

Modelos preclínicos *in vitro* e *in vivo* para la evaluación de la actividad biológica en estudios de biocomparabilidad

Abraham Escobedo-Moratilla¹, Ana Paulina Barba de la Rosa¹ y José Trinidad Pérez-Urizar^{2*}

¹Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. (IPICYT), San Luis Potosí, S.L.P., México; ²Dixpertia S.A. de C.V, San Luis Potosí, S.L.P., México

Resumen

Un medicamento biotecnológico es el que contiene como principio activo una proteína recombinante. Actualmente existen en el mundo más de 300 medicamentos de origen biotecnológico. Una gran cantidad de ellos son medicamentos que contienen un principio activo similar (medicamento biocomparable) a otro previamente registrado (medicamento innovador). Se ha sugerido que, debido a la complejidad que implica contener una proteína en la formulación, el proceso de manufactura es clave para poder cumplir con la seguridad y la eficacia esperadas. De hecho, se ha detectado que en lotes diferentes de un mismo fabricante existe cierta variabilidad de propiedades que da lugar a una serie de cambios a nivel clínico. Por ello, la evaluación de medicamentos biocomparables ha tomado gran relevancia, y el nivel preclínico es una de las fases más importantes debido a su bajo costo (en comparación con la fase clínica) y su alta capacidad de detectar problemas de formulación-manufactura. No obstante, es necesario que el medicamento de prueba demuestre su comparabilidad a nivel fisicoquímico, preclínico y clínico para alcanzar su registro. En este artículo se discutirán los modelos *in vitro* e *in vivo* utilizados para evaluar la actividad biológica de medicamentos propuestos como biocomparables.

PALABRAS CLAVE: Biocomparabilidad. Modelo preclínico. Línea celular. Actividad biológica. Roedor. Farmacodinámica.

Abstract

A drug that contains a recombinant protein as an active principle is called a biotechnological drug or biopharmaceutical. There are currently over 300 biopharmaceuticals worldwide. Many of these contain a similar active principle (biosimilar drug) as other previously registered (innovator drug). It has been suggested that due to the complex implications in a formulation containing a protein, the manufacturing process is a key factor for efficacy and safety requirements. In fact, certain variability has been detected of the protein properties in different lots (or batches) of the same manufacturer, which produce changes at a clinical level. For this reason, the evaluation of biosimilar drugs has acquired great relevance, being the preclinical level of one of the more important stages of the development due to its lower cost (with respect to the clinical level) and its high capacity to detect formulation-manufacture problems. However, the demonstration of comparability at physicochemical, preclinical, and clinical levels is required in order to achieve market registration. In this review the *in vitro* and *in vivo* models used for the assessment of proposed biosimilars will be discussed. (Gac Med Mex. 2015;151:377-86)

Corresponding author: José Trinidad Pérez-Urizar, jpurizar@uaslp.mx

KEY WORDS: Biosimilarity. Preclinical model. Cell line. Biological activity. Rodent. Pharmacodynamic.

Correspondencia:

*José Trinidad Pérez-Urizar
Facultad Ciencias Químicas, UASLP
Av. Dr. Nava, 6, Zona Universitaria
Col. Fundadores, C.P. 78270, San Luis Potosí, S.L.P., México
Email: jpurizar@uaslp.mx

Fecha de recepción en versión modificada: 13-03-2014
Fecha de aceptación: 29-05-2014

Introducción

Los medicamentos biotecnológicos (también llamados biofármacos) representan actualmente una parte importante del mercado farmacéutico mundial. Se ha calculado que el valor de este mercado fue de 109 billones de dólares en 2012, lo que correspondió a 300 productos a nivel mundial comercialmente disponibles¹. En efecto, durante 2012, siete de los quince medicamentos más vendidos a nivel mundial (Tabla 1) fueron biofármacos².

El aumento de las ventas de los medicamentos biotecnológicos se debe principalmente a su mayor eficacia en el tratamiento de enfermedades cronicodegenerativas como la artritis, el cáncer o la diabetes^{3,4}. Una consecuencia lógica del despuente de este gran mercado es que en los últimos años diversas compañías farmacéuticas han centrado sus esfuerzos en formular productos con principios activos similares a los de los medicamentos innovadores y comercializarlos tras la caducidad de la patente de los medicamentos innovadores.

Dado que los medicamentos biotecnológicos tienen como principio activo una proteína recombinante de gran tamaño y de estructura química compleja, y no una molécula «pequeña» como en los fármacos de síntesis química, algunos grupos de investigación han propuesto que asegurar que un medicamento biotecnológico es igual de eficaz y seguro que otro con el mismo principio activo es una tarea compleja, ya que se ha detectado que el proceso de síntesis-manufactura afecta de manera sustancial al producto final^{5,6}.

Difiriendo del esquema de los medicamentos bioequivalentes, diversas entidades regulatorias han comenzado la expedición de guías para evaluar la comparabilidad de medicamentos biotecnológicos, denominados *follow on biologics* en la Unión Europea⁷ y biocomparables en México⁸ y EE.UU.⁹. De hecho, la Conferencia Internacional para la Armonización (ICH) ha actualizado sus guías sobre la fabricación y evaluación de medicamentos biotecnológicos para incluir a los biocomparables¹⁰, y la Organización Mundial de la Salud (OMS) realizó consultas con diversos fabricantes de medicamentos y asociaciones en 2006¹¹ que culminaron con la expedición de una guía en 2009¹². Otros países como India, China, Canadá y algunos de Latinoamérica también han emitido sus lineamientos de evaluación de este tipo de medicamentos¹³. Después de realizarse la reforma de octubre de 2011⁸,

México se posicionó como líder en regulación de medicamentos biotecnológicos¹⁴, y la primera norma oficial para regular el otorgamiento de registros fue expedida en 2012¹⁵. Sin embargo, dicha norma fue cancelada en 2013, ya que la norma que regula la bioequivalencia (NOM-177-SSA1-2013) engloba ahora a los medicamentos biotecnológicos y candidatos a biocomparables¹⁶.

De manera general, podemos decir que un medicamento biocomparable es un medicamento cuya seguridad y eficacia son comparables a las del innovador con el mismo principio activo. Esto implica que dichos medicamentos deben ser evaluados previamente a su aprobación para comercializarse. En efecto, las guías emitidas por las entidades regulatorias anteriormente citadas así lo contemplan, de manera que estos productos deben evidenciar su comparabilidad en tres niveles: fisicoquímico-estructural, preclínico y clínico. No obstante, dado que uno de los objetivos principales del desarrollo de biocomparables es reducir el costo del producto final, las primeras etapas (evaluación fisicoquímica-estructural y preclínica) son las más importantes porque permiten ahorrar recursos destinados a los ensayos clínicos, aunque no los sustituyen^{17,18}. De hecho, los ensayos clínicos que deben realizarse para evidenciar la comparabilidad de los medicamentos candidatos a biocomparables incluyen: estudios de farmacocinética, farmacodinámica, inmunogenicidad, seguridad, eficacia y farmacovigilancia (de acuerdo con la molécula en cuestión y la indicación terapéutica para la cual se requiera el registro)^{2,7,9,12,13,16}.

La evaluación fisicoquímica-estructural se centra en discernir las diferencias de las propiedades fisicoquímicas (como el punto isoléctrico [pI], la presencia de enlaces disulfuro o el peso molecular) y estructurales (como la secuencia peptídica, la estructura secundaria y/o terciaria y modificaciones postraduccionales) de la proteína contenida en un medicamento biocomparable con respecto al innovador^{18,19}.

Por otro lado, la evaluación preclínica de las formulaciones biocomparables permite medir la actividad biológica (efecto) de las mismas y compararla con la actividad biológica del medicamento innovador. Esto puede llevarse a cabo *in vitro* (en líneas celulares) o *in vivo* (en modelos animales). En este punto se abren dos consideraciones importantes: durante los ensayos *in vitro* se observará sólo el efecto de la proteína contenida en las formulaciones, mientras que en los ensayos *in vivo* se observará el efecto de la formulación como tal, ya que el vehículo farmacéutico

Tabla 1. Los 15 medicamentos más vendidos en 2012 a nivel mundial

Lugar en las ventas	Ventas estimadas en 2012 (billones de dólares)	Medicamento	Laboratorio	Principio activo	Indicación
1	9.48	Humira*	Abbott Laboratories/Eisai	Adalimumab	Artritis reumatoide, enfermedad de Crohn
2	8.37	Enbrel*	Amgen/Pfizer/Takeda	Etanercept	Artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante
3	8.00	Advair/Seretide	Glaxo SmithKline	Fluticasona/salmeterol	Asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica
4	7.67	Remicade*	Johnson & Johnson/Merck/Mitsubishi Tanabe Pharma	Infliximab	Artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn
5	6.94	Rituxan*	Roche	Rituximab	Leucemia linfocítica crónica, linfoma no Hodgkin
6	6.65	Crestor	AstraZeneca/Shionogi	Rosuvastatina	Hipercolesterolemia
7	6.12	Lantus*	Sanofi	Insulina glargina	Diabetes
8	6.08	Herceptin*	Roche	Trastuzumab	Cáncer de mama
9	5.98	Avastin*	Roche	Bevacizumab	Cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de células renales, cáncer de ovario, glioma maligno
10	5.55	Lipitor	Pfizer/Astellas Pharma/Jeil Pharmaceutical	Atorvastatina	Hipercolesterolemia
11	5.38	Abilify	Bristol-Myers Squibb/Otsuka Holdings	Aripiprazol	Esquizofrenia
12	5.11	Plavix	Sanofi/Bristol-Myers Squibb	Clopidogrel	Infarto de miocardio reciente, evento vascular cerebral reciente, enfermedad arterial periférica establecida, síndrome coronario agudo
13	5.01	Cymbalta	Eli Lilly/Shionogi	Duloxetina	Depresión, ansiedad, dolor crónico
14	4.72	Gleevec	Novartis	Mesilato de imatinib	Leucemia
15	4.49	Spiriva	Boehringer Ingelheim	Bromuro de tiotropio	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

*Medicamento biotecnológico.

contribuye a la liberación-solubilización de la proteína y, por consiguiente, a su acción biológica. El objetivo de esta revisión es abordar los diferentes modelos preclínicos que en nuestro conocimiento se han utilizado para la evaluación de medicamentos propuestos como biocomparables para visualizar sus ventajas o desventajas frente al desarrollo de esta clase de medicamentos. En la tabla 2 se muestra un resumen de los modelos preclínicos discutidos en la presente revisión.

Selección de artículos

Se buscaron y seleccionaron artículos publicados en revistas de indexación internacional incluidas en PubMed y/o Google Scholar cuyos objetivos hubieran sido evaluar uno o más productos nuevos y/o candidatos a biocomparables versus uno de referencia (o innovador). Sólo se incluyeron en la revisión los modelos *in vitro* e *in vivo* que determinaron perfiles de actividad biológica o eficacia (farmacodinámicos). Las guías de

Tabla 2. Modelos preclínicos reportados para la evaluación de la actividad biológica en estudios de biocomparabilidad

Medicamento	Tipo de evaluación	Ensayo	Sujetos	Variable de respuesta	Método analítico utilizado	Referencias
EPO	<i>In vitro</i>	Estimulación de células	Línea celular de leucemia megacariocítica dependiente de EPO*	Luminiscencia de la reacción luciferina-luciferasa	Luminometría	Park, et al. ²⁰
	<i>In vivo</i>	Estimulación de producción de reticulocitos	Ratones normocitémicos	Conteo de reticulocitos totales	Citometría de flujo	Ramos, et al. ³¹
Etanercept	<i>In vitro</i>	Neutralización de citotoxicidad	Línea celular sensible a TNF (L929)	Conversión de MTS a formazán	Espectrofotometría 530-590 nm/490-630 nm	Maity, et al. ²¹ , Tan, et al. ²²
	<i>In vivo</i>	Comparación de nivel histopatológico de articulaciones	Ratones heterocigotos provenientes de ratones transgénicos humanizados con sobreexpresión de TNF (Tg197)	Puntaje obtenido de daño en articulaciones	Microscopía óptica	Maity, et al. ²¹
Filgrastim	<i>In vitro</i>	Unión a receptor Proliferación celular	N/A Línea celular de leucemia mieloide murina (NFS-60)	Centelleo líquido Conversión de MTS a formazán	Contador de centelleo Espectrofotometría 570 y 620 nm	Skrlin, et al. ²³ Skrlin, et al. ²³ , Sörgel, et al. ²⁴
	<i>In vivo</i>	Producción de neutrófilos	Ratones Balb/C con neutropenia inducida con ifosfamina	Cuenta de neutrófilos	Citometría de flujo	Vanz, et al. ³³
Gonadotropina	<i>In vitro</i>	Producción de progesterona	Línea celular de tumor de Leydig (CRL-2065)	Concentración de progesterona	Inmunoensayo	Seo, et al. ²⁵
	<i>In vivo</i>	Ritmo de ovulación	Ratas inmaduras imprimadas con gonadotropina	Cuenta de óvulos	Microscopía óptica	Seo, et al. ²⁵
Interferón β	<i>In vitro</i>	Ritmo de ovulación Ritmo de ovulación	Ratas inmaduras imprimadas con FSH	Cuenta de óvulos	Microscopía óptica	Seo, et al. ²⁵
	<i>In vitro</i>	Reducción de efecto citopático	Ratones con esterilización androgénica Línea celular de glioblastoma humano (2D9)/línea celular de adenocarcinoma humano (A549)	Cuenta de óvulos Conteo de células vivas	Microscopía óptica Espectrofotometría 620 nm	Seo, et al. ²⁵ Meager, et al. ²⁶
Rituximab	<i>In vivo</i>	Estimulación de producción de neopterina	Monos Rhesus (<i>Macaca mulatta</i>)	Perfil temporal de neopterina	Inmunoensayo	Hu, et al. ²⁷
	<i>In vitro</i>	Unión a proteína	Líneas celulares de linfoma: Ramos, daudi, Raji y K562	Conteo de células con fármaco unido	Citometría de flujo	Dorvignit, et al. ²⁸ , Visser, et al. ²⁹ , Da Silva, et al. ³⁰
		Competencia entre prueba y referencia	Línea celular de linfoma Ramos	Desplazamiento de rituximab biotinilado	Citometría de flujo	Dorvignit, et al. ²⁸
		Citotoxicidad	Línea celular de linfoma Ramos	Conteo de células vivas	Citometría de flujo	Dorvignit, et al. ²⁸ , Visser, et al. ²⁹ , Da Silva, et al. ³⁰
	<i>In vivo</i>	Efecto antitumoral	Ratones con xenoinjertos de líneas celulares SU-DHL-4 y Jeko-1	Reducción del tamaño del tumor	N/A	Da Silva, et al. ³⁰
		Efecto en cuentas de linfocitos B	Monos cynomolgus (<i>Macaca fascicularis</i>)	Reducción de las cuentas de linfocitos B	Citometría de flujo	Da Silva, et al. ³⁰

*Línea celular desarrollada en el interior del laboratorio, no disponible comercialmente.

N/A: no aplica.

agencias regulatorias y procedimientos descritos en farmaceúpticas se excluyeron de esta revisión.

Modelos preclínicos *in vitro*

Eritropoyetina (EPO) humana recombinante

Park, et al.²⁰ examinaron las propiedades físicas y químicas de 12 formulaciones de EPO recombinante comercializadas en Asia (Corea, China e India), y las compararon con las de la formulación innovadora de Amgen: Epogen®. Uno de los ensayos utilizados consistió en la determinación de la potencia *in vitro* de las formulaciones. El procedimiento consistió en utilizar una línea celular (desarrollada en el interior de Amgen) de leucemia megacariocítica humana dependiente de EPO; estas células fueron incubadas a 37 °C durante 4 h en presencia de las muestras analizadas y posteriormente fueron tratadas con un detergente para lisado y la adición de luciferina como sustrato y enzima luciferasa (una reacción en la cual se produce luminiscencia por medio de la reacción entre luciferina, ATP y Mg²⁺ catalizada con luciferasa). La luminiscencia resultante de la reacción fue medida con un luminómetro y los valores obtenidos fueron usados para la determinación de la potencia relativa con respecto a la formulación innovadora.

Los resultados obtenidos permitieron dilucidar una alta heterogeneidad de potencias biológicas entre los distintos medicamentos evaluados, los cuales difirieron en su gran mayoría del medicamento innovador de Amgen.

Proteína de fusión receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) 2-Fc (etanercept)

Maity, et al.²¹ reportaron la clonación, el desarrollo de un vector para expresión y la evaluación fisicoquímica *in vitro* e *in vivo* de una formulación no innovadora y de otra innovadora (Enbrel®) de etanercept. En dicho estudio, la evaluación *in vitro* consistió en realizar un ensayo de neutralización de citotoxicidad utilizando una línea celular (L929) sensible al TNF. Se emplearon células L929 que fueron incubadas en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos durante una noche a 37 °C, después se añadió la proteína de las formulaciones en diluciones seriadas y se incubó nuevamente durante 20 h a 37 °C. Posteriormente, se adicionó 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium/phenazine methosulfate (MTS/PMS), un par de compuestos contenidos en un reactivo para medición de viabilidad

celular que reacciona sólo con las reductasas mitocondriales activas y da lugar a un compuesto colorido llamado formazán, y se incubaron nuevamente las células durante 4 h. Se registraron las lecturas de absorbancia de entre 530 y 590 nm de los pozos donde tuvo lugar la reacción para la cuantificación de formazán. La concentración de formazán es directamente proporcional al número de células vivas. El etanercept presente en la mezcla crea un efecto protector contra la citotoxicidad mediada por TNF. Los autores reportaron un perfil comparable entre las formulaciones evaluadas.

En un estudio comparativo de dos formulaciones comerciales de etanercept²² se realizó una caracterización fisicoquímica y un bioensayo *in vitro* para la determinación de la potencia biológica. El experimento consistió en realizar un ensayo similar al de Maity, et al.²¹ difiriendo únicamente en algunos tiempos de incubación (18-22 h en lugar de 20 h y 2-4 h en lugar de 4 h) y en la longitud de onda en que las lecturas fueron registradas (490 y 630 nm en lugar de 530-590 nm). Los resultados en este estudio apuntaron hacia una comparabilidad en la actividad biológica, a pesar de que se encontraron algunas diferencias en la secuencia primaria y en las modificaciones postraduccionales. Según los autores, la comparabilidad se mantiene debido a que las diferencias encontradas están ubicadas en áreas de la proteína que no afectan a la interacción con su blanco.

Factor estimulante de colonias granulocitarias (G-CSF) (filgrastim)

En 2010, Skrlin, et al.²³ publicaron un estudio de la evaluación fisicoquímica y biológica de dos formulaciones de filgrastim, una elaborada por Hospira y otra, por Amgen: Neupogen® (formulación de referencia). En dicho estudio se describen dos ensayos *in vitro*: uno de unión a receptor y otro de actividad biológica. El ensayo de unión a receptor consistió en agregar receptor de G-CSF biotinilado en placas con streptavidina. Después de realizar varios lavados y agregar una solución bloqueadora (Bovine Serum Albumin/Phosphate Buffer Saline [BSA/PBS]), se aplicó una solución en diversas concentraciones de las formulaciones de filgrastim para inmediatamente agregar G-CSF etiquetado con yodo-125 e incubar durante una noche. Se lavaron las placas y se adicionó un cóctel de centelleo comercial para la medición en un contador de centelleo líquido.

El ensayo de actividad biológica se basó en el efecto estimulante del filgrastim para la proliferación de líneas celulares de leucemia mieloide murina NFS-60,

comparando la proliferación obtenida con los productos analizados con un estándar internacional de G-CSF recombinante producido en levadura para calcular la potencia relativa. La proliferación fue medida de manera espectrofotométrica mediante el método de formazán (descrito en la sección de etanercept), pero utilizando otro sustrato denominado MTT, en lugar de MTS. Los valores obtenidos de las formulaciones estuvieron dentro del rango esperado y no hubo diferencias entre los lotes analizados.

En otro estudio desarrollado por Sörgel, et al.²⁴ se describe un bioensayo similar al descrito previamente por Skrlin, et al.²³, pero sin realizar un ensayo de unión a receptor. Los resultados obtenidos permitieron encontrar comparabilidad en la actividad biológica de las formulaciones evaluadas.

Gonadotropina coriónica humana recombinante

En este reporte publicado por Seo, et al.²⁵ se efectuó una evaluación de la eficiencia del proceso de purificación de una gonadotropina coriónica humana recombinante (rhCG), así como de la potencia biológica *in vivo/in vitro* en comparación con la rhCG de referencia Ovidrel®. El ensayo de potencia biológica *in vitro* consistió en realizar la determinación de producción de progesterona en una línea de tumor de células de Leydig de ratón (CRL-2065). Estas células fueron cultivadas en placas de seis pozos e incubadas durante 48 h; después el medio de cultivo fue retirado y las células se lavaron con PBS. Las muestras de rhCG fueron agregadas a las placas junto con las células y se incubaron durante 2 h; posteriormente se colectó el sobrenadante y se midió la concentración de progesterona con un kit comercial de inmunoensayo. Los resultados permitieron visualizar que no hubo diferencia entre las dosis evaluadas de rhCG de prueba y referencia; sin embargo, los datos obtenidos para un estándar internacional de rhCG fueron significativamente menores.

Interferón β

Meager, et al.²⁶ describieron un modelo *in vitro* para la medición de la actividad biológica de 16 lotes de medicamentos (siete lotes no innovadores y nueve lotes innovadores: Avonex® y Rebif®), en el cual se realizó un método de reducción de efecto citopático a través del uso de líneas celulares de glioblastoma humano 2D9 o adenocarcinoma humano A549. En este procedimiento las células se incuban en medio de cultivo adecuado

para cada tipo de línea junto con diluciones seriadas del medicamento y se adiciona virus de encefalomielitis (EMCV). Después de 24 h de incubación a 37 °C las células vivas se contabilizan añadiendo previamente tinción de amido negro-azul y realizando una lectura espectrofotométrica de los pocillos a 620 nm. Con los resultados obtenidos se calcularon la potencia media con respecto a un estándar internacional y la potencia específica con respecto a la actividad reportada en la etiqueta de la formulación innovadora.

En este mismo estudio se describe también un ensayo de gen reporter, el cual mide la fosfatasa alcalina secretada al medio por células transfectadas cuando son estimuladas por la presencia de interferón. En este ensayo se utilizan células HEK 293 transfectadas en las cuales se hospeda ácido desoxirribonucleico (cADN) de fosfatasa alcalina ligado al promotor del elemento de respuesta estimulada de interferón. Las células se cultivan en microplacas de 96 pocillos junto con diluciones seriadas de las formulaciones analizadas y se incuban durante 48 h. Después, alícuotas del sobrenadante de cada mezcla se transfieren a otra microplaca en las mismas posiciones que la microplaca anterior y se adiciona un sustrato de fosfato de *p*-nitrofenil, las placas se incuban 2-3 h y se mide la absorbancia a 405 nm de los pocillos con el sobrenadante. La actividad biológica de los lotes evaluados fue heterogénea, algunas formulaciones no innovadoras tenían actividad de por arriba y otras por debajo de la actividad de los lotes de medicamento innovador.

Los autores concluyen que los valores obtenidos con ambos métodos son muy similares, pero el ensayo de actividad antiviral resulta complejo, laborioso y con muchos pasos en el procedimiento, por lo que desde su perspectiva el mejor ensayo es el del gen reporter, ya que es sencillo y rápido.

Otro estudio que incluyó un ensayo *in vitro* similar al de Meager, et al.²⁶ fue descrito por Hu, et al.²⁷. En este estudio se evaluó una formulación de interferón- β -1a pegilada y se comparó contra una no pegilada. El experimento se llevó a cabo con una línea celular humana de carcinoma de pulmón A549 y se determinó el efecto protector de las formulaciones en presencia de EMCV. La incubación de las células junto con el virus y diluciones seriadas de las formulaciones fue de 30 h y después de esta incubación, las placas fueron teñidas con cristal violeta al 0.75% en formaldehído para fijación. Las placas fueron examinadas visualmente para determinar la concentración mínima a la cual los productos de estudio fueron capaces de proteger a las células contra el EMCV. Para determinar la

potencia, la última dilución positiva fue multiplicada por el límite de detección del estándar y el factor de dilución. La actividad específica fue determinada dividiendo la potencia entre la concentración de la muestra.

Anticuerpo anti-CD20 (rituximab)

Dorvignit, et al.²⁸ describen la expresión y evaluación fisicoquímica y biológica de un anticuerpo anti-CD20 candidato a biocomparable en comparación con el de referencia comercializado por Roche: Rituxan®/Mab-Thera®. En primer lugar, miden la capacidad de unión entre el anticuerpo y la proteína CD20 de cuatro variedades de líneas celulares de linfoma: Ramos, daudi, Raji y K562. El método consiste en incubar las células junto con el anticuerpo, lavar las moléculas que no se hayan unido a las células y posteriormente incubar las células con un anticuerpo antiimmunoglobulina G (ab') conjugado con fluoresceína para medir mediante citometría de flujo el marcado celular. Posteriormente realizaron un ensayo de competencia entre el rituximab y el anticuerpo de prueba; este ensayo consistió en incubar células de la línea Ramos junto con rituximab biotinilado a una concentración constante (5 µg/ml) y el anticuerpo de prueba o rituximab sin etiqueta a diferentes concentraciones, por lo que el desplazamiento de rituximab biotinilado se consideró como la afinidad relativa realizando esta medición con citometría de flujo.

Ensayos en células Ramos para la determinación de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), apoptosis y activación de la caspasa 3, así como descenso en las cuentas de linfocitos B en monos *Macaca fascicularis* (esta última será descrita y discutida en la sección de modelos preclínicos *in vivo*) fueron realizados como complemento a los estudios de unión y competencia ya mencionados. Los autores concluyen que esta serie de ensayos resultaron adecuados para verificar el perfil de la actividad biológica anticuerpos anti-CD20, ya que al comprobar que la capacidad de unión de ambos anticuerpos a células que expresan CD20 así como las CDC y ADCC es comparable, el estudio se enfocó a generar un modelo *in vivo* como aproximación a su eficacia en pacientes.

En 2013 otros dos grupos^{29,30} reportaron una caracterización de actividad biológica basada en ensayos similares a los que reportan Dorvignit, et al.²⁸ de manera que miden la capacidad de unión a CD20, CDC, ADCC y apoptosis (esta última no fue medida en el estudio de Da Silva, et al.³⁰).

Modelos preclínicos *in vivo*

EPO humana recombinante

Ramos, et al.³¹ publicaron una optimización del ensayo biológico en ratones normocitémicos, así como una comparación entre métodos visuales y citometría de flujo para el conteo de reticulocitos evaluando 12 productos disponibles comercialmente, así como un estándar europeo de EPO recombinante humana. En el ensayo se utilizaron grupos aleatorizados de ratones machos y hembras (n = 8) con un peso corporal de 27-32 g y una edad aproximada de ocho semanas. El ensayo se dividió en dos fases: una de una sola administración y otra de múltiples administraciones. Durante la fase de una sola administración, a cada ratón se le aplicó una dosis única de tres concentraciones distintas de las formulaciones vía subcutánea (sc.). A los cinco días de la administración se extrajo una muestra de sangre del seno venoso orbital para el conteo de reticulocitos. En la fase de múltiples administraciones se utilizaron tres concentraciones, la vía sc. y el mismo método de obtención de muestra, sin embargo las administraciones se realizaron una cada 24 h durante cuatro días y al quinto día la muestra sanguínea fue extraída. Todas las muestras se trajeron entre la 9 y la 11 am.

Los conteos de reticulocitos fueron más precisos y reproducibles en hembras que en machos, así como utilizando citometría de flujo, aunque esta última es un método más caro. Los resultados demostraron que este ensayo es adecuado para evaluar y comparar formulaciones de EPO, ya que fue posible encontrar diferencias en la potencia biológica de los productos evaluados.

En otro reporte, Brinks, et al.³² evalúan la calidad de cuatro formulaciones comerciales de EPO y las comparan con un estándar internacional, utilizando un método similar al de Ramos, et al. difiriendo en que sólo usan ratones Balb/C hembras, el peso corporal fue de 17-21 g y n = 6.

Proteína de fusión receptor TNF 2-Fc (etanercept)

En el estudio antes citado de Maity, et al.²¹ también fue incluida una evaluación preclínica de eficacia realizada en ratones heterocigotos de tres semanas provenientes de una cruce de ratones transgénicos humanizados con sobreexpresión de TNF (Tg197), los cuales desarrollan artritis. Se incluyeron varios grupos, uno que fue sacrificado al inicio (n = 4) y tres administrados por

vía intraperitoneal (ip.) dos veces por semana durante siete semanas: un control positivo el cual recibió Enbrel® (n = 8), un placebo el cual recibió *buffer* de la formulación de prueba (n = 8) y un grupo de prueba que recibió formulación de prueba (n = 16). Una muestra de suero fue obtenida mediante punción cardíaca después de las siete semanas de tratamiento, las articulaciones del tobillo fueron recolectadas, fijadas en formalina, descalcificadas, embebidas en bloques de parafina, teñidas con hematoxilina/eosina y analizadas microscópicamente para su verificar su estado histopatológico.

No hubo diferencias significativas en el puntaje obtenido para los grupos de prueba y control positivo; en contraste, el grupo placebo y el grupo sacrificado al principio tuvieron valores significativamente superiores a los grupos tratados.

G-CSF (filgrastim)

Vanz, et al.³³ publicaron una caracterización de una formulación de filgrastim clonada, expresada y purificada por ellos mismos, comparándola con un estándar internacional. En esta caracterización una de las evaluaciones fue un ensayo biológico *in vivo* en ratones machos Balb/C (n = 6) de 19-24 g con neutropenia inducida con una dosis única de ifosfamina en el día 0 del experimento. Posteriormente se les administró vía ip. del día 1 al 4 tres concentraciones de cada formulación. 6 h después de la última administración se extrajo una muestra sanguínea del seno venoso orbital para analizar microscópicamente las muestras y realizar el conteo de manera manual de neutrófilos. Este modelo permitió visualizar una respuesta dosis-dependiente con cada formulación, la cual no fue estadísticamente diferente entre las diferentes concentraciones de las formulaciones analizadas. Las determinaciones entre cada concentración fueron estadísticamente significativas y superiores al control.

Gonadotropina coriónica humana recombinante

En la evaluación realizada por Seo, et al.²⁵, se utilizaron tres ensayos *in vivo* diferentes de múltiples dosis (n = 8): ritmo de ovulación en un modelo de ratas inmaduras imprimadas con gonadotropina; ritmo de ovulación en un modelo de ratas inmaduras imprimadas con hormona folículo estimulante (FSH), y ritmo de ovulación en un modelo de ratones con esterilización androgénica.

El primero de ellos se llevó a cabo en ratas hembra

Sprague Dawley a las cuales se les inyectó gonadotropina de suero de yegua preñada vía sc. para la maduración de los folículos en el día 0 y en el día 3 los productos evaluados para inducción de ovulación. Los animales fueron sacrificados en el día 4 y el número de óvulos provenientes de los oviductos extirpados fueron contados mediante análisis microscópico.

El segundo modelo se realizó con las mismas características del primer modelo, sólo que en este caso la inducción de maduración de los folículos de las ratas se hizo con cuatro inyecciones (una cada 12 h) de FSH. Después de 12 h de la última inyección los productos fueron administrados vía sc. para la inducción de ovulación y los animales sacrificados 20 h después para el conteo de óvulos.

Para el tercer modelo se utilizaron ratones hembra, los cuales fueron inyectados vía sc. con propionato de testosterona para la esterilización androgénica. A las 8-9 semanas después de la inyección se indujo un síndrome poliquístico ovárico. Posteriormente se siguió el mismo procedimiento que en el segundo modelo administrando FSH, rhCG y contando los óvulos mediante análisis microscópico.

Los resultados obtenidos con los tres modelos fueron consistentes evidenciando la ausencia de diferencias entre la formulación de prueba, la de referencia y el estándar. Los autores concluyen que con los tres modelos abordados se cuenta con suficiente evidencia preclínica para demostrar la actividad biológica *in vivo* de rhCG.

Interferón-β

Hu, et al.²⁷, durante la evaluación de una formulación de interferón β-1a pegilado versus una formulación de referencia no pegilada, realizaron, además del ensayo *in vitro* anteriormente descrito, un ensayo farmacocinético y farmacodinámico en monos Rhesus (*Macaca mulatta*) machos (n = 5), los cuales recibieron una administración única de los interferones evaluados vía sc. o intramuscular (im.). Se obtuvieron 11 muestras sanguíneas durante las 168 h posteriores a la dosis para la determinación sérica de neopterina como biomarcador de respuesta farmacodinámica. La neopterina fue cuantificada empleando un kit comercial de inmunoensayo. Las curvas de concentración sérica de neopterina versus tiempo permitieron visualizar un aumento de la concentración media después de la dosis que confirmó la actividad biológica de los productos analizados. No se encontraron diferencias significativas entre las rutas de administración y las formulaciones evaluadas.

Anticuerpo anti-CD20 (rituximab)

Da Silva, et al.³⁰ describen el desarrollo de una formulación propuesta para biocomparable de rituximab; en ella incluyen algunos ensayos *in vitro* (discutidos en la sección de modelos *in vitro*) y tres ensayos *in vivo*: uno con ratones xenoinjertados y un estudio farmacocinético y otro farmacodinámico en monos cynomolgus (*Macaca fascicularis*). El modelo de xenoinjertos se llevó a cabo en dos diferentes tipos de ratones inmunodeficientes severamente comprometidos (SCID) de linfoma no Hodking con líneas celulares SU-DHL-4 ($n = 50$) y Jeko-1 ($n = 24-40$). Los ratones fueron inyectados vía sc. con las líneas celulares en el flanco y aquéllos con volúmenes de tumor de 100-150 mm³ (SU-DHL-4) o 200 mm³ (Jeko-1) 22 días después de la inyección fueron aleatorizados para recibir los tratamientos vía ip., dos concentraciones diferentes para los ratones con SU-DHL-4 y tres para Jeko-1, una vez por semana durante cuatro semanas. Los tumores fueron medidos dos veces por semana.

El modelo farmacodinámico en monos cynomolgus consistió en evaluar el efecto de la administración en las cuentas totales y relativas de dos poblaciones de células B encontradas en los monos: CD20^{high}CD40^{low}CD21- y CD20^{high}CD40^{low}CD21+. Los tratamientos fueron administrados por vía intravenosa (iv.) en dos modalidades: dosis única a 10 semanas de seguimiento ($n = 7$) o dosis múltiple ($n = 8$) en dos concentraciones diferentes administradas semanalmente durante cuatro semanas y con un seguimiento primero de cuatro semanas y después de seis meses (sólo un subgrupo de $n = 4$) libres de administración. Las cuentas celulares se obtuvieron a través de un sistema automatizado con inmunotinción de las subpoblaciones celulares.

Ambos métodos mostraron resultados con ausencia de diferencias significativas entre los tratamientos y con una respuesta dosis dependiente en las concentraciones evaluadas. Sin embargo, el análisis del modelo SU-DHL-4 presentó una mayor heterogeneidad asociada al modelo relacionado con el incremento en el tiempo de seguimiento.

Discusión y conclusiones

La creciente demanda de terapias más eficaces en el tratamiento de enfermedades, así como el vencimiento de las patentes de numerosos biofármacos, han desencadenado la necesidad de crear modelos precisos de evaluación para desarrollar formulaciones con alta probabilidad de poseer una seguridad y una

eficacia comparables a las de los productos innovadores, ya que en su gran mayoría esta clase de medicamentos están dirigidos hacia indicaciones terapéuticas complejas como el cáncer.

Los modelos de evaluación aquí descritos han probado tener la capacidad de fungir como herramientas de comparación durante el desarrollo de los medicamentos analizados; sin embargo, es importante señalar que ninguno de los modelos incluidos en esta revisión posee la capacidad validada científicamente de predecir la eficacia a nivel clínico, debido, en parte, a la notable diferencia entre la fisiología humana y la del modelo utilizado. Esta situación se puede apreciar en que algunos de los productos mencionados aún están en fase de desarrollo o en evaluación clínica, mientras que otros ya se encuentran disponibles en el mercado³⁴⁻³⁶. Por ejemplo, la formulación de EPO Binocrit®, cuyas propiedades fisicoquímicas y actividad biológica *in vivo* se describen en el estudio previamente discutido de Brinks, et al.³², fue registrada en 2007 por la Agencia Europea del Medicamento (EMA)³⁴. En un reporte de Brockmeyer, et al.³⁷ se encuentra un compendio de los ensayos fisicoquímicos y preclínicos realizados para el registro de Binocrit®, así como una lista de los ensayos clínicos que se incluyeron para evidenciar la seguridad y eficacia de esta formulación. Uno de los estudios clínicos de Binocrit®, publicado en 2009³⁸, consistió en un ensayo clínico comparativo en 80 voluntarios sanos con dosis múltiple que evaluó el perfil farmacocinético y farmacodinámico, con Eprex® como medicamento de referencia. Otro de los estudios, publicado en 2011³⁹, evaluó la eficacia, la equivalencia terapéutica (con respecto al medicamento de referencia) y la seguridad de las formulaciones en pacientes con anemia producida por quimioterapia.

Esta ruta de registro para medicamentos biotecnológicos biocomparables ya ha sido recorrida en múltiples ocasiones por agencias regulatorias como la EMA en la Unión Europea y la *Food and Drug Administration* (FDA) en EE.UU., y se espera que en nuestro país el registro de nuevos biocomparables se realice de esta manera⁴⁰.

En México, la regulación iniciada en 2011⁸ y culminada en 2013 con la emisión de la NOM-177-SSA1-2013¹⁶ proporciona un camino general para la evaluación y registro de este tipo de medicamentos; sin embargo, la especificidad de los lineamientos quedaría sujeta a la experiencia que se pueda acumular en los próximos años como consecuencia de la regularización de los registros sanitarios que están ya en el mercado nacional y el otorgamiento de registros a nuevos biocomparables de innovadores que irán

perdiendo la vigencia de sus patentes. En la normativa mexicana^{16,40} se contemplan, al igual que en la regulación internacional^{7,9,12,13}, los tres niveles de evaluación mencionados: fisicoquímico, preclínico y clínico.

Este tipo de modelos preclínicos permite a la industria farmacéutica tomar importantes decisiones antes de avanzar hacia ensayos clínicos que avalen la eficacia en el tratamiento de las indicaciones terapéuticas para las cuales el medicamento será prescrito, así como su seguridad.

Bibliografía

1. IMARC Group. Global biopharmaceutical market report & forecast (2012-2017). 2012. [Internet] Consultado el 16 de febrero de 2014. Disponible en: <http://www.imarcgroup.com/biotechnology-industry/>.
2. FiercePharma. The 15 best-selling drugs of 2012. 2012. [Internet] Consultado el 16 de febrero de 2014. Disponible en: <http://www.fiercepharma.com/special-reports/15-best-selling-drugs-2012>.
3. Knezevic I, Griffiths E. Biosimilars--global issues, national solutions. *Biologics*. 2011;39(5):252-5.
4. Walsh G. Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology. New Jersey, EE.UU.: John Wiley & Sons Limited; 2003.
5. Chirino AJ, Mire-Sluis A. Characterizing biological products and assessing comparability following manufacturing changes. *Nat Biotechnol*. 2004;22(11):1383-91.
6. Dranitsaris G, Amir E, Dorward K. Biosimilars of biological drug therapies: regulatory, clinical and commercial considerations. *Drugs*. 2011;71(12):1527-36.
7. EMA (European Medicines Agency). 2005. Guideline on similar biological medicinal products. [Internet] Consultado el 16 de febrero de 2014. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003517.pdf.
8. DOF (Diario Oficial de la Federación). 2011. Decreto por el que se reforman y adicionan diversas disposiciones del Reglamento de Insurmos para la Salud. [Internet] Consultado el 16 de febrero de 2014. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5214882&fecha=19/10/2011.
9. FDA (Food and Drug Administration). 2012. Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product. [Internet] Consultado el 16 de febrero de 2014. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM291128.pdf>.
10. ICH (International Conference on Harmonisation). 2004. Harmonised tripartite guideline. Comparability of biotechnological/biological products subject to changes in their manufacturing process Q5E. [Internet] Consultado el 16 de febrero de 2014. Disponible en: http://www.ich.org/fieadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5E/Step4/Q5E_Guideline.pdf.
11. WHO (World Health Organization). 2006. Biosimilars. [Internet] Consultado el 16 de febrero de 2014. Disponible en: http://www.who.int/medicines/services/inn/inn_bio/en/.
12. WHO (World Health Organization). 2009. Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs). [Internet] Consultado el 16 de febrero de 2014. Disponible en: http://www.who.int/medicines/services/inn/inn_bio/en/.
13. Ibarra-Cabrera R, Mena-Pérez SC, Bondani-Guasti A, García-Arrazola R. Review on the worldwide regulatory framework for biosimilars focusing on the Mexican case as an emerging market in Latin America. *Bio-technol Adv*. 2013;31(8):1333-43.
14. López Silva C. Mexico recovers leadership on regulation of biosimilar biotech drugs. *Gac Med Mex*. 2012;148(1):83-90.
15. DOF (Diario Oficial de la Federación). 2012. NOM-EM-001-SSA1-2012. [Internet] Consultado el 16 de febrero de 2014. Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5269530&fecha=20/09/2012.
16. DOF (Diario Oficial de la Federación). 2013. NOM-177-SSA1-2013. [Internet] Consultado el 16 de febrero de 2014. Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013.
17. Holloway C, Mueller-Berghaus J, Lima BS, et al. Scientific considerations for complex drugs in light of established and emerging regulatory guidance. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1276:26-36.
18. McCamish M, Woollett G. The state of the art in the development of biosimilars. *Clin Pharmacol Ther*. 2012;91(3):405-17.
19. Berkowitz SA, Engen JR, Mazzeo JR, Jones GB. Analytical tools for characterizing biopharmaceuticals and the implications for biosimilars. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(7):527-40.
20. Park SS, Park J, Ko J, et al. Biochemical assessment of erythropoietin products from Asia versus US Epoetin alfa manufactured by Amgen. *J Pharm Sci*. 2009;98(5):1688-99.
21. Maity S, Ullanat R, Lahiri S, et al. A non-innovator version of etanercept for treatment of arthritis. *Biologics*. 2011;39(6):384-95.
22. Tan Q, Guo Q, Fang C, et al. Characterization and comparison of commercially available TNF receptor 2-Fc fusion protein products. *MAbs*. 2012;4(6):761-74.
23. Skrlin A, Radic I, Vuletic M, et al. Comparison of the physicochemical properties of a biosimilar filgrastim with those of reference filgrastim. *Biologics*. 2010;38(5):557-66.
24. Sörgel F, Lerch H, Lauber T. Physicochemical and biologic comparability of a biosimilar granulocyte colony-stimulating factor with its reference product. *BioDrugs*. 2010;24(6):347-57.
25. Seo KS, Yoon JW, Na KH, et al. Evaluation of process efficiency and bioequivalence of biosimilar recombinant human chorionic gonadotropin (rhCG). *BioDrugs*. 2011;25(2):115-27.
26. Meager A, Dolman C, Dilger P, et al. An assessment of biological potency and molecular characteristics of different innovator and non-innovator interferon-beta products. *J Interferon Cytokine Res*. 2011; 31(4):383-92.
27. Hu X, Olivier K, Polack E, et al. In vivo pharmacology and toxicology evaluation of polyethylene glycol-conjugated interferon beta-1a. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;338(3):984-96.
28. Dorvignit D, Palacios JL, Merino M, et al. Expression and biological characterization of an anti-CD20 biosimilar candidate antibody: a case study. *MAbs*. 2012;4(4):488-96.
29. Visser J, Feuerstein I, Stangler T, Schmiederer T, Fritsch C, Schiestl M. Physicochemical and functional comparability between the proposed biosimilar rituximab GP2013 and originator rituximab. *BioDrugs*. 2013;27(5):495-507.
30. da Silva A, Kronthaler U, Koppenburg V, et al. Target-directed development and preclinical characterization of the proposed biosimilar rituximab GP2013. *Leuk Lymphoma*. 2014;55(7):1609-17.
31. Ramos AS, Schmidt CA, Andrade SS, Fronza M, Rafferty B, Dalmora SL. Biological evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical products. *Braz J Med Biol Res*. 2003;36(11):1561-9.
32. Brinks V, Hawe A, Basmehle AH, et al. Quality of original and biosimilar epoetin products. *Pharm Res*. 2011;28(2):386-93.
33. Vanz AL, Renard G, Palma MS, et al. Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization. *Microb Cell Fact*. 2008;7:13.
34. EMA (European Medicines Agency). 2014. European public assessment reports. [Internet] Consultado el 6 de marzo de 2014. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages%2Fmedicines%2Flanding%2Fepar_search.jsp&mid=WC0b01ac058001d124&searchTab=searchByAuthType&alreadyLoaded=true&isNewQuery=true&status=Authorised&status=Withdrawn&status=Suspended&status=Refused&keyword=Enter+keywords&searchType=name&taxononyPath=&treeNumber=&searchGenericType=biosimilars&genericsKey-wordSearch=Submit.
35. COFEPRIS (Comisión Federal Para la Protección Contra Riesgos Sanitarios). 2014. Registros Sanitarios de Medicamentos. [Internet] Consultado el 6 de marzo de 2014. Disponible en: <http://www.cofepris.gob.mx/AS/Paginas/Registros%20Sanitarios/RegistroSanitarioMedicamentos.aspx>.
36. FDA (Food and Drug Administration). 2014. Approved Drug Products. [Internet] Consultado el 6 de marzo de 2014. Disponible en: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm>.
37. Brockmeyer C, Seidl A. Binocrit: assessment of quality, safety and efficacy of biopharmaceuticals. *Eur J Hosp Pharm*. 2009;15:34-40.
38. Sörgel F, Thyroff-Friesinger U, Vetter A, Vens-Cappell B, Kinzig M. Bioequivalence of HX575 (recombinant human epoetin alfa) and a comparator epoetin alfa after multiple subcutaneous administrations. *Pharmacology*. 2009;83(2):122-30.
39. Büchler T. Therapeutic equivalence and effectiveness of Binocrit (HX575) in patients with anemia caused by chemotherapy. *Klin Onkol*. 2011;24(2):147-8.
40. DOF (Diario Oficial de la Federación). 2012. Lineamientos que deberán cumplir los medicamentos biotecnológicos biocomparables. [Internet] Consultado el 6 de marzo de 2014. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5255257&fecha=19/06/2012.