). Changes to International Nonproprietary Names for antibody therapeutics 2017 and beyond: of mice, men and more. *Antibody Society: Taylor & Francis Group.* 9(6), 898-906. doi: 10.1080/19420862.2017.1341029
20. AS. Antibody Society. (2019). Antibody Therapeutic. Antibody Society. Recuperado de: <https://www.antibodysociety.org/>
21. Lopes dos Santos, M., Quintillo, W., Manieri, T., Rumi, L. & Moro, A. (2018). Advances and challenges in therapeutic monoclonal antibodies drug development. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 54, 1-15. doi: 10.1590/s2175-97902018000001007
22. Bohdiewicz, P. (1998). Indium-111 Satumomab Pendetide: The First FDA-Approved Monoclonal Antibody for Tumor Imaging. *J. Nucl. Med. Technol.* 26(3), 155-163. ISSN: 1535-5675
23. FDA. (2016). Food And Drug Administration, Annex 13cb Recuperado de: <https://www.fda.gov/about-fda/about-website/fdagov-archive>
24. Sgro, C. (1995). Side-effects of a monoclonal antibody, muomonab CD3/orthoclone OKT3: bibliographic review. *Toxicology. Elsevier Science Ireland Ltd.* 105, 23-29. SSDI 0300-483X(95)03123-W

25. NIH. National Cancer Institute. (2019). Instituto Nacional del Cáncer. NIH. Recuperado de: <https://www.cancer.gov/espanol>
26. Beckman, R., Weiner, L. & Davis, H. (2007). Antibody constructs in cancer therapy. *Cancer. Article Review*. 109 (2). 170-179 doi: 10.1002/cncr.22402
27. Borrebaeck, C. & Carlsson, R. (2001). Human Therapeutic Antibodies. *Current Opinion in Pharmacology*. 1 (4), 404-408 doi: 10.1016/S1471-4892(01)00070-4
28. Gómez-Mantilla, J., Trocóniz, I., Parra-Guillén, Z. & Garrido, M. (2014). Review on modeling anti-antibody responses to monoclonal antibodies. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 41, 523-536. doi: 10.1007/s10928-014-9367-z
29. Zeglinski, M., Ludke, A., Jassal, D. & Singal, P. (2011). Trastuzumab-induced cardiac dysfunction. A 'dual hit'. *Experimental & Clinical Cardiology*. 16 (3), 70-74 PMID: 22065936
30. Mohan, N., Jiang, J., Dokmanovic, M. & Jin Wu, W. (2018). Trastuzumab-mediated cardiotoxicity: current understanding, challenges, and frontiers. *Antib Ther*. 1(1), 13-17. doi:10.1093/abt/tby003
31. Lee, S., Chinen, J. & Kavanaugh, A. (2010). Immunomodulator therapy: Monoclonal antibodies, fusion proteins, cytokines, and immunoglobulins. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 125 (2), S314-S323 doi: 10.1016/j.jaci.2009.08.018
32. Rath, T., Baker, K., Dumont, J., Peters, R., Jiang, H., Qiao, W., Lencer, W., Pierce, G. & Blumberg, R. (2015). Fc-fusion proteins and FcRn: structural insights for longer-lasting and more effective therapeutics. *Crit Rev Biotechnol*. 32(2), 235-254. doi: 10.3109/07388551.2013.834293

33. [Lyer, U. & Kadambi, V. (2011). Antibody drug-conjugates – Trojan horses in the war of cancer. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 64 (3), 207-212 doi: 10.1016/j.vascn.2011.07.005
34. Haggerty, J., Burge, F., Lévesgue, J., Gass, D., Pineault, R., Beaulieu, M. & Santor, D. (2007). Operational Definitions of Attributes of Primary Health Care: Consensus Among Canadian Experts. *Annals of Family Medicine*. 5 (4), 336-344 doi:10.1370/afm.682
35. Vincenti, F., Charpentier, B., Vanrenterghem, Y., Rostaing, L., Bresnahan, B., Darji, P. & Massari, P. (2010). A Phase III Study of Belatacept-based Immunosuppression Regimens versus Cyclosporine in Renal Transplant Recipients (BENEFIT Study). *American Journal of Transplantation*. 10 (3), 535-546 doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.03005.x
36. Papadopoulos, N., Martín, J., Ruan, Q., Rafique, A., Rosconi, M., Shi, E., Pyles, E., Yancopoulos, G., Stahl, N. & Wiegand, S. (2012). Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis*. 15 (2) 171-185 doi: 10.1007/s10456-011-9249-6
37. Valedkarimi, Z. Nasiri, H. Aghebati-Maleki, L. & Majidi, J. (2017). Antibody-cytokine fusion proteins for improving efficacy and safety of cancer therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy. Elsevier Masson SAS*. 95, 731-745. doi: 10.1016/j.biopha.2017.07.160
38. National Institutes of Health. (2019). *ClinicalTrials.gov*. National Library of Medicine. Recuperado de: <https://clinicaltrials.gov/>

39. Boyman, O. & Sprent, J. (2012). The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature Reviews Immunology*. 12, 189-190 doi: 10.1038/nri3156
40. Pasche, N. & Neri, D. (2012). Immunocytokines: a novel class of potent armed antibodies. *Drug Discovery Today*. 17 (11-12), 583-590 doi: 10.1016/j.drudis.2012.01.007
41. Jakobisiak, M., Golab, J. & Lasek, W. (2011). Interleukin 15 as a promising candidate for tumor immunotherapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 22 (2), 99-108 doi: 10.1016/j.cytogfr.2011.04.001
42. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos Diario Oficial de la Federación, Secretaría de Gobernación, México, 05 de febrero de 2016.
43. Norma Oficial Mexicana NOM-257-SSA1-2014, en Materia de medicamentos biotecnológicos. Diario Oficial de la Federación, Secretaría de Gobernación, México, 11 de diciembre de 2014.
44. CAS/DEAPE/8153/2018. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, Ciudad de México, México, 01 de agosto de 2018.
45. ICH Harmonisation for Better Health. (2019). ICH Guidelines. Recuperado de: <https://www.ich.org/page/ich-guidelines>
46. Merck Oncology. Merck Sharp & Dohme Corp., (2019). KEYTRUDA® (Pembrolizumab). Recuperado de: <https://www.keytruda.com/>

47. DEMOS. Desarrollo de Medios, S.A. de C.V. (2016). La Jornada: Autorizados en México, 67 medicamentos biotecnológicos. Recuperado de: <https://www.jornada.com.mx/2016/07/12/sociedad/033n1soc>
48. *Biotechnology Market Analysis By Application, By Technology, And Segment Forecasts, 2018- 2025.*

Figuras

1. Sormani, P., Aprile, F. & Vendruscolo, M. (2018). Third generation antibody discovery methods: *in silico* rational design. *Chem. Soc. Rev.* 47, 9137-9157. doi: 10.1039/C8CS00523K
2. LUMEN Learning Microbiology. Laboratory Analysis of the Immune Response. (2019). Polyclonal and Monoclonal Antibody production. Recuperado de: <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/polyclonal-and-monoclonal-antibody-production/>
3. Almargo, J., Pedraza, M., Arrieta, H. & Pérez, S. (2019). Phage Display Libraries for Antibody Therapeutic Discovery and Development. *Antibodies.* 8 (3), 44 doi: 10.3390./antib8030044
4. Malbris, L., Davies, J., Glasebrook, A., Tang, Y., Glaesner, W. & Nickoloff, B. (2016). Molecular Insights into Fully Human and Humanized Monoclonal Antibodies. What are the Differences and Should Dermatologists Care? *The Journal of Clinical Aesthetic Dermatology. Elly Lilly and Company.* 9(7), 13-15.
5. Gul, N. & Egmond, M. (2015). Antibody-Dependent Phagocytosis of Tumor Cells by Macrophages: A potent Effector Mechanism of Monoclonal

Antibody Therapy of Cancer. *Cancer Research*. 75(23) doi: 10.1158/0008-572.CAN-15-1330

6. Varrichi, G., Ameri, P., Cadeddu, C., Ghigo, A., et al. (2018). Antineoplastic Drug-Induced Cardiotoxicity: A Redox Perspective. *Frontiers in Physiology*. doi: 9.10.3389/fphys.2018. 00167
7. Valedkarimi, Z. Nasiri, H. Aghebati-Maleki, L. & Majidi, J. (2017). Antibody-cytokine fusion proteins for improving efficacy and safety of cancer therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy. Elsevier Masson SAS*. 95, 731-745. doi: 10.1016/j.biopha.2017.07.160
8. Absolute Antibody. (2019).Antibody Engineering Services. Recuperado de: <https://absoluteantibody.com/custom-services/antibody-engineering/>
9. Merck Oncology. Merck Sharp &Dohme Corp., (2019). KEYTRUDA® (Pembrolizumab). Recuperado de: <https://www.keytruda.com>

ANEXOS

Anexo 1

Tabla A1. Anticuerpos monoclonales aprobados para diciembre de 2017.

Extraída de la ACTIP (*Animal Cell Technology Industrial Plataform*). Disponible en electrónico en: <http://www.actip.org/products/monoclonal-antibodies-approved-by-the-ema-and-fda-for-therapeutic-use/>

Denominación Distintiva	Denominación Genérica (DCI)	Compañía	Blanco Farmacológico	Tipo de mAb	Aprobación EMA	Aprobación FDA	Línea Celular	Indicación Terapéutica
Amjevita®	Adalimumab	Amgen Europe	TNF α	IgG1 Humano	2017	2016	CHO	Artritis; Artritis Reumatoide Juvenil; Artritis psoriásica; Colitis Ulcerativa; Enfermedad de Crohn; Psoriasis; Espondilitis Anquilosante
Zinplava™	Bezlotoxumab	Merck Sharp & Dohme Limited	<i>C. difficile</i> toxina B	Anticuerpo monoclonal humano antitoxina	2017	2016	CHO	Colitis Pseudomembranosa
Bavencio®	Avelumab	Merck Sharp & Dohme Limited	PD-L1	IgG1/k Humano	No Aprobado	2017	CHO	Carcinoma metastásico de células de Merkel
Dupixent®	Dupilumab	Regeneron Pharmaceuticals Inc	IL-4R α	IgG4 Humano	No Aprobado	2017	CHO	Asma; Dermatitis
Imfinzi®	Durvalumab	Astrazeneca UK	PD-L1	IgG1/k Humano	No Aprobado	2017	CHO	Carcinoma metastásico

								urotelial
Ocrevus™	Ocrelizumab	Genentech (Roche)	CD20	IgG1k Humanizado	No Aprobado	2017	CHO	Esclerosis Múltiple
Siliq	Brodalumab	Valeant Pharmaceuticals international	IL-17RA	IgG2/k Humano	No Aprobado	2017	CHO	Psoriasis
Cinqair™	Reslizumab	Teva Pharmaceuticals Limited	IL-5	IgG4/k Humano	2016	2016	NSO	Asma
Lartruvo	Olaratumab	Eli Lilly	PDGFR-α	IgG1 Humano	2016	2016	CHO	Sarcoma
Darzalex®	Daratumumab	Janssen-Cilag	CD38	IgG1/k Humano	2016	2015	CHO	Mieloma Múltiple
Empliciti	Elotuzumab	Bristol-Myers Squibb	SLAMF7	IgG1 Humano	2016	2015	NSO	Mieloma Múltiple
Portrazza	Necitumumab	Eli Lilly	EGFR	IgG1 Humano	2016	2015	NSO	Carcinoma de pulmón de Células no pequeñas
Inflectra	Infliximab	Hospira UK Limited	TNFα	IgG1 quimérico (murino-humano)	2013	2016	Sp2/0-Ag14	Espondilitis Anquilosante; Artritis Reumatoide; Enfermedad de Crohn; Colitis Ulcerativa; psoriasis
Anthim®	Obiltoximab	Elusys Therapeutics INC	Componente PA de la toxina de <i>B. anthracis</i>	IgG1/k quimérico (murino-humano)	No Aprobado	2016	NSO	Infección por antrax

Tecentriq®	Atezolizumab	Genentech (Roche)	PD-L1	IgG1 Humano	No Aprobado	2016	CHO	Carcinoma de pulmón de Células no pequeñas
Cosentyx™	Secukinumab	Novartis Europharm	interleucina-17A	IgG1/k Humano	2015	2015	CHO	Espondilitis Anquilosante; Psoriasis; Artritis psoriásica
Nucala	Mepolizumab	GlaxoSmithKline	IL-5	IgG1/k Humano	2015	2015	CHO	Asma
Opdivo	Nivolumab	Bristol-Myers Squibb Pharma	PD-1	IgG4 Humano	2015	2015	CHO	Carcinoma de pulmón de Células no pequeñas; Melanoma renal de Células de Hodgkin
Praluent	Alirocumab	sanofi-aventis groupe	PCSK9	IgG1 Humano	2015	2015	CHO	Dislipidemias
Praxbind®	Idarucizumab	Boehringer Ingelheim International GmbH	dabigatran etexilate	Fab Humano	2015	2015	CHO	Hemorragia
Repatha®	Evolocumab	Amgen	LDL-C / PCSK9	IgG2 Humano	2015	2015	CHO	Dislipidemias; hipercolesterolemia
Unituxin	Dinutuximab	United Therapeutics Europe	GD2	IgG1/k Humano	2015	2015	Sp2/0	Neuroblastoma
Blinicyto®	Bevacizumab	Amgen Europe	CD19	BiTEs	2015	2014	CHO	Linfoma-Leucemia de Células precursoras de Linfoblastos
Keytruda®	Pembrolizumab	Merck Sharp &	PD-1	IgG4	2015	2014	CHO	Melanoma

		Dohme Limited		Human0				
Cyramza	Ramucirumab	Eli Lilly	VEGF	IgG1 Humano	2014	2014	NS0	Neoplasma estomacal
Entyvio®	Vedolizumab	Takeda Pharma	Integrin- α 4 β 7	IgG1 Humanizado	2014	2014	CHO	Colitis Ulcerativa, Enfermedad de Crohn
Sylvant®	Siltuximab	Janssen-Cilag International	cCLB8	IgG1k Quimérico	2014	2014	CHO	Hiperplasia de nódulos linfáticos gigantes
Lemtrada®	Alemtuzumab	Sanofi	CD52	IgG1 Humanizado	2013	2014	CHO	Esclerosis Múltiple
Kadcyla®	Trastuzumab emtansine	Roche	HER2	IgG1 Humanizado como ADC	2013	2013	CHO	Cáncer de mama
Perjeta®	Pertuzumab	Roche	HER2	IgG1 Humanizado	2013	2012	CHO	Cáncer de mama
Remsima®	Infliximab	Celltrion Healthcare	TNF-alfa	IgG1 Quimérico	2013	No Aprobado	CSC-Ps0006	Espondilitis Anquilosante; Artritis Reumatoide; Colitis Ulcerativa; Enfermedad de Crohn; Psoriasis; Artritis Psoriásica
Gazyvaro®	Obinutuzumab	Roche	CD20	IgG1 Humanizado	No Aprobado	2013	CHO	CLL

Adcetris®	Brentuximab	Seattle Genetics	CD30 (conjugate of Mab and MMAE)	IgG1 Quimérico como ADC	2012	2011	CHO	Linfoma de Hodgkin (HL), Linfoma anaplásico sistémico de células largas (ALCL)
ABthrax®	Raxibacumab	HGS (Human Genome Sciences Inc.)	Antígeno protector <i>Bacillus anthracis</i>	IgG1 Humano	No Aprobado	2012	NS0	Prevención y tratamiento de ántrax inhalado
Benlysta®	Belimumab	HSG, GSK	BLyS	IgG1 Humano	2011	2011	NS0	Lupus Eritematoso Sistémico (SLE)
Vervoy®	Ipilimumab	BMS	CTLA-4	IgG1 Humano	2011	2011	CHO	Melanoma
Xgeva®	Denosumab	Amgen	RANKL	IgG2 Humano	2011	2011	CHO	Prevención de SREs en pacientes con metástasis ósea de tumores sólidos
Prolia®	Denosumab	Amgen	RANKL	IgG2 Humano	2010	2010	CHO	Osteoporosis
Arzerra®	Ofatumumab	Genmab and GSK	CD20	IgG1 Humano	2010	2009	NS0	Leucemia Linfocítica Crónica
Scintimun® (Diagnostic) ¹	Besilesomab	CIS Bio	NCA-95	IgG1 Murino	2010	No Aprobado	Hibridoma	Diagnóstico de Inflamación <i>In vivo</i> /sitios de infección vía scintigraphic imaging®
RoActemra®	Tocilizumab	Chugai (Roche)	IL-6 receptor	IgG1 Humanizado	2009	2010	CHO	Artritis Reumatoide

Ilaris®	Canakinumab	Novartis	IL-1 β	IgG1 Humano	2009	2009	Sp2/0	Síndromes periódicos Cryopyrin- asociados incluyendo el Síndrome autoinflamatorio de resfriando familiar y Síndrome Muckle-Wells; Síndrome periódico asociado al receptor de TNF (TRAPS); Síndrome de Hiperinmunoglulina D (HIDS)/deficiencia de la mevalonato cinasa (MKD) y fiebre mediterránea familiar (FMF)
Simponi®	Golimumab	Centocor Ortho Biotech (Johnson & Johnson)	TNF α	IgG1 Humano	2009	2009	Sp2/0	Espondilitis Anquilosante, Artritis Reumatoide; Artritis psoriásica
Stelara®	Ustekinumab	Centocor Ortho Biotech (Johnson & Johnson)	IL-12 / IL-23	IgG1 Humano	2009	2009	Sp2/0	Psoriasis en placa

Cimzia®	Certolizumab pegol	UCB	TNF α	IgG Humanizado fragmento de Fab	2009	2008	E. coli	Enfermedad de Chron; Artritis Reumatoide
Removab®	Catumaxomab	Fresenius	EpCAM and CD3	Tri-funcional IgG2a / IgG2b	2009	No Aprobado	Hibridoma de híbrido de rata-ratón	Ascítis maligna en pacientes con carcinomas EpCAM-positivo
Soliris®	Eculizumab	Alexion Pharmaceuticala	Complement C5	IgG2/4 Humanizado	2007	2007	NS0	Hemoglobinuria peroxisomal nocturna
Lucentis®	Ranibizumab	Genentech (Roche)	VEGF-A	IgG1 Humanizado fragmento Fab	2007	2006	E. coli	Edema macular seguido de oclusión retinal-venosa; degeneración neovascular macular (húmeda) relacionado con la edad
Vectibix®	Panitumumab	Amgen	EGFR	IgG2 Humano	2007	2006	CHO	Carcinoma Metastásico colorectal
Tysabri®	Natalizumab	Biogen Idec and Elan	VLA-4	IgG4 Humanizado	2006	2004	Mieloma murino	Esclerosis Múltiple (recaída); Enfermedad de Crohn
Proxinium®	Catumaxomab	Viventia (Eleven Biotherapeutics)	EpCAM	Anticuerpo Humanizado	2005	2005	CHO	Cáncer de cabeza y cuello

Avastin®	Bevacizumab	Genentech (Roche)	VEGF	IgG1 Humanizado	2005	2004	CHO	Cáncer metastásico colorectal; cáncer de pulmón de células no pequeñas; cáncer de mama; hlioblastoma multiforme; carcinoma metastásico de células renales
Xolair®	Omalizumab	Genentech (Roche) and Novartis	IgE	IgG1 Humanizado	2005	2003	CHO	Asma
Erbix®	Cetuximab	ImClone (Eli Lilly), Merck Serono and BMS	EGFR	IgG1 Quimérico	2004	2004	Sp2/0	Cáncer de cabeza y cuello; cáncer colorectal
Raptiva®	Efalizumab	Merck Serono, Genentech (Roche)	CD11a	IgG1 Humanizado	2004 (2)	2003 (2)	CHO	Psoriasis
Zevalin®	Ibritumomab tiuxetan	Biogen Idec	CD20	IgG1 Murino	2004	2002	CHO	Linfoma No-Hodgkin
NeutroSpec® ¹	Fanolesomab	Palatin	CD15	Anticuerpo Murino	No Aprobado	2004	Hibridoma	Imagen de apendicitis equivocada

Humira®	Adalimumab	Abbott	TNF α	IgG1 Humano	2003	2002	CHO	Artritis Reumatoide; Artritis Idiopática juvenil; Artritis psoriásica; Espondilitis anquilosante; psoriasis en placa; enfermedad de Crohn
Bexxar®	Tositumomab and iodine 131 tositumomab	Corixa and GSK	CD20	IgG2a Murino	No Aprobado	2003	Hibridoma	Linfoma No-Hodgkin
Campath®	Alemtuzumab	Millennium Pharmaceuticals and Genzyme	CD52	IgG1 Humanizado	2001	2001	CHO	Leucemia Linfocítica Crónica de Células B
Herceptin®	Trastuzumab	Genentec (Roche)	HER-2	IgG1 Humanizado	2000	1998	CHO	Cáncer de mama; Metastasis gástrica o adenocarcinoma de la unión gastroesofágica
Mylotarg®	Gemtuzumab ozogamicin	Wyeth	CD33	IgG4 Humanizado / conjugado a toxina	No Aprobado	2000	NS0	Leucemia aguda mielocítica (AML)

Remicade®	Infliximab	Centocor Ortho Biotech (Johnson & Johnson)	TNF α	IgG1 Quimérico	1999	1998	Sp2/0	Enfermedad de Crohn; Colitis ulcerativa; Artritis Reumatoide; Espondilitis Anquilosante; Artritis psoriásica; psoriasis en placa
Synagis®	Palivizumab	MedImmune, Abbott	Proteína-F de RSV	IgG1 Humanizado	1999	1998	NS0	Virus sincitial respiratorio (RSV)
Daclizumab	Necitumumab	Roche	CD25 (cadena del receptor IL2)	IgG1 Humanizado	1999	1997	Sp2/0	Rechazo a trasplante
Simulect®	Basiliximab	Novartis	CD25 (cadena del receptor IL2)	IgG1 Quimérico	1998	1998	NS0	Rechazo a trasplante
Rituxan® MabThera®	Rituximab	Biogen Idec, Genentech (Roche)	CD20	IgG1 Quimérico	1998	1997	CHO	Linfoma No-Hodgkin; Leucemia linfocítica crónica; Artritis Reumatoide
Humaspect® ¹	Votumumab	Organon Teknica	antígeno asociado citoqueratin-tumor	Anticuerpo radio-marcado ⁹⁹ Tc	1998 (5)	No Aprobado	Línea celular Linfo-blastoide	Detección de carcinoma del colón o recto
LeukoScan® ¹	Sulesomab	Immunomedics	NCA90	Fab fragmento murino	1997	No Aprobado	NS0	Diagnóstico en imagen de osteomielitis
CEA-scan® ¹	Arcitumomab	Immunomedics	Human CEA (antígeno carcinoembrionario)	Fab fragmento murino	1996	1996	Hibridoma	Detección de cáncer colorrectal
MyoScint® ¹	Imciromab	Centocor	Miosina cardiaca humana	Fab fragmento	No Aprobado	1996	Ascitis de murino	Agente de imagen para infarto al

				murino				miocardio
ProstaScint® ¹	Capromab	Cytogen	Antígeno de superficie tumoral PSMA	Anticuerpo murino	No Aprobado	1996	Hibridoma	Detección de adenocarcinoma prostático
Verluma® ¹	Nofetumomab	Boehringer Ingelheim, NeoRx	Antígeno asociado a carcinoma	Fab fragmento murino	No Aprobado	1996	Hibridoma	Diagnóstico en imagen de cáncer pulmonar de células pequeñas
ReoPro®	Abciximab	Centocor Ortho Biotech (Johnson & Johnson), Elli Lilly	GPIIb/IIIa	IgG1 Quimérico Fab	1995 (8)	1994	Sp2/0	Alto de riesgo de angioplastia
OncoScint® ¹	Satumomab	Cytogen	TAG-72	Anticuerpo murino	No Aprobado	1992	Hibridoma	Detección de cáncer colorectal y ovárico
Orthoclone OKT3®	Muromonab-CD3	Centocor Ortho Biotech (Johnson & Johnson)	CD3	IgG2a murino	1986 (8)	1986	Hibridoma	Rechazo agudo a trasplante

Anexo 2

Nuevas definiciones incluidas en la última versión de la NOM-059-SSA1-2015, Buenas Prácticas de fabricación de medicamentos, que impactan en la regulación de los medicamentos biotecnológicos.

“**Agentes adventicios**, a los microorganismos contaminantes de un cultivo celular y/o de los materiales de partida de origen animal (mycoplasmas-espiroplasmas, rickettsias, virus, priones u otras formas moleculares) que se introducen de manera no intencional dentro del proceso de fabricación y que potencialmente pueden contaminar células procarióticas o eucarióticas usadas en la producción.

Banco Celular de Trabajo, al que se prepara de alícuotas de una suspensión homogénea de células obtenidas de cultivar el Banco Celular Maestro bajo condiciones de cultivo definidas.

Banco Celular Maestro, a la alícuota de una colección celular que en su desarrollo ha sido preparada de las células clonadas bajo condiciones definidas, contenida dentro de múltiples envases y almacenada bajo condiciones específicas.

Certificado de análisis (CoAs), al resumen de los resultados obtenidos de las determinaciones efectuadas a muestras de productos, materias primas, materiales o cualquier otro insumo, que incluya las referencias de los métodos de análisis o de prueba utilizados y la determinación del cumplimiento a especificaciones previamente establecidas, avalado por la persona autorizada.

Certificado de Buenas Prácticas de Fabricación (CBPF), al documento emitido por la Autoridad Sanitaria de un país, posterior a una visita de verificación sanitaria realizada a un establecimiento, para confirmar su estado de cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación conforme a las disposiciones jurídicas aplicables.

Contaminación cruzada, a la presencia de entidades físicas, químicas o biológicas indeseables, procedentes de un proceso o producto diferente.

Línea celular, al tipo de población celular con características definidas que se originaron por subcultivos seriados de una población celular primaria.

Lote semilla de trabajo, a un cultivo de un microorganismo derivado de un lote de semilla maestro o de un lote de semilla intermedio. Está destinado a un uso en producción.

Lote semilla maestro (Master Seed Lot), a un cultivo de un microorganismo derivado del lote de semilla pre-maestro, distribuido en contenedores en una sola operación, de manera que garantice la homogeneidad y la estabilidad, y prevenga cualquier contaminación.

Medicamentos en investigación, a la forma farmacéutica de un fármaco, un producto biológico, respecto del cual no se tenga experiencia previa en el país, que no hayan sido registrados por la Secretaría y, por lo tanto, no se hayan distribuido en forma comercial, así como los medicamentos registrados y aprobados para su venta, cuando se investigue su caso con

modalidades, indicaciones, dosis o vías de administración diferentes de las autorizadas, incluyendo su empleo en combinaciones.

Potencia, a la actividad terapéutica del producto farmacéutico tal como es indicada por pruebas apropiadas de laboratorio o por datos clínicos controlados y desarrollados en forma adecuada.

Sistema vector-hospedero, al elemento genético capaz de introducir ácido desoxirribonucleico y causar su replicación y expresión en una célula hospedera.”

Anexo 3

Resúmenes de las Guías ICH aplicables al proceso de manufactura de los medicamentos biotecnológicos para asegurar su calidad, seguridad y calidad.

En este resumen se incluyen las Guías redactadas por el Comité Internacional de Armonización acerca del proceso de manufactura de medicamentos biotecnológicos y se excluyen aquellas relacionadas con Farmacovigilancia, la recomendación del armado del Dossier y de aquellos aplicables para biocomparables o para el control de cambios por cambio de sitio de fabricación.

Guía ICH (Comité Internacional de Armonización)	Puntos clave a considerar para la información a someter.
<p>Q5A. Evaluación de la Seguridad Viral de Productos Biotecnológicos derivados de Líneas Celulares de Origen Animal o Humano.</p>	<p>Esta guía solo cubre productos derivados de bancos celulares caracterizados y para que aquellos virus más convencionales, virus transmisibles de manera no convencional están excluidos de esta guía (scrapie o Encefalopatía Espongiforme Bovina). Para controlar la posibilidad de contaminación viral, se deben considerar tres puntos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Seleccionar y evaluar la ausencia de contaminantes virales, que puedan ser infecciosos o patógenos, en líneas celulares u otras materias primas. 2. Evaluar la capacidad del proceso de producción para la depuración de partículas virales infecciosas o patogénicas. 3. Realizar pruebas al producto en los puntos críticos del proceso para asegurar la ausencia de partículas virales infecciosas o patogénicas. <p>Se debe considerar que todas las pruebas de detección viral están limitadas a la sensibilidad del método y el tamaño de la muestra, por ello, es necesario más de un método de determinación para evaluar la seguridad viral. No solo hay que determinar que el producto final esté libre de agentes adventicios sino también evaluar que los métodos de purificación son capaces de soportar la carga y dar resultados más que aceptables. De igual manera, hay que considerar el grado de caracterización del banco celular y la cualificación de la naturaleza de los contaminantes detectados, los constituyentes del medio, métodos de cultivo, el diseño de las instalaciones, el conteo viral final, la capacidad del proceso para depurar virus, el tipo de producto y la indicación terapéutica.</p> <p>Fuentes potenciales de contaminación:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Banco Celular Maestro. La línea celular puede estar infectada de manera latente o persistente (herpes virus) o por

	<p>retrovirus endógenas que puede ser un foco infeccioso por transferencia vertical entre generaciones y mediante el proceso de derivación, uso de reactivos biológicos (suero) o durante la manipulación.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Durante la Producción. La vía de contaminación esta enunciada más no limitada a el uso de reactivos de origen animal (sueros), el uso de virus con fines de ingeniería genética, el uso de métodos de purificación como columna de afinidad o la contaminación durante su manipulación. <p>Cualificación de la línea celular.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pruebas sugeridas para e BCM, BCT y células al límite de su edad útil para producción <i>in vitro</i>. <ul style="list-style-type: none"> o Banco Celular Maestro. Pruebas para evaluar la contaminación por partículas endógenas y no endógenas (pruebas de inoculación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> o pruebas específicas como la producción de anticuerpos en ratones (MAP). o Banco Celular de Trabajo. Cualquier alícuota a emplear para la producción debe ser evaluada (se puede suplantar por el análisis hecho a la línea celular al límite de vida para producción <i>in vitro</i>). Si las pruebas en el BCM son los suficientemente específicas y las células al límite de vida para producción <i>in vitro</i> son derivadas del BCT, no es necesario que se pruebe el BCT. o Células al límite de vida para producción <i>in vitro</i>. El límite de vida se basa en datos derivados del escalamiento a planta piloto o escala comercial para evaluar las condiciones propuestas del tratamiento. Estas células suelen derivarse del BCM y se debe evaluar la presencia de agentes endógenos que hayan pasado desapercibidos del BCM. La evaluación de estas células sirve para asegurar que la producción no propensa a la contaminación. - Detección viral y Ensayos de Identificación. Se deben realizar con un análisis caso por caso y de las características del producto. <ul style="list-style-type: none"> o Retrovirus. Ensayos de infectividad, Microscopia Electrónica, estudios con la Transcriptasa Inversa, entre otros. o Ensayos <i>In Vitro</i>. Evaluar la presencia de virus que no crecen en medios de cultivo, pero si en mamíferos, se inocula en ratones recién nacidos, adultos y en embriones.
--	---

	<ul style="list-style-type: none"> ○ Pruebas de producción de anticuerpos. Virus específicos bien identificados deben ser probados al inocular muestras de la línea celular para producción en animales libres de virus y evaluar la producción de anticuerpos de suero. ○ Si es sabido que la presencia de contaminación viral es inevitable, se debe establecer un Plan de Acción detallado en el que se estipulen las medidas seguridad a tomar y se evalúe el riesgo presente. La autorización de productos con retrovirus endógenos será responsabilidad de cada autoridad sanitaria. <p>- Prueba de virus en el producto a granel sin procesar (semiterminado). Se deben tomar muestras representativas de este material del biorreactor para evaluar la presencia de agentes adventicios y complementar el perfil de evaluación.</p> <p>Es conveniente evaluar al menos de 3 lotes con esta muestra con células intactas o disrupidas para evaluar el contenido intracelular y la seguridad contra agentes adventicios.</p> <p>El número de muestras, la frecuencia del muestreo y la importancia de este ensayo debe determinarse con base en la naturaleza del producto, el método de cultivo, la fuente de las materias primas, los resultados de la evaluación realizada a la línea celular sin procesar y de la capacidad del proceso.</p> <p>La presencia de agentes adventicios es señal de re-evaluación del proceso de manufactura y se recomienda no emplear el lote para producción dependiendo del grado de contaminación y el Plan de Acción diseñado para situaciones de contaminación viral esperada.</p>
<p>ICH Q5B. Calidad de los productos biotecnológicos: Análisis de la expresión del constructo en células empleadas para la producción de derivados de ADNr (ADN recombinante).</p>	<p>Esta guía tiene como objetivo la caracterización de constructos expresados a través de la producción de proteínas derivadas de tecnología con ADN recombinante. Esta caracterización se recomienda consista en lo siguiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ El constructo debe analizarse empleando técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos en conjunto con técnicas de análisis de pureza de proteicas para asegurar la calidad y consistencia del producto final. ○ Se deberá asegurar que la secuencia correcta de codificación ha sido introducida en el vector de expresión y se mantiene durante el proceso de siembra hasta el final de la producción.

- Se deberán emplear técnicas de análisis proteico para definir la secuencia de aminoácidos y análisis de ácidos nucleicos para observar mutaciones que no son visibles en la proteína.
- Un análisis por ARNm o ADNc es más apropiado para la caracterización del constructo final y está por encima del uso del análisis genómico debido a que todos los vectores presentes en el hospedero son transcripcionalmente activos.

De igual manera, esta guía tiene como objetivo la caracterización del Sistema de Expresión:

- Con respecto a las clonas celulares para generar el Banco Celular Maestro: se deberá describir el origen de la secuencia de nucleótidos incluyendo la caracterización de la fuente de la cual provienen las células de la cual la secuencia fue obtenida. Se deberá explicar cómo se ensambla el vector y se tendrá que caracterizar explicando cada uno de los sitios que los componen (mapear), aunado a lo anterior, se sugiere incluir otras posibles proteínas que puedan sintetizarse con el mismo vector para prever la presencia de sustancias relacionadas o contaminantes. Es útil el describir el método empleado de transferencia horizontal, así como el método y criterios de selección clonal.
- Con respecto a la generación del Sistema del Banco Celular: Es conveniente describir la historia del Banco Celular a detalle incluyendo métodos de cultivo, propagación, almacenamiento, nutrición y reactivos empleados durante su uso. Se sugiere generar marcadores fenotípicos y genotípicos para caracterizar la línea celular.
- Con respecto a la expresión del constructo del Banco Celular Maestro, este deberá ser caracterizado a través de métodos como mapeo a través de enzimas de restricción (número de copias, inserciones, deleciones y números de sitios de integración), mientras que para sistemas extra cromosomales se deberá determinar el número de células con el sistema.

	<ul style="list-style-type: none"> ○ Algo importante a determinar es el límite de vida <i>In vitro</i> para células productoras: este debe basarse en datos derivados de células empleadas para expansión y producción en escala planta piloto o industrial. El límite deberá permitir la producción de constructos consistentes que se confirmará su integridad con análisis estructurales y de integridad de la secuencia codificante y la proteína producida.
<p>ICH Q5C. Pruebas de estabilidad para productos biotecnológicos.</p>	<p>Las pruebas recomendadas en esta guía son únicamente para proteínas, polipéptidos y sus derivados que se encuentren bien caracterizadas en el mercado o en el ámbito de investigación científico, que sean aisladas de tejido, fluidos corporales, cultivos celulares o productos derivados de tecnología con ADNr.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Selección de lotes: <ul style="list-style-type: none"> ○ Biofármaco: se recomienda la presentación de 3 lotes representativos del proceso de manufactura a gran escala y del almacenamiento, es recomendable someter mínimo 6 meses de estabilidad para el momento de someter la información, en caso de que el almacenamiento se prolongue por más de 6 meses previos a su uso. Para biofármacos que se almacenan menos de 6 meses, el periodo a someter deberá basarse en un análisis caso-por-caso. Para el momento en que se somete el dossier, es válido presentar estabilidad de biofármaco en etapas tempranas de producción en escala piloto comprometiéndose con la Autoridad de presentar más datos de estabilidad a largo plazo tras la aprobación. <p>La calidad de los lotes a evaluar deberá ser representativa del material empelado en estudios preclínicos y clínicos, así como de la calidad en la manufactura a escala. El biofármaco que entre al programa de estabilidad puede ser almacenado en contenedores que representen los contenedores finales durante la manufactura (pueden ser contenedores a escala reducida).</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Intermediarios: es recomendable el identificar intermediarios, así como generar controles caseros y límites en el proceso para asegurar la estabilidad dentro de los límites establecidos. Se puede ocupar datos obtenidos del proceso a escala piloto, pero se debe evaluar la adecuabilidad de estos datos para

	<p>representar el proceso de manufactura a nivel industrial.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Medicamento: se recomienda el someter al menos de 3 lotes en el contenedor final del biomedicamento e inclusive de diferentes lotes de biofármaco para evaluar la variabilidad del proceso. Se deberá someter como mínimo un periodo de 6 meses al momento del sometimiento con el compromiso de enviar los estudios a largo plazo para fármacos con periodo de almacenamiento o fecha de caducidad mayor a 6 meses. Para medicamentos con fecha de caducidad menor a 6 meses después de su producción, el periodo de evaluación deberá ser basado en un estudio caso-por-caso. La fecha de caducidad se determinará con base en los estudios de estabilidad que se estén sometiendo y deberán ser a tiempo y temperatura reales con actualizaciones continuas durante el proceso. <p>La calidad del empaque final sometido al programa de estabilidad deberá ser representativa al usado en fases preclínicas y clínicas. Al momento de someter el Dossier se podrán empelar datos de estabilidad de la producción en escala piloto con el compromiso de someter los estudios de estabilidad de los primeros 3 lotes a escala industrial. (Si la fecha de caducidad se determinó con estudios de estabilidad del medicamento a escala piloto y estos datos no se adecuaron a los presentados en escala industrial, se deberá informar a la Autoridad el curso a proceder.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Selección de muestras: cuando el producto está distribuido en lotes con diferente volumen, unidades o masa; la cantidad de muestra a someter deberá basarse en una matriz de cálculo o a través del proceso de bracketing. <p>La idea es asegurarse de que la muestra tomada para evaluar la estabilidad es representativa de todo el lote y a su vez de todo el producto manufacturado.</p> <p>En caso de que el producto manufacturado se contenga en sistemas con contenedores iguales, pero dimensiones diferentes, es posible aplicar el método de bracketing.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Perfil de estabilidad: no existe un solo ensayo indicador de estabilidad o parámetro que describa las características del perfil de estabilidad del medicamento. Por lo tanto, el
--	---

	<p>fabricante deberá proponer un perfil indicador de estabilidad que permita asegurarse que los cambios en la identidad, pureza y potencia del medicamento sea identificable.</p> <p>Se deberán validar métodos empleados y la información generada deberá siempre estar disponible para su revisión. Los métodos empelados deberán ser producto-específicos.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ El dossier deberá contener un protocolo detallado para evaluar la estabilidad del medicamento, tanto del biofármaco como del producto final. Deberá incluir los estudios, parámetros e intervalos necesarios para evaluar la estabilidad considerando los siguientes puntos. ○ Potencia: se basa en la medición de cierta característica atribuidas al medicamento y capaz de ser determinada por métodos analíticos de manera cuantitativa. Es conveniente empelar un material de referencia calibrado ya sea directa o indirectamente a un material de referencia nacional o internacional. Estos estudios deben realizarse en intervalos definidos en el protocolo de estabilidad y los resultados deben expresarse en unidades de actividad biológica calibradas siempre y cuando sean referenciadas a materiales de referencia nacionales o internacionales; en caso de no existir, se deberá reportar en unidades derivadas del material empleado. <p>Si la potencia del medicamento depende de la unión a otra entidad o adyuvante, se deberá evaluar la capacidad de disociación del biofármaco con su complemento a través de estudios en tiempo y temperatura reales. Si los estudios de potencia varían mucho por no ser <i>in vivo</i>, se podrán emplear aproximaciones o realizarse estudios subrogados para establecer aproximaciones de estabilidad.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Pureza y caracterización molecular: la pureza de un biotecnológico debe ser determinada por más de un ensayo y el resultado será método-dependiente por lo que la gran mayoría de estos se enfocaran en evaluar la cantidad de productos de degradación presentes. <p>Estos productos de degradación deben ser</p>
--	--

	<p>cuantificados y reportados siempre que sea posible, se deben establecer límites de aceptación con base en los estudios de estabilidad realizados en las fases preclínicas y clínicas. Es por ello que el uso de métodos fisicoquímicos, bioquímicos e inmunoquímicos son necesarios para caracterizar al biofármaco y al medicamento (tamaño molecular, carga, hidrofobicidad) y poder detectar de manera precisa los cambios producidos por deamidaciones, oxidaciones, sulfonidaciones, agregación o fragmentación durante el almacenamiento (electroforesis como SDS-PAGE, inmunoelectroforesis, western blot, isoelectroenfoque o cromatografía como en fase reversa, filtración en gel, intercambio iónico, de afinidad). Son válidas las alternativas para establecer el grado de pureza.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Otras características por considerar: para el producto terminado se deberán también considerar las siguientes características, la apariencia visual (color, opacidad, textura), partículas suspendidas en solución tras reconstitución, pH o nivel de hidratación para liofilizados. También pruebas de esterilidad al inicio y final del periodo de almacenamiento. Si el medicamento contiene aditivos o excipientes que puedan degradarse durante el almacenamiento, se debe evaluar la presencia de productos de degradación y su influencia en la estabilidad, potencia y seguridad del medicamento. <p>- Condiciones de almacenamiento:</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Temperatura: a tiempo real y a la temperatura ideal para la intención de uso. ○ Humedad: demostrar que el contenedor final protege contra la humedad ya sea alta o baja. Si el contenedor no provee esta protección se recomienda realizar estudios de estabilidad a diferentes grados de humedad. ○ Condiciones de estabilidad acelerada o de estrés: se sugiere fuertemente la realización de estudios de estabilidad bajo condiciones de estrés o estabilidad acelerada. Esta última sirve principalmente para respaldar la fecha de caducidad final del medicamento, establecer mejor un perfil de
--	--

	<p>degradación o ayudar en la validación de métodos. Por su parte, los estudios bajo condiciones de estrés permiten evaluar los posibles resultados tras la exposición a condiciones no especificadas en el material de etiquetado y el comportamiento del medicamento, permite determinar condiciones de almacenamiento, advertencias de uso o precauciones de uso; así como permite mejorar el perfil de estabilidad y el perfil de productos de degradación.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Luz, si aplica. ○ Sistema contenedor y de cierre: si esta interacción no puede excluirse, los estudios de estabilidad deberán incluir muestras en posición horizontal, invertida o cualquier otra posición que determine la influencia de interacción entre la formulación y el contenedor final (de preferencia con todos los contenedores con los que se va a comercializar). <p>Si el envase es multidosis, el solicitante debe demostrar que el contenedor es capaz de mantener la integridad del medicamento tras cada extracción y manipulación sin que pierda su pureza, potencia o calidad.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Estabilidad para liofilizados: evaluar la estabilidad tras reconstitución hasta el máximo periodo permitido por la caducidad del producto. <ul style="list-style-type: none"> - Frecuencia de muestreo: es difícil establecer un intervalo fidedigno para que todos los productos biotecnológicos encajen, por lo tanto, la frecuencia de muestreo deberá basarse en el periodo de almacén para cada medicamento, tomando en cuenta el tiempo que tardan en aparecer productos de degradación. <p>Para productos con caducidad menor igual a 1 año, los estudios de estabilidad deberán realizarse mensualmente en los primeros 3 meses y después cada 3 meses.</p> <p>Para productos con periodo de caducidad mayor a un año, los estudios de estabilidad deberán conducirse cada 3 meses durante el primer año y después semestralmente en el segundo año para finalizar con un muestreo anual.</p>
--	--

	<ul style="list-style-type: none"> - Es importante remarcar que, durante el periodo de caducidad, el medicamento deberá mantenerse integro dentro de los límites de actividad, potencia, seguridad y calidad a pesar de la alta susceptibilidad de estos para sufrir modificaciones químicas. - Todo lo observado en los estudios de estabilidad y que sean de vital importancia vigilar y/o cuidar, deberán especificarse en la etiqueta del producto sin alguna excepción; información adicional acerca del cuidado y precauciones de uso se pueden adicionar al instructivo o IPP del medicamento.
<p>ICH Q5D. Derivación y caracterización de sustratos celulares empleados para la producción de productos biotecnológicos.</p>	<p>Esta guía es aplicable para sustratos celulares obtenidos a través de sistemas celulares.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Fuente, Historia y generación del sustrato celular: <ul style="list-style-type: none"> o Se recomienda someter información que describa la historia del sustrato celular empelado para la producción del medicamento, así como de la línea parental o cualquier otra línea celular del cual haya sido derivado. o Origen, fuente e historia celular: se debe establecer la fuente celular del sustrato generado y las bases bibliográficas científicas que se tengan acerca de su uso previo para poder caracterizar perfectamente a la fuente celular. o Para líneas celulares de origen humano, se deben describir las siguientes características: tejido u órgano de origen, origen étnico o geográfico, edad, sexo y las condiciones fisiológicas generales, esperanza de vida, si se llega a conocer, la historia médica del donador, así como pruebas de laboratorio realizadas. Si la línea celular es de fibroblastos diploides se debe denotar con especial énfasis la edad del donador. o Para líneas celulares animales, la descripción debe incluir, entre otras cosas, especies, cepa, condiciones nutricionales de crecimiento, órgano o tejido de procedencia, origen geográfico, edad, sexo, esperanza de vida, resultados de pruebas contra agentes patógenos, condiciones fisiológicas generales del donador.

	<ul style="list-style-type: none"> ○ Para líneas bacterianas, el fabricante debe describir la especie, la cepa, características fenotípicas y genotípicas características de la línea celular, el tiempo de generación, esperanza de vida, descripción de patogenicidad, producción de toxinas y cualquier otra información que impacte en la seguridad del medicamento. ○ Se debe documentar la historia del cultivo, el método empleado para el aislamiento y propagación <i>in vitro</i> o cualquier otro método empleado para la generación y conservación del sustrato celular. Si existe manipulación genética, se deben describir todos y cada uno de los métodos. ○ Para líneas de celulares continuas de metazoos (organismo multicelulares de origen animal), se debe caracterizar a la perfección la línea y hacer un cálculo aproximado del número de células presentes. ○ Para cada línea celular, se deberá exponer las posibles fuentes y escenarios para propiciar la contaminación del medio. Así como los constituyentes del medio de cultivo, su método de preparación, CoAs y método de uso, acompañado de cualquier referencia bibliográfica que justifique o respalde su uso. <p>- Generación del sustrato celular: un paso crucial es la selección de la línea parental. Para productos recombinantes, usualmente se trata de una línea celular sin transfectar. La línea celular debe estar perfectamente caracterizada (sugerencia), en especial si múltiples sustratos se originarán de esta, esta caracterización permitirá tener un mejor control de la calidad del MCB. (mieloma para hibridomas).</p> <p>Se deben incluir y describir todas las técnicas y procedimientos empleados para generar el sustrato celular y contribuir a la historia celular. Para anticuerpos monoclonales, el sustrato celular es la línea celular de hibridoma generada de la fusión de una línea celular de mieloma con otra línea celular (e.g. células del bazo).</p> <ul style="list-style-type: none"> - Banco Celular: se recomienda asegurar la calidad de cada banco celular, a la perfección. <ul style="list-style-type: none"> ○ Sistema del Banco Celular: La producción de biotecnológicos suele realizarse en un sistema de
--	--

	<p>dos niveles, generando un BCM del cual se derivará un BCT. Los fabricantes deberán describir la estrategia para proveer un continuo suplemento de células a través del banco celular, así como la tasa de uso para la producción, los intervalos esperados entre la generación de una línea celular y otra, además de los criterios para la calificación de los bancos celulares.</p> <ul style="list-style-type: none">○ Las diferencias (si hay) entre el BCM y el BCT, como los componentes del medio de cultivo, las condiciones ambientales y demás características, deberán especificarse para tener un mejor control de la calidad final. Si el método de producción consiste en un solo nivel, deberá justificarse su uso.○ Para algunas células bacterianas, una nueva transformación se aplica para cada nuevo lote de sustrato celular, por ello deben ser evaluadas tanto las alícuotas originales como las generadas tras la transformación. Cada línea generada deberá ser probada y almacenada bajo condiciones específicas.○ Procesos para la generación de bancos celulares: Es importante evitar la contaminación del sustrato celular para evitar la pérdida de viabilidad de esta y prolongar la vida útil de producción. Por ello, los fabricantes deberán describir el tipo de sistema de banco celular empelado, el tamaño, el contenedor (viales, ámpulas, u otro contenedor), así como el sistema de cierre empelado y los crioprotectores empleados, medios de cultivo y condiciones de criopreservación y almacenaje.○ Se deberán especificar las condiciones para evitar la contaminación cruzada y bacteriana, así como los controles en el proceso para asegurar la trazabilidad de los lotes.○ Se deberá proveer información acerca de los procedimientos para asegurar que cada alícuota generada para la producción contenga una cantidad uniforme de la célula en cuestión, los métodos de esterilización de los contenedores, preservación y almacenamiento.
--	--

	<ul style="list-style-type: none"> ○ Para asegurar la producción continua, ininterrumpida del medicamento o biofármaco, el productor de establecer los puntos críticos a cuidar para que esta condición se mantenga considerando inclusive errores humanos, fuera de especificaciones o catástrofes como incendios espontáneos. <ul style="list-style-type: none"> - Principios generales para la caracterización y prueba de bancos celulares: se deberá confirmar la identidad, pureza y adecuación de los sustratos celulares empelados para manufactura. El programa de pruebas para cada línea celular variará dependiendo de la línea celular, la historia celular y los procedimientos disponibles. Se deberán realizar rutinas de evaluación a cada BCM y pruebas de estabilidad al cultivo durante su uso para asegurar la viabilidad e integridad. - Para líneas celulares que expresen constructos extracelulares, se deberán seguir las recomendaciones establecidas en la ICH Q5B. Asimismo, los productores deberán asegurarse se empelar métodos, tecnologías y equipo de última línea. El fabricante podrá caracterizar el BCT en vez del BCM+, pero deberá justificarlo apropiadamente. <ul style="list-style-type: none"> ○ Pruebas de identidad: características fenotípicas y genotípicas principalmente del MCB pues se considera que se mantendrá en el WCB. <ul style="list-style-type: none"> ▪ Metazoos: para células de origen animal o humano atadas a un sustrato, un análisis morfológico es viable en conjunto con otras pruebas. Algunas veces, es más que suficiente un análisis por isoenzimas para confirmar la especie de origen. Otra manera es demostrar la presencia de un marcador específico para esa línea celular, heredada de la parental; una manera de complementar este análisis es mediante el análisis de expresión del sustrato deseado. ▪ Células bacterianas: el análisis en medios selectivos para la línea celular de origen es más que suficiente para confirmar la identidad. Para células de <i>E. coli</i>, la utilización de fagos es la manera más viable de confirmación. Para bancos de plásmidos, la evaluación mediante la producción del
--	---

	<p>constructo es esencial.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Pruebas de pureza. Hay que confirmar que el banco esta libe de agente adventicios y de contaminación celular. <ul style="list-style-type: none"> ▪ Metazoos: evaluar la presencia de biomasa en cada contenedor, se recomienda ser menor al 1% del total, pero no menor al de dos contenedores. Se pueden empelar los métodos descritos por la USP o JP para evaluar límites microbianos. <p>Se debe evaluar la presencia de micoplasmas tanto en agar como en caldo.</p> <p>Las pruebas para evaluar la presencia de virus deben ser diseñados para poder detectar una amplia gama, basándose en la historia del cultivo madre e intentar ser los más específicos posibles. (la pureza del banco puede comprometer la viabilidad, seguridad y calidad del biofármaco) El perfil de pruebas para evaluar la pureza del cultivo celular dependerá de que tan probable es que este se contamine además del grado de exposición que tendrá por las diversas manipulaciones que pueda llegar a tener durante el proceso de producción.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Células bacterianas: se debe diseñar un perfil para evaluar la presencia de contaminación con base en la literatura, fuente, materiales y métodos empleados en la fabricación. ▪ Estabilidad del sustrato celular: evaluar el grado de producción constante y la retención en la capacidad de producción durante el almacenamiento en condiciones definidas. <p>Para la evaluación de la estabilidad durante la producción, se deberá examinar en al menos dos puntos; uno empelando células que han sido poco sub-cultivados y un segundo, empelando células en el límite de su edad <i>in vitro</i>.</p> <p>La evaluación en la consistencia de producción es un punto que debe evaluarse siempre y su evaluación dependerá de diversos factores. Para líneas celulares con constructos producto de ADN recombinante, se debe evaluar la consistencia en la secuencia genética en células al límite o por encima del límite de uso <i>in vitro</i>. Cuando no sea posible evaluar la estabilidad en células por encima del límite de uso durante la producción, estudios aislados pueden ser</p>
--	---

	<p>válidos para evaluar esta capacidad. (se pueden ocupar índices de producción de lactato o amonio, consumo de oxígeno o glucosa). Se deberá determinar la viabilidad celular tras la reconstitución de un liofilizado.</p> <p>En la solicitud se deberá mencionar los programas de monitoreo del banco celular que se proponen para evaluar la estabilidad y la integridad de este.</p> <p>Si la viabilidad celular se mantiene al inicio de la producción, se debe evaluar la misma a lo largo de los intervalos de producción pudiéndose omitir los realizados al WCB y MCB.</p> <ul style="list-style-type: none">○ Pruebas de tumorigenicidad y estudios cariológicos. Se emplean para evaluar la estabilidad de células diploides. Los estudios cariológicos pueden no realizar en células de roedores o no diploides, sin embargo, análisis citogenéticos son métodos adecuados para evaluar la identidad y pureza del sustrato.<ul style="list-style-type: none">▪ Evaluar la cantidad de ADN residual tras procesos de purificación cuando se tenga la certeza de eliminación celular.▪ Para productos que carecen de certeza de eliminación celular completa, estudios de tumorigenicidad y análisis cromosomal son adecuados para evaluar el grado de peligro. Estos estudios se deben realizar en aquellas líneas celulares que se sepa (literatura) tengan potencial tumorigénico.▪ Para líneas celulares MRC-5 y WI-38 no genéticamente modificadas, no es necesario estudios extensivos de este tipo.▪ Para líneas celulares diploides poco o nada caracterizadas, estos estudios son obligados para establecer el potencial tumorigénico y caracterización cariológica.
--	---