

Fundamentos de Comparabilidad Analítica de Anticuerpo Monoclonal Biosimilar para Revisores Regulatorios

Grupo de Trabajo de Biosimilares
Foro Internacional de Reguladores Programa (IPRP)

Disclaimer :

This document reflects the views of subject matter experts participating in the IPRP Biosimilars (BWG) Working Group and should not be construed to represent the official views of any given regulatory authority participating in the IPRP.

Contenido

I. Descargo de Responsabilidad	5~6
II. Conceptos de Biosimilar	
1. Definición de Biosimilar	8
2. Definición de Similitud/Biosimilitud	9
3. Proceso de Desarrollo de Biosimilares	11
4. Demostración de Similitud/Biosimilitud	14
5. Producto de Referencia	16
III. Evaluación de Comparabilidad Analítica	
6. El papel del Análisis de Calidad	19
7. Estructura vs Función/Inmunogenicidad de un Anticuerpo Monoclonal --	21
8. Atributos de Calidad	29

Contenido

III. Evaluación de Comparabilidad Analítica (contin.)

9. Evaluación de Atributos Críticos de Calidad -----	34
10. Selección e Idoneidad de los Métodos Analíticos -----	40
11. Atributos de Calidad vs Métodos Analíticos -----	43
12. Evaluación de Comparabilidad Analítica -----	50
(o Ejercicio de Comparabilidad Biosimilar, Estudios de Similitud Analítica)	
13. Evaluación de Incertidumbre Residual -----	57
14. Comparabilidad Analítica e Impacto Potencial en la Extrapolación --	59
15. Resumen -----	60

Contenido

IV. Apéndice 1 : Información Adicional

A. Comprensión del Producto de Referencia -----	65
B. Diferencias de Producción de Líneas Celulares -----	73
C. Diferencias de Formulación -----	79
D. Ejemplo de Evaluación de Comparabilidad Analítica -----	81
E. Criterio de aceptación de similitud y Enfoques Estadísticos --	91
F. CCDA : Sistema fisiológico & Sistema desmesurado -----	96
G. CDC (Citotoxicidad Dependiente de Complemento) -----	98
H. Alotipo de Receptores Fc-gamma -----	99
I. Directrices Relevantes -----	102
J. Lista de Abreviaturas -----	105

V. Apéndice 2 : Estudio de Caso (Remsima/Inflectra)

- Enfocado en presentación de información pública desde el informe de revisión de la FDA -----	106
--	-----

I. Descargo de Responsabilidad

Descargo de Responsabilidad

- Este material es una recopilación de información públicamente disponible sobre el enfoque actual para la comparabilidad analítica de biosimilares, en particular, sobre anticuerpos monoclonales.
- Este material no incluye ninguna recomendación específica del BWG IPRP (Grupo de Trabajo de Biosimilares del Foro Internacional de Reguladores Programa) y las apreciaciones y opiniones expresadas en este material son personales de quienes han ofrecido sus servicios y no necesariamente reflejan la política o posición oficial de ninguna agencia u organización.
- Los nombres de productos o fabricantes utilizados en este material son solo ejemplos para ayudar a la comprensión del lector y no reflejan ningún tipo de apoyo del IPRF, la OMS u otras organizaciones que otorgan licencias/autorizaciones o certifican la calidad/seguridad/eficacia de los productos.

Descargo de Responsabilidad

- Este material no genera ningún derecho específico para aquel que lo use comercialmente. No está protegido por derecho de autor y cualquiera que desee, puede utilizarlo libremente.
- Este material fue creado con el fin de ayudar a los/as revisores/as de regulaciones, antes de iniciar la tarea de revisión de la calidad de biosimilares, una actividad que requiere cierto nivel de conocimiento bioterapéutico y experiencia de revisión.
- Este material puede ser utilizado como herramienta complementaria para entrenamiento inicial en biosimilitud y cursos interactivos de formación práctica, por ejemplo.

6

II. Conceptos de Biosimilar

1. Definición de Biosimilar

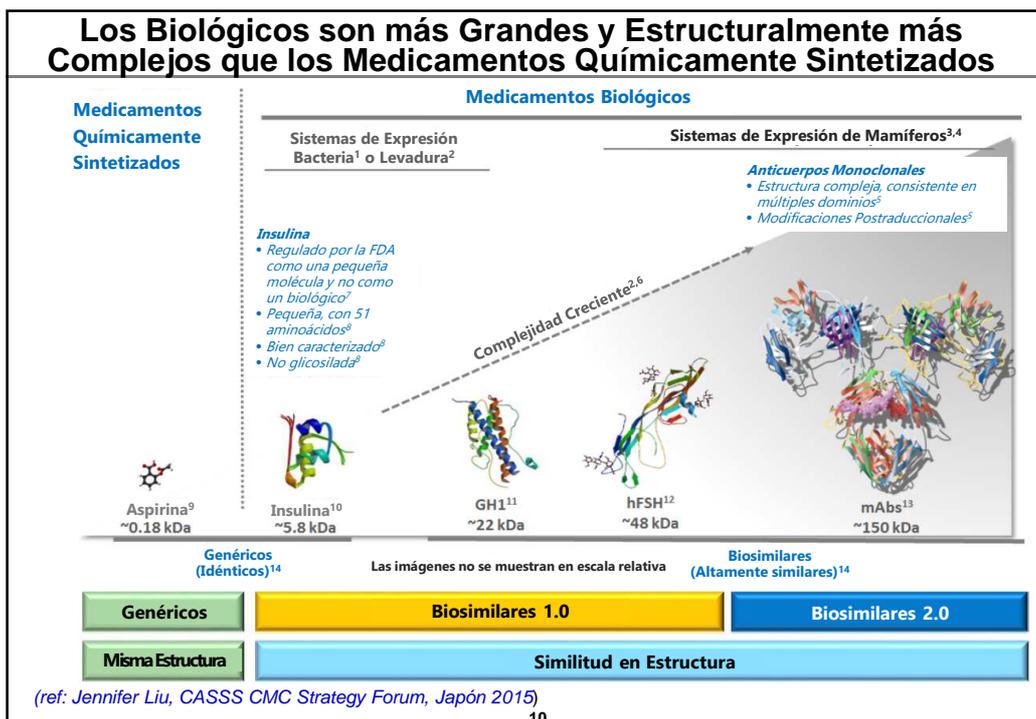
- OMS – Producto bioterapéutico similar (PBS) es un producto bioterapéutico que es similar en términos de calidad, seguridad y eficacia, a un producto bioterapéutico de referencia ya autorizada. (*ref...: OMS, Directrices para Evaluación de Productos Bioterapéuticos Similares (PBS), 2009*)
- EMA - Un medicamento biosimilar es un medicamento biológico que contiene una versión de la sustancia activa de un medicamento biológico original ya autorizado (medicamento de referencia). Un medicamento biosimilar demuestra similitud al medicamento de referencia en términos de características de calidad, actividad biológica, seguridad y eficacia basada en un comprehensivo ejercicio de comparabilidad. (*ref...: EMA, Directrices sobre medicamentos biológicos similares, 2014*)
- FDA EE.UU. – El producto biológico es altamente similar al producto de referencia a pesar de diferencias menores en componentes clínicamente inactivos, y no hay diferencias clínicas significativas entre el producto biológico y el producto de referencia en términos de seguridad, pureza y potencia. (*ref...: Sección 7002(b)(3) de la Ley de Salud Asequible, sección adicional 351(i)(2) de la Ley de Servicio de Salud Pública*)

8

2. Definición de Similitud/Biosimilitud

- Similar no significa Igual**
 - ✓ **Altamente similar** al producto de referencia en todos los atributos de calidad clínicamente relevante, p.ej. atributos del producto que puede tener impacto en el desempeño clínico. (*ref...: OMS, Directrices para Evaluación de Productos Bioterapéuticos Similares (PBS), 2009*)
 - ✓ Altamente similar al producto de referencia a pesar de diferencias menores en componentes clínicamente inactivos, y no hay diferencias clínicas significativas entre el producto biológico y el producto de referencia en términos de seguridad, pureza y potencia. (*ref...: Sección 7002(b)(3) de la Ley de Salud Asequible, sección adicional 351(i)(2) de la Ley de Servicio de Salud Pública*)
- Es casi imposible que los medicamentos bioterapéuticos sean producidos con las mismas moléculas que las del producto de referencia
- ¿Por qué?
 - a) Los bioterapéuticos tienen composición molecular mucho más compleja y heterogénea
 - b) Son sensibles a diferencias entre líneas celulares, procesos de manufacturación y formulación
- ¡¡Se requieren de ejercicios comprehensivos de comparabilidad para demostrar la biosimilitud entre los productos de referencia y los biosimilares!!**

9



10

3. Proceso de Desarrollo de Biosimilares

- Incremento de conocimiento sobre la relación entre las propiedades bioquímicas, fisicoquímicas y biológicas del producto y los resultados clínicos facilitan el desarrollo de los biosimilares.
- Consideraciones Generales
 - a) Los Biosimilares deben **utilizar el(los) mismo(s) mecanismo(s) de acción** del producto de referencia;
 - b) Tener la **misma vía de administración y forma de dosificación** que el producto de referencia.
 - c) **Las diferencias con respecto al producto de referencia en cuanto a la resistencia, forma farmacéutica, formulación, excipientes o presentación requieren justificación.** En caso necesario, debe proporcionarse información adicional. Ninguna diferencia debe comprometer la seguridad.
(EMA, Directrices sobre medicamentos biológicos similares, 2014)

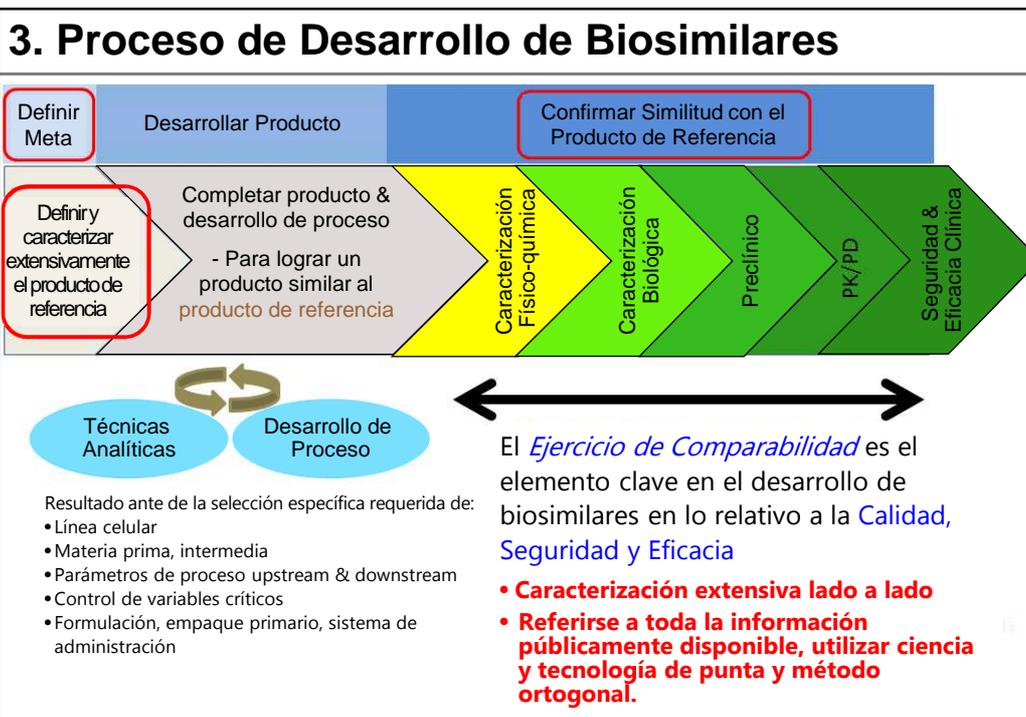
11

3. Proceso de Desarrollo de Biosimilares

□ Desarrollo de Biosimilares

- a) Comprensión del producto de referencia y definición de atributos críticos de calidad (CQAs) y atributos adicionales a monitorear
 - información públicamente disponible (material bibliográfico, etc.), datos de caracterización extensiva del producto de referencia
 - mecanismos de acción (todos los posibles), funciones biológicas, pureza, seguridad, y perfiles de inmunogenicidad, etc.
- b) Establecimiento del perfil de calidad objetivo de producto del Biosimilar
 - La mayoría de los CQAs deben haberse previamente establecido en el desarrollo
- c) Desarrollo de fabricación para que iguale al perfil del producto de referencia
- d) Demostración de Comparabilidad Analítica
- e) Estudios Clínicos y No clínicos

12



4. Demostración de Similitud/Biosimilitud

Enfoque gradual

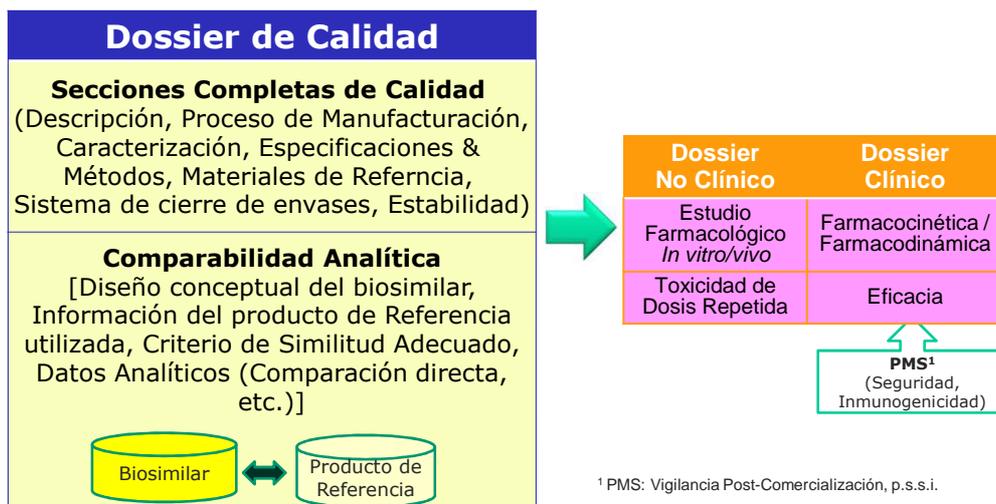
- a) La demostración de la similitud de un biosimilar a un producto de referencia en términos de calidad es un prerrequisito para reducir el conjunto de información clínica y no clínica requerida para otorgar la licencia.
- b) Avanzar hacia el siguiente nivel para abordar incertidumbres residuales, si las hay.

Totalidad de Evidencia

- a) La decisión de otorgar la licencia a un producto biosimilar debe estar basada en una evaluación comprehensiva del paquete completo de datos para cada uno de los parámetros de Calidad, Clínicos y No Clínicos que demuestre la similitud a un Producto de Referencia.

14

4. Demostración de Similitud/Biosimilitud



15

5. Producto de Referencia

- Debe ser un producto medicinal **aprobado** dentro del territorio regulatorio, sobre la base de un **dossier completo**. (ref.....: EMA, *Directrices sobre medicamentos biológicos similares, 2014*)
- Como comparador **debe utilizarse un solo producto de referencia** a lo largo del programa de comparabilidad para estudios de calidad, seguridad y eficacia, durante el desarrollo de un biosimilar a fin de generar datos y conclusiones coherentes. (ref.....: EMA, *Directrices sobre medicamentos biológicos similares, 2014*)
- Cambios en el perfil de calidad del Producto de Referencia**
 - a) Estos eventos pueden ocurrir durante el desarrollo de un biosimilar y pueden resultar en un desarrollo realizado acorde a un QTPP¹ que ya no sea completamente representativo del producto de referencia disponible en el mercado. ¹ QTPP: Perfil de Calidad del Producto Obejtivo, p.s.s.i.
 - b) Los rangos identificados antes y después del cambio observado en el perfil de calidad normalmente podrían utilizarse para respaldar el ejercicio de comparabilidad biosimilar a nivel de calidad, ya que cualquiera de los rangos es representativo del medicamento de referencia. (ref.....: EMA, *Directrices sobre medicamentos biológicos similares que contienen como sustancia activa proteínas derivadas de biotecnología: cuestiones de calidad, 2014*)

16

5. Producto de Referencia

- La mayoría de las regulaciones requieren necesariamente la demostración de la comparabilidad con respecto a un producto local aprobado en su jurisdicción.
 - a) Posibilidad de divergencia geográfica en los atributos de calidad del producto de referencia:
 - Variaciones provenientes de cadena de suministro diferente (p.ej. Diferencia de sitios de manufacturación)
 - Variaciones después de la separación del titular de licencia & cambio independiente
 - Variaciones provenientes de aplicación secuencial de un cambio de proceso de manufacturación
- El Uso de un Producto de Referencia Extranjero
 - a) Para facilitar el desarrollo global, la mayoría de las Autoridades Regulatorias Nacionales aceptan el uso de productos de referencia no locales si se demuestra la equivalencia de los productos de referencia locales y extranjeros (**Estudio de enlace**).

(véase también Apéndice I, 'A. Comprensión del Producto de Referencia')

17

III. Evaluación de Comparabilidad Analítica

6. El papel del Análisis de Calidad

Los análisis de calidad son herramientas esenciales para establecer la similitud.

a) Respecto a este aspecto, los análisis son típicamente más sensibles que los resultados de evaluaciones clínicas tradicionales.

b) Los estudios clínicos juegan su papel para respaldar la similitud.

(ref.....: Respaldo la biosimilitud y extrapolación, GABI Journal, vol. 4 (4), 2015)

Es esencial una caracterización robusta.

a) Cuanto más comprehensiva y robusta sea la caracterización de los datos,

⇒ más sólida será la justificación para la selección y abordaje del objetivo tanto para ensayo animal y humano

⇒ más sólida será la justificación de las diferencias

6. El papel del Análisis de Calidad

Factores de Impacto sobre la "Similitud"

1. Sistema de Expresión
2. Proceso de Manufacturación
3. Físico-química
4. Funcional
5. Vinculación Receptor
6. Impurezas
7. Producción Ref. & Estándar
8. Producto Medicinal
9. Estabilidad

Criterio	Menos Datos	Más Datos
Comprensión exhaustiva del Producto de Referencia	Permite una buena justificación para la ventana de similitud	
Línea celular de expresión y formulación	Igual	Diferente
Secuencia de Aminoácidos	Idéntico	Puede no ser un biosimilar
Estructura	Altamente similar	Diferente
Modificación postraducciona	Altamente similar	Diferente
Cinética, vinculantes	Equivalente	No Equivalente -Puede no ser un Biosimilar
Procesos & Impureza relacionado al producto	Altamente similar	Diferente - pueden ser necesarios datos no clínicos (toxicidad)
Degradación forzada	Altamente similar	Diferente
Entendimiento Comprehensive	Esperado	

(ref: Taller de Trabajo en Bioterapéuticos Ramanan S (Amgen) AHC 2015)

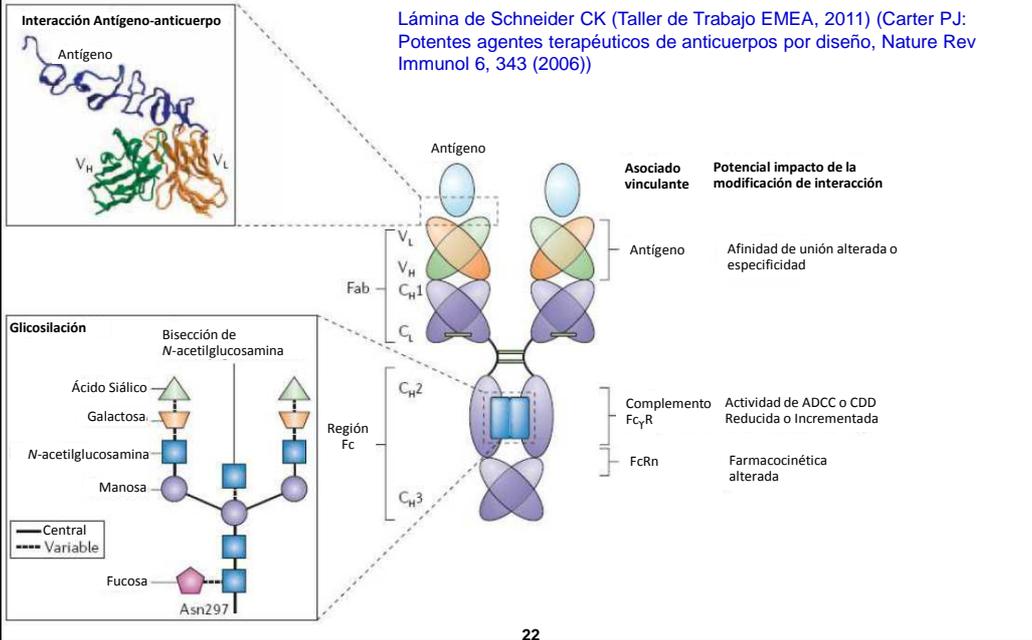
20

7. Estructura vs Función/Inmunogenicidad de un AcM

- Los bioterapéuticos, especialmente los anticuerpos monoclonales (AcM) son moléculas muy grandes, complejas y heterogéneas.
- Estructura vs Función**
 - a) Función Fab: actividad biológica mediante la unión a objetivo específico
 - b) Función Fc: unión a FcγR/C1q etc..... ⇒ CDC, ADCC, ADCP etc.....
 Unión a FcRn ⇒ protegiendo la IgG de la degradación lisosómica, perfil Farmacocinético
- Estructura vs Inmunogenicidad**
 - a) Impurezas relacionadas al proceso (proteína de la célula huésped, endotoxina, etc.....)
 - b) Sustancias/impurezas relacionadas al producto
 : oligosacáridos no humanos (perfil de glicosilación), Agregados, etc.....

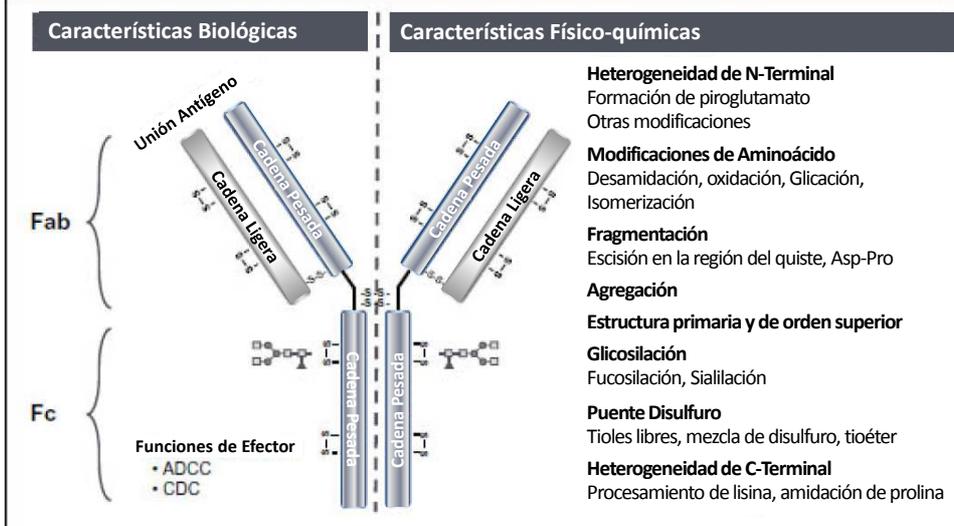
21

7. Estructura vs Función/Inmunogenicidad de un AcM



7. Estructura vs Función/Inmunogenicidad de un AcM

Figura 1: Estructura y función de un anticuerpo monoclonal generalizada



(ref : Respaldando la biosimilitud y extrapolación, GABI Journal, vol. 4(4), 2015)

7. Estructura vs Función/Inmunogenicidad de un AcM

Impurezas relacionadas con el proceso

(ref.....: EMA, *Directrices sobre medicamentos biológicos similares*, 2014)

- a) Las impurezas relacionadas con el proceso pueden diferir entre el producto original y los biosimilares, aunque deberían minimizarse. Es preferible confiar en los procesos de purificación para eliminar las impurezas en lugar de establecer un programa de pruebas no clínicas para su calificación. Las diferencias que pueden conferir una ventaja de seguridad (p.ej., niveles más bajos de impurezas) deben ser explicados, pero es poco probable que excluyan la biosimilitud.
- b) Se espera que las impurezas relacionadas con el proceso (por ejemplo, proteínas de células huésped, ADN de células huésped, reactivos, impurezas de downstream, etc.....) difieran cualitativamente de un proceso a otro. Por lo tanto, **la comparación cualitativa de estos parámetros puede no ser relevante en el ejercicio de comparabilidad biosimilar**. Sin embargo, **se deben aplicar las tecnologías analíticas de vanguardia** siguiendo las directrices existentes, los requisitos compendiales, **y los riesgos potenciales relacionados con estas impurezas identificadas (p.ej., inmunogenicidad) tendrán que documentarse y justificarse adecuadamente**.

24

7. Estructura vs Función/Inmunogenicidad de un AcM

La heterogeneidad en Anticuerpos Monoclonales Recombinantes

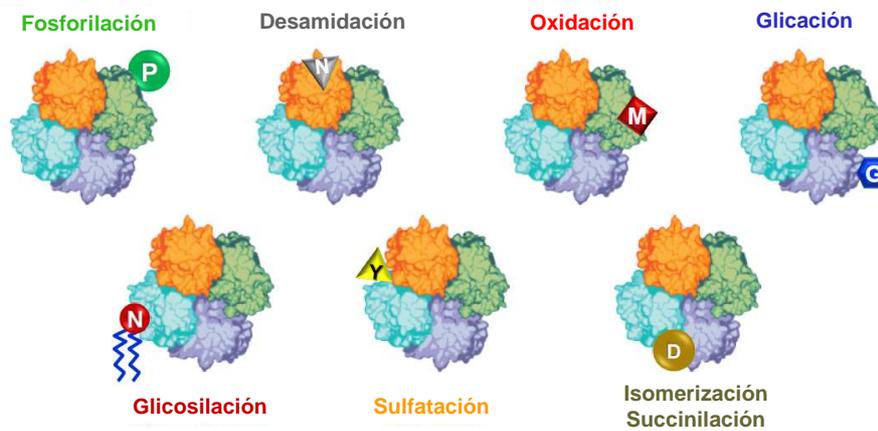
- a) Los anticuerpos monoclonales muestran comúnmente varias fuentes de heterogeneidad (p.ej. Procesamiento de lisina de C- terminal, Piroglutamato de N-terminal, desamidación, oxidación, isomerización, fragmentación, desajuste de uniones de disulfuro, oligosacáridos N-vinculados, glicación), que llevan a un perfil complejo de pureza/impureza abarcando varias entidades o variantes moleculares. (ref.....: EMA, *Directriz sobre Desarrollo, Producción, Caracterización y Especificación de Anticuerpos Monoclonales y Productos relacionados*, 2009)
- b) Todas estas variaciones relacionados con el producto pueden alterar las propiedades biológicas de la recombinante de proteína expresada. Por lo tanto, **la identificación y determinación de los niveles relativos de variantes de proteína deben ser incluidas en los estudios de caracterización analítica comparativa**. (ref.....: FDA de EE.UU., *Guía, Consideraciones de Calidad en la Demostración de Biosimilitud de un Producto Proteínico Terapéutico respecto a un Producto de Referencia*, 2015)
- c) **También debe evaluarse el impacto sobre la potencia, inmunogenicidad FC/FD etc.....**
 ej.) Lisina de C-terminal: variabilidad del nivel de truncación
 ⇒ variabilidad de perfil de carga (p.ej., heterogeneidad de carga)
 ⇒ pero no parece afectar a la potencia o al perfil de seguridad

25

7. Estructura vs Función/Inmunogenicidad de un AcM

□ Modificaciones Postraduccionales (PTMs)

- a) Diversos PTMs pueden contribuir a diversidad estructural y funcional
b) afectados por la línea celular y proceso de producción



1. Mann M, et al. *Nature Rev Biotech.* 2003;21:255-261; 2. Medzhiradzky KF, et al. *Mol Cell Proteomics.* 2004;5:429-440;
3. Karve TM, et al. *J Amino Acids.* 2011;2011:1-13.

26

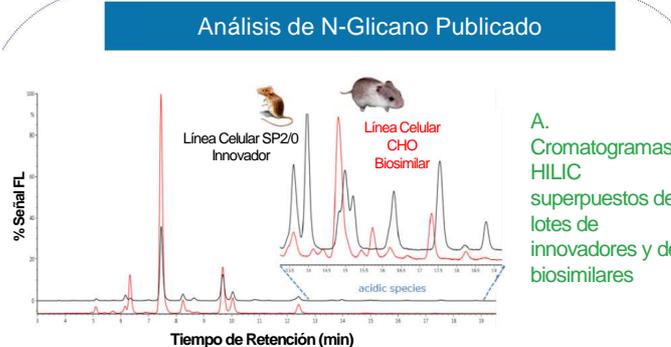
7. Estructura vs Función/Inmunogenicidad de un AcM

□ Glicosilación: una modificación postraduccionales heterogénea compleja de proteínas

Dependiendo del huésped de expresión, la composición y patrones de glicosilación o glicofomas en un anticuerpo monoclonal o fusiones-Fc pueden ser significativamente diferentes. Esto puede tener **impactos significativos sobre la farmacocinética y/o farmacodinámica de los anticuerpos monoclonales, resultado en alteraciones potenciales en los perfiles de eficacia y seguridad.**

(ref.: Liu L, *Glicosilación de Anticuerpo y su Impacto en la Farmacocinética y Farmacodinámica de Anticuerpos Monoclonales y Proteínas de Fusión-Fc.* 2015)

Implementación de un sistema integrado LC/UV/MS para evaluar la comparabilidad estructural de Infliximab innovador y biosimilar (Henry Shion et al, Waters Corporation, 2014 WCBP Symposium poster)



27

7. Estructura vs Función/Inmunogenicidad de un AcM

- Resumen de (potenciales) impactos claves de la Glicosilación sobre la Farmacocinética y Farmacodinámica de las proteínas de fusión-Fc

Glicano	Impactos
Manosa	<ul style="list-style-type: none"> Incrementa la eliminación de AcM (anticuerpo monoclonal) Mejora la unión FcR3/ADCC de AcM Reduce la unión C1q /CDC de AcM
Fucosa	<ul style="list-style-type: none"> Interfiere con la unión a FcR3 La defucosilación mejora la unión de FcR3/actividad de ADCC
Galactosa	<ul style="list-style-type: none"> La galactosa expuesta puede incrementar la eliminación de AcM Mejora la CDC de AcM
GlcNAc	<ul style="list-style-type: none"> La bisección de GlcNAc mejora la unión de FcR3/ADCC Incrementa la eliminación de proteínas de fusión-Fc
Ácido Siálico NANA	<ul style="list-style-type: none"> Crítico para reducir la eliminación de proteínas de fusión-Fc Actividad Antiinflamatoria
Ácido Siálico NGNA	<ul style="list-style-type: none"> Interfiere con la unión de FcR3 reduce la actividad de ADCC de AcM Puede ser inmunogénico en seres humanos
Gal α 1-3Gal β 1-GlcNAc-R	<ul style="list-style-type: none"> Inmunogénico en seres humanos y puede inducir a anafilaxis

(ref.....: Liu L, *Glicosilación de Anticuerpo y su Impacto en la Farmacocinética y Farmacodinámica de Anticuerpos Monoclonales y Proteínas de Fusión-Fc*, 2015)

28

8. Atributos de Calidad (QAs)

- El perfil del producto objetivo de calidad (QTPP) de un biosimilar debe basarse en los datos recopilados sobre el medicamento de referencia elegido, incluida la información públicamente disponible y los datos obtenidos de la caracterización exhaustiva del medicamento de referencia. (ref.....: EMA, EMA, *Directrices sobre medicamentos biológicos similares que contienen como sustancia activa proteínas derivadas de biotecnología: cuestiones de calidad*, 2014)
- Deben realizarse suficientes estudios de caracterización físico-química y funcional para establecer los atributos relevantes de calidad incluyendo aquellos que definen la identidad, cantidad, seguridad, pureza y potencia de un producto. (ref.....: FDA de EE.UU., *Guía, Consideraciones de Calidad en la Demostración de Biosimilitud de un Producto Proteínico Terapéutico respecto a un Producto de Referencia*, 2015)

29

8. Atributos de Calidad (QAs)

- Es importante identificar las **correlaciones potenciales entre los QAs** (o métodos ortogonales) es para evaluar la relevancia clínica.
ej.) %Afucosilación ⇒ Unión FcrRIIIa ⇒ ADCC ⇒ Relevancia Clínica
- Para algunos QAs debe considerarse la antigüedad de los diferentes lotes del producto de referencia.
ex) Variantes de tamaño y carga: con el paso del tiempo pueden cambiar las condiciones de almacenamiento recomendadas ⇒ se pueden analizar los datos trazando la gráfica en función de la antigüedad estimada del material en el momento de la prueba.
- Diferencias aceptables y atributos de calidad afectadas**
 - a) Sistema de expresión: puede dar lugar a consecuencias indeseadas, como un patrón atípico de glicosilación, una mayor variabilidad o un perfil diferente de impurezas, en comparación con los del medicamento de referencia.
 - b) Formulación: nivel de pureza/impureza, perfil de estabilidad, etc.....
 - c) Sistema de cierre de envase: perfil de compatibilidad, perfil de estabilidad, etc.....

(Véase también Apéndice I, 'B. Diferencias de Producción de Líneas Celulares' y 'C. Diferencias de Formulación')

30

8. Atributos de Calidad (QAs)

- Impurezas relacionadas al proceso (p.ej. Proteína de la célula huésped, ADN)
 - a) específicas a un proceso individual
 - b) es preferible depender del proceso de purificación para eliminar las impurezas. Las diferencias que podrían conferir una ventaja de seguridad (p.ej. menores niveles de impurezas) deben ser explicados. *(ref.....: EMA, Directrices sobre medicamentos biológicos similares, 2014)*
- Se debe prestar especial atención a los atributos de calidad que pueden tener impacto en la inmunogenicidad o potencia, o que no hayan sido identificados en el medicamento de referencia. *(ref.....: EMA, Directrices sobre medicamentos biológicos similares que contienen como sustancia activa proteínas derivadas de biotecnología: cuestiones de calidad, 2014)*

31

8. Atributos de Calidad (QAs)

- Atributos de Calidad de un Anticuerpo Monoclonal (Ejemplos)
 - a) Estructura primaria (secuencia de aminoácido, secuencia de N/C-terminal, peso molecular, perfil de mapeo peptídico, estructura de uniones de disulfuro, etc.....)
 - b) Estructuras de orden superior (estructura secundaria, terciaria y cuaternaria)
 - c) Modificaciones postraduccionales adicionales (Oxidación, Desamidación, Glicación, etc.....)
 - d) Variantes de carga (valor pI, perfiles cualitativo y cuantitativo de especies ácidas/principales/básicas)
 - e) Variantes de tamaño (perfiles cualitativa y cuantitativa de especies de peso molecular Alto/Bajo, agregados, partículas sub-visibles, etc.....)
 - f) Perfil de Glicosilación (perfil de glicosilación, perfil específico al sitio, ocupación del sitio, etc.....)

32

8. Atributos de Calidad (QAs)

- Atributos de Calidad de un Anticuerpo Monoclonal (Ejemplos)
 - g) Resistencia/contenido (concentración/cantidad de proteína, volumen en el recipiente)
 - h) Potencia (unión objetivo, exploración de mecanismo de acción)
 - i) Impurezas relacionadas al proceso (proteína de célula huésped, ADN de célula huésped, etc.....)
 - j) Formulación (pH, contenido de excipiente, etc.....)
 - k) Perfiles de Degradación/Estabilidad

33

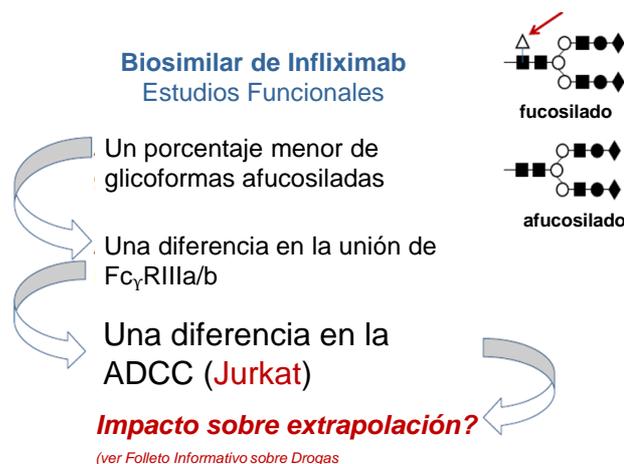
9. Evaluación de Atributos Críticos de Calidad

- Identificación de Atributos Críticos de Calidad (CQAs):** Considerando el impacto sobre el **desempeño clínico** y el **grado de incertidumbre** de cada atributo de calidad,
 - a) utilizado para dirigir el producto y el desarrollo del proceso;
 - b) debe considerarse la determinación de similitud en la calidad y en el impacto sobre la extrapolación de indicaciones;
 - c) debe considerarse el diseño de estrategia de control de calidad y del proceso de manufacturación.
- Impacto clínico potencial de los atributos de calidad**
 - a) eficacia
 - b) farmacocinética
 - c) inmunogenicidad (que sigue siendo la causa principal de los estudios clínicos)
 - d) seguridad/toxicidad: toxicidad farmacológica (actividades biológicas) & toxicidad fuera del objetivo (poco frecuente con los productos biológicos ya que son altamente específicos para su objetivo)
- Grado de incertidumbre:** el nivel de atributo presente, la posibilidad de desviación y la sensibilidad del ensayo.

34

9. Evaluación de Atributos Críticos de Calidad

- Eficacia: Ejemplo - Afucosilación y Citotoxicidad mediada por Célula Dependiente de Anticuerpo (ADCC)**



35

9. Evaluación de Atributos Críticos de Calidad

- QAs que afectan la inmunogenicidad** (ref.....: *Respaldo la biosimilitud y extrapolación, GABI, Vol. 4, 2015*)

Tabla 1. Inmunogenicidad: los atributos críticos son bien conocidos

Atributo (ejemplo)	Comentario/métodos analíticos (ejemplos)
Secuencia de aminoácido	Debe ser idéntico/mapas peptídico ortogonal con alta resolución de MS y secuenciación M S/MS
Agregados	Factor Crítico/SEC, FFF, MALLS, DLS, AUC, métodos de imagen, caracterización de partículas
Plegados, Puentes disulfuro, Cisteínas libres	Espectroscopía CD, Intercambio H-D, FT-IR, Rayos X, 1D y 2D RMN, mapeo peptídico
Degradación	Productos de degradación que no ocurre en el cuerpo potencialmente inmunogénico/ RP-HPLC, CEX, Papaína-HIC, Papaína-IEX, mapa peptídico, MS
Proteínas de célula huésped	Efecto adyuvante o formación compleja/ELISA, espectrometría de masa
Lixiviables/Extraíbles	Efecto adyuvante o efecto en plegado/agregación; HPLC con detectores altamente sensibles, espectrometría de masa
Glicosilación: Galactosa- α 1,3-Galactosa	Reportado para pacientes con cetuximab pre-sensibilizados solo por picaduras de garrapatas/ NP-HPLC de glicanos marcados con 2AB acoplados a ESI-MS, digestión de exoglicosidasa, MALDI TOF/TOF, CGE, mapa peptídico
Glicosilación: N-glicolil-ácido neuramínico (NGNA)	NP-HPLC, WAX, HPAEC, RP-HPLC después de marcado con DMB, espectrometría de masa

La evaluación de inmunogenicidad sigue siendo la razón principal de los estudios clínicos

36

9. Evaluación de Atributos Críticos de Calidad

- Atributos de calidad que afecta la Farmacocinética (ADME)** (ref.....: *Respaldo la biosimilitud y extrapolación, GABI Journal, vol. 4 (4), 2015*)

Tabla 2. Farmacocinética: los atributos críticos para la absorción, distribución, metabolismo y excreción son bien conocidos

Atributo (ejemplo)	Comentario/métodos analíticos (ejemplos)
Secuencia de aminoácido	Debe ser idéntico/mapas peptídico ortogonal con alta resolución de MS y secuenciación MS/MS
Plegados, Puentes disulfuro, Cisteínas libres	El mal plegamiento conduce a una eliminación más rápida/ espectroscopía CD, Intercambio H-D, FT-IR, Rayos X, 1D y 2D RMN, mapeo peptídico
Oxidación (metionina)	Puede reducir la unión a FcRn y por ende, conducir a incremento de exposición/ RP-HPLC, Papaína-HIC, mapa peptídico, espectrometría de masa
Degradación	El producto de degradación es eliminado rápidamente/RP-HPLC, C EX, Papaína-HIC, Papaína-IEX, mapa peptídico, MS
Glicosilación: Sialilación	Reducción de eliminación mediante receptores de asialoglicoproteína hepática, aumento de la estabilidad proteolítica; sin mayor impacto para anticuerpos monoclonales/NP-HPLC, WAX, HPAEC, RP-HPLC después de marcado con DMB, espectrometría de masa

37

9. Evaluación de Atributos Críticos de Calidad

Ejemplo (ref.....):

https://www.parexel.com/files/3114/3385/6985/Quality_Data_for_Demonstrating_Biosimilarity_Article.pdf

ATRIBUTO	CONSIDERACIONES CLAVES DE SIMILITUD
Relacionado al Producto	Porcentaje de contenido de proteína, pH, osmolaridad, composición cualitativa y cuantitativa de excipientes claves
Estructura de Sustancia Activa	La estructura primaria debe coincidir con el producto de referencia, las diferencias en la estructura de orden superior (plegamiento) en teoría pueden afectar la farmacocinética, la eficacia, la inmunogenicidad y la seguridad; y cualquier diferencia tendrá que justificarse de forma sólida ya que tendrá poco o ningún impacto
Isoformas de Sustancia Activa	Las diferencias en la distribución de isoformas, tales como las variantes de la cadena lateral, la glicosilación y el truncamiento o modificación en la terminal N o C, deben estar sólidamente justificadas; se supone que las diferencias son significativas hasta que se demuestre lo contrario
Impurezas	Las impurezas relacionadas con el proceso (proteínas de células huéspedes, trazas de solventes y lixiviables) pueden no afectar la actividad biológica, pero pueden afectar negativamente el perfil de inmunogenicidad; las impurezas relacionadas con el producto, según el porcentaje de contenido, el nivel de actividad y el potencial de actividad indeseable/inmunogenicidad, tienen un impacto variable, desde muy bajo a muy alto
Actividad Biológica	Potencia, unión al receptor y, para Anticuerpos Monoclonales, ambos, objetivo (antígeno) y unión a Fc

■ = Siempre a muy alta criticidad

■ = Por lo menos de alta criticidad

■ = Criticidad variable

38

9. Evaluación de Atributos Críticos de Calidad

Ejemplo: Zarxio™ (ref: Documento Informativo del Comité Consultivo de la FDA, 2015)

Tabla 5 – Criticidad de los atributos de calidad y su impacto en los parámetros clínicos

Atributo de calidad	Criticidad	Relevante para	Métodos Utilizados
Secuencia de Aminoácido	Muy Alto	Eficacia, Seguridad, Inmunogenicidad	Edman, mapeo peptídico, MS
Potencia	Muy Alto	Eficacia Seguridad	Bioensayo
Unión Objetivo	Muy Alto	Eficacia Seguridad	Resonancia de plasmones superficiales
Concentración de Proteína	Muy Alto	Eficacia	Determinación de Contenido
Partículas sub-visibles	Alto	Inmunogenicidad	Oscurecimiento de luz
Variantes Oxidados	Alto	Eficacia	Cromatografía en fase reversa
Estructura de orden superior	Alto	Eficacia Inmunogenicidad	Espectrografía a CD y RMN
Variantes/agregados de alto peso molecular	Alto	Inmunogenicidad	Cromatografía de exclusión por tamaño
Variantes Truncados	Bajo	Ninguno	Cromatografía en fase reversa acoplado con MS
Norleucina	Muy Bajo	Ninguno	Cromatografía en fase reversa
Desamidación	Muy Bajo	Ninguno	Cromatografía de intercambio iónico

39

10. Selección e Idoneidad de los Métodos Analíticos

- Los ensayos deben proporcionar resultados significativos (Relevancia) y Confiables.

Selección de Métodos

- a) basado en la naturaleza del AcM y el conocimiento sobre la estructura y heterogeneidad del producto de referencia y el producto biosimilar, incluidas aquellas características críticas para el desempeño del producto, que sea capaz de:
- dilucidar y comparar los Atributos de Calidad;
 - evaluar todos los (potenciales) MOAs (modos de acción), la relación estructura-función y la relevancia clínica;
 - evaluar los perfiles de Degradación/Estabilidad;
 - evaluar las variaciones de Lote a Lote.
- b) Deben usarse tecnologías más avanzadas de vanguardia.
- c) Deben usarse métodos ortogonales.
- Los métodos utilizados deben separar y analizar las diferentes variantes del producto en función de las diferentes propiedades químicas, físicas y biológicas subyacentes de las moléculas de proteínas. (ref.....: OMS, *Directrices sobre Evaluación de Productos Bioterapéuticos Similares (SBPs)*, 2009)

40

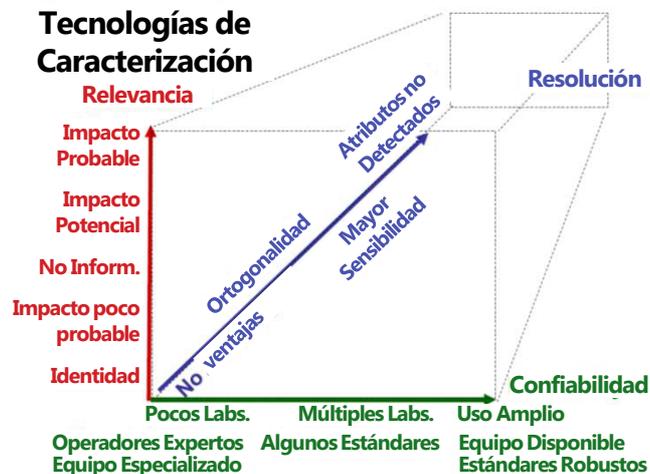
10. Selección e Idoneidad de los Métodos Analíticos

Idoneidad de los Métodos

- a) La capacidad del método analítico afecta a la evaluación de similitud. (ref.....: OMS, *Directrices sobre Evaluación de Productos Bioterapéuticos Similares (SBPs)*, 2009)
- ⇒ Debe ser capaz de discernir las potenciales diferencias estructurales y funcionales siempre que sea posible.
 - ⇒ A la hora de determinar la similitud debe aplicarse el conocimiento de las limitaciones de cada técnica utilizada para caracterizar el producto (p.ej. límites de sensibilidad, poder de Resolución).
- b) Adecuadamente cualificado para el uso previsto
- ⇒ Sensibilidad, Resolución, Precisión Intermedia aceptable, etc.....
 - ⇒ La manipulación de muestra previo a análisis o las condiciones de análisis pueden afectar los resultados. (p.ej.: Concentrar la muestra puede afectar a las propiedades de la proteína que conducen a la homodimerización)

41

10. Selección e Idoneidad de los Métodos Analíticos



(ref: Kozlowski, S (CDER), Cumbre de Tecnología de Biomanufactura, Rockville, MD, 13 de Junio, 2014)

42

11. Atributos de Calidad vs Métodos Analíticos

Estudios de Caracterización

Atributos	Efecto Potencial	Ejemplos de Métodos Analíticos
1. Estructura Primaria		
Secuencia de Aminoácido	- Caracterización básica de todos los efectos - Debe ser idéntico al producto de referencia	Mapeo Peptídico R con UV y detección MS, secuenciamiento MS/MS (HPLC-ESI-MS)
Variantes de Terminales (Lisina C-terminal, piroglutamato N-terminal)	- Heterogeneidad - Lisina C-terminal: Generalmente no afecta - Piroglutamato N-terminal: No afecta la función biológica pero puede tener influencia en la farmacocinética- Tiene impacto sobre los perfiles de Mw y carga	Mapeo peptídico con MS y Secuenciamiento MS/MS
Peso Molecular	- Heterogeneidad debido a Modificación Postraduccional y modo de terminal	Mapeo peptídico con MS y Secuenciamiento MS/MS (Intacta, Reducida y Desglicosilada)
Unión de disulfuro	-La unión de disulfuro es el contribuidor clave para la conformación de la estructura	Mapeo peptídico R/NR RP-HPLC-ESI-MS Ensayo de Ellman (tiol libre)

(ref: Schiestle M, Taller de Trabajo en Bioterapéuticas AHC 2015 con modificación de KIM JA)

43

11. Atributos de Calidad vs Métodos Analíticos

Atributos	Efecto Potencial	Ejemplos de Métodos Analíticos
2. Modificación Postraduccional		
Desamidación Isomerización Oxidación Glicación	<ul style="list-style-type: none"> - Puede afectar a las funciones biológicas o a la inmunogenicidad (Desamidación, Oxidación) - Puede ser inmunogénico (IsoAsp, etc.....) - Puede afectar el perfil de estabilidad - Afecta el perfil de carga, perfil de glicano... 	Cromatografía de intercambio iónico (CEX, IEX) Cromatografía de afinidad de boronato HI-HPLC Mapeo peptídico con MS y MS/MS (HPLC-ESI-MS)
3. Estructura de orden Superior		
Estructura de orden Superior	<ul style="list-style-type: none"> - Plegado vinculado a la conformación de la estructura - Afecta la unión a objetivos, función biológica 	Lejano/cercano-UV CD, FT-IR, intercambio de deuterio de hidrógeno (HDX)-MS, DSC 1D/2D NMR, Cristalografía de Rayos X

(ref: Schiestle M, Taller de Trabajo en Bioterapéuticas AHC 2015 con modificación de KIM JA)

44

11. Atributos de Calidad vs Métodos Analíticos

Atributos	Efecto Potencial	Ejemplos de Métodos Analíticos
4. Glicosilación		
Fucosilación Manosa X	<ul style="list-style-type: none"> - En algunos casos, las variantes afucosiladas conducen a una ADCC más alta - En algunos casos, las variantes de Manosa X conducen a una ADCC más alta 	Digestión de Exoglicosidasa marcada con 2AB-NP HPLC/UPLC y MS HILIC ESI-MS MALDI TOF-MS
Manosa alta	<ul style="list-style-type: none"> - Puede incrementar el aclaramiento del suero y afectar en el área de Farmacocinética bajo la curva (AUC) - Potencialmente inmunogénica 	
Galactosilación	<ul style="list-style-type: none"> - En algunos casos, una mayor galactosilación puede conducir a una mayor CDC 	CE-SDS Mapeo peptídico (UPLC y MS)
Galactosa- α -1,3-galactosa	<ul style="list-style-type: none"> - Potencialmente inmunogénica (especialmente en la región Fab: hipersensibilidad Tipo I) 	*Glicano N-ligado: PNGaseF, etc.....
Sialilación	<ul style="list-style-type: none"> - En algunos casos, impacta sobre el perfil de Farmacocinética - Una mayor sialilación conduce a una menor ADCC - La sialilación en algunas fusión proteínica Fc(-cept) puede afectar a la actividad biológica - En la forma de Ácido N-glixoilneuramínico (NGNA) es potencialmente inmunogénica 	NP-HPLC Cromatografía de intercambio de Aniones Débiles Cromatografía DMB marcada con RP-HPLC y MS

(ref: Schiestle M, Taller de Trabajo en Bioterapéuticas AHC 2015 con modificación de KIM JA)

45

11. Atributos de Calidad vs Métodos Analíticos

Atributos	Efecto Potencial	Ejemplos de Métodos Analíticos
5. Variantes		
Variantes de tamaño	<ul style="list-style-type: none"> - La forma agregada (y/o HMWS) puede tener menor actividad biológica y también puede ser inmunogénica - Los fragmentos/escisión pueden tener menos actividad biológica - Pueden tener impacto en el perfil de estabilidad 	R/NR SDS-PAGE, CE-SDS SEC FFF MALLS DLS AUC Caracterización de partícula (HIAC, MFI)
Variantes de carga	<ul style="list-style-type: none"> - Surge de la PTM o procesamiento incompleto de las Lisinas de C-terminal - Generalmente no afecta a la actividad biológica pero algunas variantes de carga en una región crítica puede influir en la actividad biológica 	Cromatografía de intercambio Catiónico (CEX, IEX), Gel & Electroforesis capilar (IEF, icIEF) *Utilizando Carboxipeptidasa B
Hidrofobicidad	- Influenciado por la agregación	RPC, HIC
6. Impureza relacionada al proceso		
Proteínas de célula huésped	<ul style="list-style-type: none"> - Efecto adyuvante o formación de complejo - Puede ser inmunogénico (puede tener un impacto adverso sobre la Seguridad) 	ELISA, Electroforesis 2-D, LC-MS
ADN de célula huésped	- Puede tener un impacto adverso sobre la Seguridad	Q-PCR

(ref: Schiestle M, Taller de Trabajo en Bioterapéuticas AHC 2015 con modificación de KIM JA)

46

11. Atributos de Calidad vs Métodos Analíticos

Atributos	Elemento Estructural	Ejemplos de Métodos Analíticos
7. Función Biológica		
Unión al blanco	Fab	ELISA, SPR, FRET Ensayo de unión en base a células
Muerte celular programada, Ensayo de Neutralización	Fab	Ensayo de apoptosis en base a células Ensayo de gen reportero
Función efector-Fc	Fc : Unión FcγR	SPR, FRET, Alphascreen Ensayo de unión en base a células
	Fc : Unión C1q	SPR, ELISA
	Fab & Fc ; ADCC, CDC	Ensayo de ADCC en base a células, Ensayo de CDC en base a células
Farmacocinética	Fc : Unión FcRn	SPR, Alphascreen

(Véase también Apéndice I, 'F. CCDA : Sistema fisiológico & Sistema desmesurado' y 'H. Alotipo de Receptores Fc-gamma')

(ref: Schiestle M, Taller de Trabajo en Bioterapéuticas AHC 2015 con modificación de KIM JA)

47

11. Atributos de Calidad vs Métodos Analíticos

Atributos	Elemento Estructural	Ejemplos de Métodos Analíticos
8. Propiedades Generales		
Contenido de proteína	- Acorde al diseño farmacéutico (resistencia)	UV 280, HPLC
Coefficientes de extinción	- Una propiedad intrínseca del producto - No se espera que haya variación de lote a lote	Análisis de Aminoácido
Volumen, apariencia, etc.....	Acorde al diseño farmacéutico (resistencia, etc.....)	Volumen en envase

(ref: Schiestle M, Taller de Trabajo en Bioterapéuticas AHC 2015 con modificación de KIM JA)

48

11. Atributos de Calidad vs Métodos Analíticos

Estudios de Degradación Forzada

Atributos	Efecto Potencial	Ejemplos de Métodos Analíticos
Temperatura Alta	- Desnaturalización, agregación, fragmentación	CQA y/o ítems indicadores de Estabilidad
Luz (Fotoestabilidad)	- Desnaturalización, agregación, fragmentación	CQA y/o ítems indicadores de Estabilidad
pH Bajo	- Desnaturalización, agregación, fragmentación	CQA y/o ítems indicadores de Estabilidad
pH Alto	- Desamidación (Usualmente, residuos de Lisina), etc.....	CQA y/o ítems indicadores de Estabilidad, Mapeo peptídico con MS y Secuenciación MS/MS (ID de residuos desamidados)
H ₂ O ₂	- Oxidación (Usualmente, residuos de Metionina) - Puede afectar la Farmacocinética (Según la región de los sitios oxidados)	CQA y/o ítems indicadores de Estabilidad, Mapeo peptídico con MS y Secuenciación MS/MS (ID de residuos oxidados)
Adición de catalizadores de iones metálicos (Fe ²⁺ ó Cu ²⁺ etc.....)	- Puede ser relevante en procesos de formulación y manufacturación, entre otros. - Puede conducir a la oxidación	CQA y/o ítems indicadores de Estabilidad

(ref: Schiestle M, Taller de Trabajo en Bioterapéuticos AHC 2015 con modificación de KIM JA)

49

12. Evaluación de Comparabilidad Analítica

- Consideraciones para un programa de comparabilidad analítica
 - a) Conocimiento acumulado de los productos de referencia del mercado ayudan a entender el rango y la variabilidad del proceso innovador de manufacturación.
 - b) Estudios Comprehensivos de Comparabilidad Analítica
 - **Estudios de Caracterización Extensiva y de Degradación Forzada**
 - c) Debe describirse con claridad el fundamento de la evaluación de similitud analítica.
 - Atributos de calidad conocidos y características de desempeño del PR (*FDA de EE.UU., Guía, Consideraciones de Calidad en la Demostración de Biosimilitud de un Producto Proteínico Terapéutico respecto a un Producto de Referencia, 2015*)
 - d) Debe tenerse en cuenta la antigüedad de la muestra al momento de la ejecución de prueba como un factor en la comparación de los atributos indicadores de estabilidad.
 - e) **Las diferencias analíticas** deben ser caracterizadas mediante métodos ortogonales, **no deben tener impacto clínico significativo sobre la seguridad y la eficacia** de los biosimilares.

50

12. Evaluación de Comparabilidad Analítica

- Requisitos que debe reunir un lote a ser analizado
 - a) Las evaluaciones de Similitud deben ser ejecutados sobre **lotes de biosimilares a ser comercializados**.
 - b) **predominantemente analizado en lotes de Producto Farmacéutico (DP)**, pero algunos parámetros pueden ser analizados en lotes de Sustancia Farmacéutica(DS) (los lotes de DS deben ser apropiadamente representativos para los lotes de DP).
 - atributos de calidad específicas a Producto Farmacéutico: concentración de proteína, volumen, partículas subvisibles y productos de estabilidad/degradación
 - atributos de calidad específicas a Sustancia Farmacéutica: perfil de glicosilación, ADCC, CDC, etc.....
 - c) En los elementos del producto a ser comercializado se incluyen:
 - Escala representativa
 - Operaciones de igual unidad y la misma materia prima crítica para los lotes no clínicos, clínicos y comerciales.

51

12. Evaluación de Comparabilidad Analítica

Estudios de Caracterización Extensiva

(Estudios de caracterización estructural, físico-química, biológica)

a) Comparado con el Producto de Referencia

- Caracterización **lado a lado**: minimiza la interferencia de interpretación de los resultados

⇒ especialmente importante para los métodos analíticos que no tienen una 'precisión intermedia' alta o para ensayos donde los estándares internos deben ser probados simultáneamente, etc.....

- **Comparación de datos independientes** de múltiples ensayos **en forma colectiva**

⇒ especialmente importante métodos que tienen 'precisión intermedia' más alta

b) Uso de técnicas vanguardista/ortogonal

c) **Evaluar Todos los (potenciales) Modos de Acción (MOAs)**

(Véase también Apéndice I, 'D. Ejemplo de Evaluación de Comparabilidad Analítica')

52

12. Evaluación de Comparabilidad Analítica

Estudios de Degradación Forzada

a) Bajo condiciones de tensión definida, los **perfiles de degradación/estabilidad deben ser similares**. (p.ej. secuencia de degradación similar, no nuevos degradantes...)

b) Es importante establecer apropiadamente las diversas condiciones de degradación y seleccionar los métodos analíticos para monitorear los CQA afectados.

c) Considerar las antigüedades de los productos Biosimilar de Referencia.

(Véase también Apéndice I, 'D. Ejemplo de Evaluación de Comparabilidad Analítica')

53

12. Evaluación de Comparabilidad Analítica

Criterio de Aceptación de Similitud

- a) Deben proporcionarse el criterio de aceptación de similitud y sus justificaciones.
- b) Los **Rangos Cuantitativos** deben estar primariamente basados los rangos medidos de los atributos de calidad del producto de referencia y **no deben ser superiores al rango de variabilidad** de los lotes representativos del producto de referencia, **a menos que se justifique lo contrario**.
- según la cantidad de lotes de producto de referencia sometidas a prueba, se deben tener en cuenta los atributos de calidad investigados, la antigüedad de los lotes al momento de ejecución de prueba y el método utilizado. (ref.....: EMA, Directrices sobre medicamentos biológicos similares que contienen como sustancia activa proteínas derivadas de biotecnología: cuestiones de calidad, 2014)
- c) La cantidad de lotes depende del tipo de ensayo y la variabilidad de lotes.
- d) Podría ser utilizado un **enfoque estadístico descriptivo** para establecer los rangos para los atributos de calidad, siempre que **se justifique apropiadamente**. (ref.....: EMA, Directrices sobre medicamentos biológicos similares que contienen como sustancia activa proteínas derivadas de biotecnología: cuestiones de calidad, 2014)

(véase también Apéndice I, 'E. Criterio de aceptación de similitud y Enfoques Estadísticos')

54

12. Evaluación de Comparabilidad Analítica

Soluciones Estadísticas Posibles

- a) Pros y Contras
- Ventaja: Proporciona una regla de decisión consistentes para todas las solicitudes de biosimilares
 - Desventaja/desafío: la prueba de equivalencia estadística para evaluación de biosimilitud analítica es un desafío por las limitaciones que presentan el tamaño de las muestras y la carencia de conocimiento científico sobre las márgenes de equivalencia.
- b) Debe justificarse debidamente el uso del enfoque estadístico.
- c) Ejemplo
- 2 ó 3 desviaciones estándar (promedio \pm 2SD ó 3SD), Intervalo de Tolerancia, prueba de Equivalencia
 - Enfoque de 3 niveles (Pensamiento actual de FDA' de EE.UU.; ref.....: Tsong Y, Foro de Estadías DIA/FDA 2015, etc.....)

(véase también Apéndice I, 'E. Criterio de aceptación de similitud y Enfoques Estadísticos')

55

12. Evaluación de Comparabilidad Analítica

- Los valores de atributo de calidad que se encuentren fuera o entre los rangos determinados para un atributo de calidad del medicamento de referencia debe ser justificado apropiadamente con respecto a su potencial impacto en la seguridad y eficacia.
- También debe tomarse nota de que no existen requerimientos regulatorios para la redemonstración de biosimilitud una vez que fue otorgada la Autorización de Comercialización.

(ref.....: EMA, Directrices sobre medicamentos biológicos similares que contienen como sustancia activa proteínas derivadas de biotecnología: cuestiones de calidad, 2014)

56

13. Evaluación de Incertidumbre Residual

- Resultados No Similares ('No idénticos', 'Diferentes', 'No equivalentes', etc.....)
 - a) Se necesitan más datos para demostrar que no hay efectos sobre la seguridad, pureza y potencia.
 - b) Justificaciones de las Diferencias
 - estudios adicionales (métodos ortogonales, lotes adicionales), literatura relevante, etc.....
 - c) Cuanto más comprehensivo y robusto sea el conjunto de datos habrá mayor reducción del grado de incertidumbre.

57

13. Evaluación de Incertidumbre Residual

- Entre los **Factores considerados en la evaluación de incertidumbre residual** deben incluirse: (ref.....: Lemery SJ et al.; Biosimilares: Aquí y Ahora, Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2016)
- qué atributos específicos fueron sometidos a prueba, entendiendo que es necesario evaluar las diferencias en cualquier atributo crítico de calidad;
 - el número de atributos sometidos a prueba (en un ejemplo teórico, una caracterización más extensiva con análisis de huellas dactilares podría reducir la incertidumbre);
 - el número de lotes probados tanto para el producto biosimilar propuesto como el producto de referencia; y
 - Qué diferencias, si las hubo, fueron observadas entre los productos y qué impactos podrían tener esas diferencia en la seguridad y eficacia

58

14. Comparabilidad Analítica e Impacto Potencial en la Extrapolación

- Para extrapolación, son especialmente importantes los elementos estructurales relevantes a la **inmunogenicidad** y a los **mecanismos de acción** en las diferentes indicaciones. (ref.....: Respaldo la biosimilitud y extrapolación, GABI Journal, vol. 4 (4), 2015)
- Potencial impacto clínico de los atributos de calidad
- Eficacia
 - Farmacocinética
 - inmunogenicidad (que continúa siendo la razón principal de estudios clínicos)
 - seguridad/toxicidad: toxicidad farmacológica (actividades biológicas) & toxicidad fuera de objetivo (raro en biológicos ya que éstos son altamente específicos a sus objetivos)
- La extrapolación de datos ya es un principio científico y regulatorio establecido que lleva muchos años de aplicación, por ejemplo, en el caso de cambios mayores en el proceso de manufactura de los biológicos originadores. (ref.....: Weise M et al., Biosimilares: la ciencia de la extrapolación, Blood 124, 3191-3196, 2014)
- Para mayor detalles sobre los principios de la extrapolación de indicaciones, consultar el Documento de Reflexión sobre la Extrapolación de Indicaciones en la Autorización de Productos Biosimilares. (ref.....: Documento de Reflexión de IRPF BWG, 2017)

59

15. Resumen

El paradigma similar-pero-no-idéntico

- a) La micro heterogeneidad no es exclusivo de los biosimilares; es una característica 'normal' de cualquier biológico. (ref.....: Schneider CK, *Biosimilares en reumatología: el viento del Cambio, Ann Rheum Dis* 72 (3), 315-318, 2013)
- b) El biosimilar resultante y el producto de referencia técnicamente puede que no sean técnicamente idénticos, porque los desarrolladores de biosimilares deben establecer sus propios procesos independientes de manufacturación. (ref.....: Weise M, *Biosimilares: la ciencia de la extrapolación, Blood* 124, 3191-3196, 2014)

Fundamento vs datos de respaldo para demostrar la Similitud

- a) Los datos analíticos comparativos proporcionan el fundamento para el programa de desarrollo de un biosimilar y puede influir en decisiones sobre el tipo y cantidad de animales y los datos clínicos necesarios para respaldar la demostración de biosimilitud.

60

15. Resumen

Comprendiendo los Atributos Críticos de Calidad (CQA)

- a) Un biosimilar debe ser altamente similar al producto de referencia en todos los atributos de calidad clínicamente relevantes, p. ej., los atributos del producto que pueden tener impacto en el desempeño clínico. (ref.....: OMS, *Directrices para Evaluación de Productos Bioterapéuticos Similares (PBS)*, 2009)
- b) Esto significa que todos los atributos críticos de calidad (p.ej. aquellos importantes para la función de la molécula) deben ser comparables. (ref.....: EMA, *Directrices sobre medicamentos biológicos similares que contienen como sustancia activa proteínas derivadas de biotecnología: cuestiones de calidad*, 2014)

Evaluación de comparabilidad analítica utilizando herramientas analíticas de vanguardia

- a) Debe llevarse a cabo una caracterización exhaustiva tanto del producto de referencia como el biosimilar utilizando técnicas bioquímicas, biofísicas y biológicas de máxima sofisticación. (ref.....: OMS, *Directrices para Evaluación de Productos Bioterapéuticos Similares (PBS)*, 2009)
- b) Las evaluaciones significativas dependen de las capacidades de los ensayos analíticos de vanguardia disponibles. (ref.....: FDA de EE.UU., *Guía, Consideraciones de Calidad en la Demostración de Biosimilitud de un Producto Proteínico Terapéutico respecto a un Producto de Referencia*, 2015)

61

15. Resumen

Potencial impacto sobre extrapolación

- a) Por lo tanto, se esperaría que un biosimilar con atributos de estructura, químicos, físicos y biológicos muy similares genere el mismo efecto farmacológico y, por lo tanto, los atributos de seguridad y eficacia sean muy similares a los del producto de referencia en todas las indicaciones clínicas.
(ref.....: *Gerrard TL etc....., Biosimilares: extrapolación de uso clínico para otras indicaciones, GABI Journal, 4(3), 2015*)

62

IV. Apéndice 1 – Información Adicional

Contenido

IV. Apéndice 1 : Información Adicional

A. Comprensión del Producto de Referencia -----	65
B. Diferencias de Producción de Líneas Celulares -----	73
C. Diferencias de Formulación -----	79
D. Ejemplo de Evaluación de Comparabilidad Analítica -----	81
E. Criterio de aceptación de similitud y Enfoques Estadísticos --	91
F. CCDA : Sistema fisiológico & Sistema desmesurado -----	96
G. CDC (Citotoxicidad Dependiente de Complemento) -----	98
H. Alotipo de Receptores Fc-gamma -----	99
I. Directrices Relevantes -----	102
J. Lista de Abreviaturas -----	105

A. Comprensión del Producto de Referencia

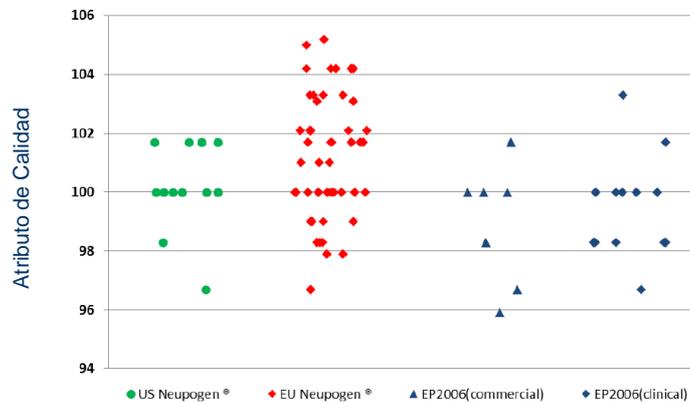
- Se debe utilizar un único producto de referencia como comparador en todo el programa de comparabilidad para estudios de calidad, seguridad y eficacia. (*ref.....: EMA, Directrices sobre medicamentos biológicos similares, 2014*)

- La mayoría de las reglamentaciones requieren necesariamente una demostración de similitud con un producto de referencia local aprobado en ese mercado.
 - a) Posibilidades de divergencia geográfica en los atributos de calidad del producto originador
 - Separación geográfica de la cadena de suministro (p.ej., Diferencia de sitios de manufacturación)
 - Separación de licencia, y luego desarrollo independiente
 - Aplicación secuencial de un cambio de proceso de manufacturación

A. Comprensión del Producto de Referencia

✓ ¿Variación Regional?

- Esto podría afectar la adecuación del rango de calidad de los productos de referencia y el QTPP (Perfil de Calidad del Producto Objetivo) del biosimilar



Referencia: Sandoz y presentaciones de FDA para la Reunión del Comité Consultivo de Oncología del 7 de enero de 2015

66

A. Comprensión del Producto de Referencia

Cambios en el perfil de calidad del Producto de Referencia

a) Tales eventos pueden ocurrir durante el desarrollo de un medicamento biosimilar y puede dar lugar a un desarrollo acorde a un QTPP que ya no sea plenamente representativo del medicamento de referencia disponible en el mercado.

(ref.....: EMA, Directrices sobre medicamentos biológicos similares—Cuestiones de calidad, 2014)

b) Los rangos identificados antes y después del cambio observado en el perfil de calidad normalmente podrían utilizarse para respaldar el ejercicio de comparabilidad biosimilar a nivel de calidad, ya que cualquiera de los rangos es representativo del medicamento de referencia.

(ref.....: EMA, Directrices sobre medicamentos biológicos similares—Cuestiones de calidad, 2014)

c) Los datos de los lotes anteriores y posteriores al cambio deben destacarse claramente y separarse en el dossier.

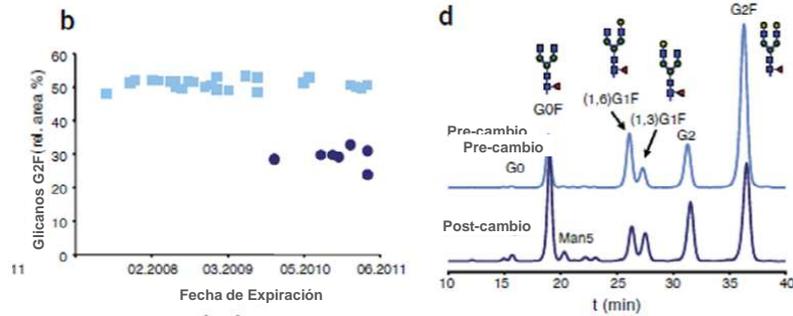
< ¡Variación de lote a lote y cambio de perfil de calidad al producto de referencia! >

67

A. Comprensión del Producto de Referencia

Ejemplo 1) Enbrel: Cambio en el perfil de glicosilación

- Post cambio: Descenso del N-glicano G2F casi en dos veces



Comparación de los diferentes lotes anteriores y posteriores al cambio de Enbrel

b) La cantidad relativa de glicanos G2F en los lotes anterior al cambio (n=25) y posterior al cambio (n=9) d) Cromatogramas de Mapeo glicánico a modo de ejemplo

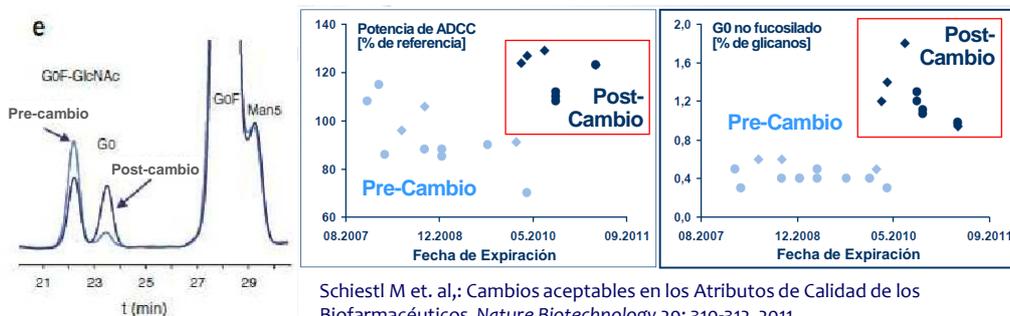
Schiestl M et. al.: Cambios aceptables en los Atributos de Calidad de los Biofarmacéuticos, Nature Biotechnology 29, 310-312 (2011)

68

A. Comprensión del Producto de Referencia

Ejemplo 2) Rituximab: Cambio en el perfil de glicosilación y actividad biológica

- Post-cambio: Abundancia de producto no fucosilado, aumentó en 3 veces la respuesta de ADCC



Schiestl M et. al.: Cambios aceptables en los Atributos de Calidad de los Biofarmacéuticos, Nature Biotechnology 29: 310-312, 2011

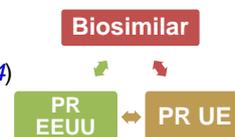
69

A. Comprensión del Producto de Referencia

Uso de un Producto de Referencia Extranjero

- a) Para facilitar el desarrollo global, es posible utilizar productos de referencia extranjeros demostrando la equivalencia de los productos de referencia local y extranjero.
- b) Condiciones para la elección del producto de referencia
 ⇒ Aprobación, abastecimiento, condiciones de estudio comparativo de país a país
- c) Como una cuestión científica, los datos comparativos deberán siempre incluir datos de estudios analíticos (p.ej., datos estructurales y funcionales) que compare los tres productos [el biosimilar procesado, el producto de referencia autorizada en el EEA (Área Económica Europea) y el comparador no autorizado en EEA], y puede también incluir datos Farmacocinéticos clínicos y/o estudios de enlace de Farmacodinámica de los tres productos.

(EMA, *Directrices sobre medicamentos biológicos similares*, 2014)



70

A. Comprensión del Producto de Referencia

Uso de un Producto de Referencia Extranjero

- d) Entre las cuestiones que un patrocinador puede necesitar resolver para la utilización de un producto de comparación no autorizado por los EE.UU. en un programa de desarrollo de biosimilar, están incluidos (pero no se limitan a) proporcionar el enlace científico entre el producto de comparación autorizado y el producto de referencia con licencia de EE.UU., incluida la caracterización fisicoquímica comparativa, ensayos biológicos/ensayos funcionales, perfiles de degradación en condiciones de tensión y Farmacocinética clínica comparativa y, cuando corresponda, datos de Farmacodinámica, para abordar el impacto de cualquier diferencia en la formulación o el envase primario sobre el desempeño del producto.

(ref: FDA de EE.UU., *Guía, Consideraciones de Calidad en la Demostración de Biosimilitud de un Producto Proteínico Terapéutico respecto a un Producto de Referencia*, 2015)

71

A. Comprensión del Producto de Referencia

✓ Ejemplo de CT-P13 (Remsima®/Inflectra®)

- a) El MFDS (Ministerio de Seguridad de Alimentos y Medicamentos de la República de Corea) ha recomendado:
- Demostrar la similitud analítica Comprehensiva entre CT-P13, Remicade con licencia en EE.UU y Remicade autorizada por la UE.
 - ⇒ CELLTRION: presentación de datos de enlace tridimensional
- b) La FDA de EE.UU. ha provisto las siguientes recomendaciones:
- Demostrar la similitud Farmacocinética entre CT-P13, Remicade con licencia en EE.UU y Remicade autorizada por la UE basada en las siguientes variables Farmacocinéticas: AUCinf, Cmax y AUClast.
 - Evaluar la seguridad e inmunogenicidad en el contexto de pacientes que se someten a una sola transición, de Remicade aprobado en EE.UU. a CT-P13 para proporcionar una comparación descriptiva con respecto a pacientes que continúan con Remicade aprobado en UE.
 - ⇒ CELLTRION: presentación de datos de enlace tridimensional y Estudio Farmacocinético clínico tridimensional.

72

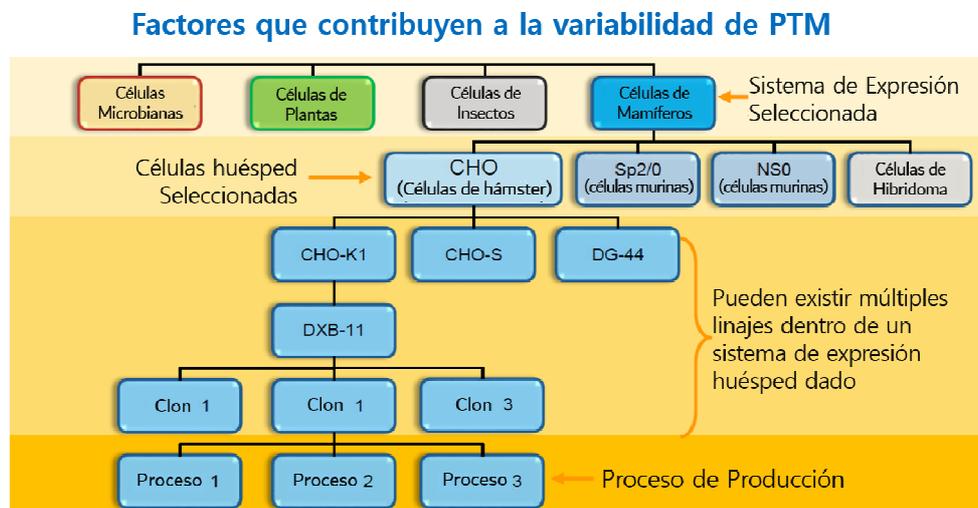
B. Diferencias de Producción de Líneas Celulares

* p.ej. Diferencia de Línea Celular Huésped y Sistema de Expresión

- Permite el uso de diferentes sistemas de expresión que proporcionan atributos de calidad similares y tienen un perfil de seguridad y eficacia igual o superior.
 - Puede dar lugar a varios tipos y grados de PTM (Modificación Post Traduccional), que pueden afectar la potencia y la inmunogenicidad.
- a) Los patrones de glicosilación pueden variar significativamente entre los tipos de células huésped.
- b) Especialmente los tipos glicanos no humanos pueden generar reacciones inmunogénicas
- ✓ Se han identificado dos diferencias críticas entre humanos y la mayoría de otros mamíferos: los seres humanos han perdido la capacidad de biosintetizar tanto el epítipo Gal • 1-3Galb1- (3) 4GlcNAc (alfa-Gal) terminal como un ácido siálico mamífero principal, N-glicolilneuramínico ácido (Neu5Gc), estructuras que están ampliamente presentes en las células de mamíferos no humanos (Padler-Karavani y Varki, 2011)
 - ✓ Los seres humanos normales tienen anticuerpos dirigidos contra estas estructuras
- c) Afectan los tipos y niveles de sustancias e impurezas relacionadas al proceso/ producto.
- Por lo tanto, para la elección del sistema de expresión del biosimilar se necesita una consideración cuidadosa, incluyendo el impacto sobre los efectos clínicos del producto de referencia.

73

B. Diferencias de Producción de Líneas Celulares



(Ref : Ramanan S, Taller de trabajo de Bioterapéuticos de AHC 2015)

74

B. Diferencias de Producción de Líneas Celulares

- ✓ Ejemplo (1): Cetuximab (Erbix®)
 - Anticuerpo monoclonal quimérico expresado en células de mieloma Sp2/0
 - Las líneas celulares murinas expresan Neu5Gc y alfa-Gal, similares a CHO y otras líneas celulares de mamíferos, pero a niveles considerablemente más altos. (*Muchmore EA et al, 1989*)
 - Por lo tanto, es más probable que las glicoproteínas terapéuticas producidas en la línea celular murina sean inmunogénicas.
 - Tanto Neu5Gc como alfa-Gal se han descrito como parte de un N-glicano adicional en el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo monoclonal. (*Qian J et al, 2007*)
 - Se ha demostrado que el epítipo alfa-Gal en Cetuximab induce anafilaxia en pacientes desencadenados por anticuerpos IgE anti-Gal preexistentes. (*Chung CH et al, 2008*)

75

B. Diferencias de Producción de Líneas Celulares

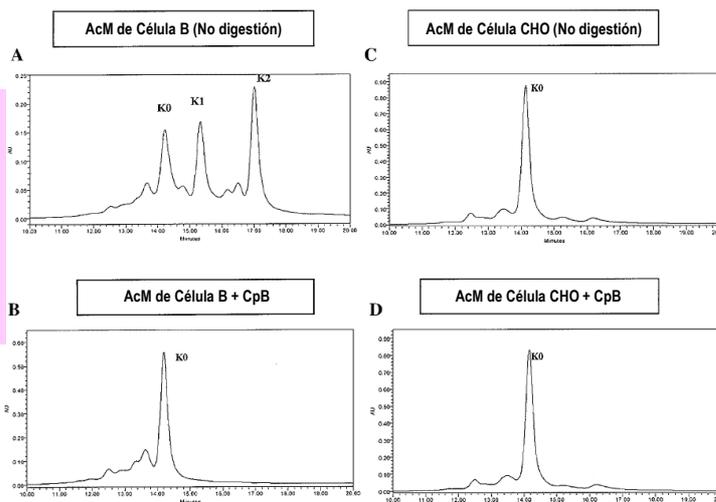
- ✓ Ejemplo (2): Producto de referencia de Sp2/0 ⇨ Biosimilar de CHO
 - Sistemas estrechamente relacionados pero, CHO tiene mejor historial de seguridad.
 - Las células CHO y Sp2/0 pueden mostrar las diferencias en las variantes de lisina C-terminal y el patrón de glicosilación, pero se ha informado que estas diferencias no tienen un impacto significativo en la eficacia, seguridad y farmacocinética.
 - Lisina C-terminal: menores niveles en CHO (*Dick LW et al, 2008*)
 - ⇨ La eliminación de la lisina carboxi-terminal de las cadenas pesadas se observa rutinariamente tras la caracterización de anticuerpos monoclonales y es causada por enzimas intracelulares.
 - ⇨ Desde un punto de vista normativo, este "clipaje de lisina" no se considera crítico, siempre y cuando exista un ensayo de potencia que pruebe la calidad del anticuerpo monoclonal. (*Bernhard A et al, 2007*)
 - Las líneas celulares murinas expresan tanto Neu5Gc como alfa-Gal, similares a CHO y otras líneas celulares de mamíferos, pero a niveles considerablemente más altos. (*Muchmore EA et al, 1989*)
 - ⇨ Por lo tanto, es más probable que las glicoproteínas terapéuticas producidas en la línea celular murina sean inmunogénicas.
 - Las líneas celulares murinas muestran una sialilación más alta en comparación con las células CHO. (*Byrne B et al, 2007; Yoo EM et al, 2002*)
 - ⇨ Puede tener o no impacto sobre la farmacocinética.

76

B. Diferencias de Producción de Líneas Celulares

Variantes de lisina C-terminal en anticuerpos monoclonales completamente humanos: investigación de métodos de prueba y posibles causas
(*Dick LW et al, 2008*)

*Célula B: línea celular de hibridoma murina



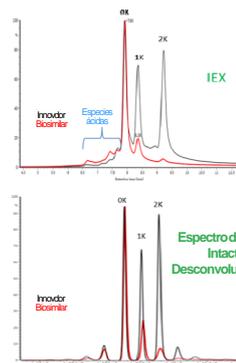
Cromatografía de intercambio iónico de (A) anticuerpo producido por células B; (B) anticuerpo producido por células B digerido con CpB; (C) anticuerpo producido por células CHO; y (D) anticuerpo producido por células CHO digerido con CpB.

77

B. Diferencias de Producción de Líneas Celulares

Implementación de un sistema integrado LC/UV/MS para evaluar la comparabilidad estructural de Infiximab innovador y biosimilar.
(Shion H et al, Waters Corporation, 2014 WCBP poster)

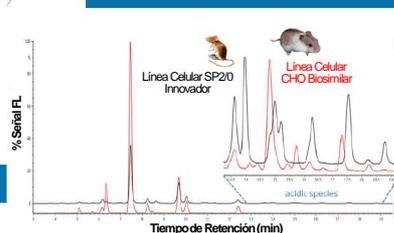
IEX Detecta Heterogeneidad de Carga



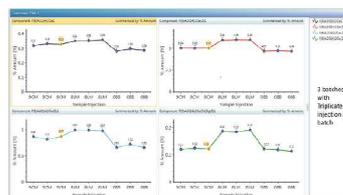
(A) Comparación de cromatografía de intercambio catiónico entre un lote de innovador y otro de biosimilar de IgG1 (Infiximab)

(B) Comparación de espectros de masas intactas desconvolucionadas de proteínas desglucosiladas de innovador y biosimilar. Las variantes de las lisinas están marcadas (OK, 1K, 2K)

Publicación de Análisis de N-Glicano



A. Superposición de cromatogramas HILIC de lotes de innovador y biosimilar



B. Glicanos con contenido de Alfa-Gal en lotes de innovador

A. Cromatograma HILIC superpuesto con detección de fluorescencia (arriba) para perfiles de N-glicanos marcados con 2-AB, que muestran diferencias significativas debido a las selecciones de la línea celular. B. Cuatro glicanos del lote del innovador tienen Alfa-gal. El % relativo de estos glicanos están ilustrados en el gráfico de líneas para tres lotes (y con inyecciones por triplicado). No se observaron Alfa-gal y NeoGc (no mostradas) en los lotes de candidatos a Biosimilares.

78

C. Diferencias de Formulación

- Un producto Biosimilar debe ser un producto farmacéuticamente aceptable y alcanzar la suficiente similitud al Producto de Referencia.
 - a) La formulación del biosimilar no necesariamente debe ser idéntica a la del producto de referencia, pero Necesita que el Perfil de Estabilidad coincida.
 - sin nuevas especies de degradación
 - con tendencia y niveles de especies de degradación similares bajo igualdad de condiciones
 - b) Analizar los datos de estabilidad y de impurezas al considerar los efectos de la evaluación de similitud.

✓ Independientemente de la formulación seleccionada, debe demostrarse la idoneidad de la formulación propuesta con respecto a la estabilidad, compatibilidad (es decir, interacción con excipientes, diluyentes y materiales de empaque), integridad, actividad y resistencia de la sustancia activa. Si se selecciona una formulación y/o un sistema de envase/cierre diferente al del producto de referencia (incluido cualquier material que esté en contacto con el medicamento), su impacto potencial sobre la eficacia y la seguridad del biosimilar debe estar debidamente justificado.

(ref.....: EMA, Directrices sobre medicamentos biológicos similares que contienen como sustancia activa proteínas derivadas de biotecnología: cuestiones de calidad, 2014)

79

C. Diferencias de Formulación

- Las diferencias de formulación y qué tipos de nuevas impurezas se forman pueden tener efectos enormes en el perfil de estabilidad.
- a) Muchos tipos de reacciones no enzimáticas ocurren espontáneamente y, en general, los índices se ven afectados por el pH y la temperatura (desamidación, oxidación, glicación, etc.....).
- b) Las impurezas que se forman, a menudo, dependen de la formulación y pueden verse afectadas por la concentración o la elección de excipientes/surfactantes (agregado, fragmento, proteínas desplegadas, etc.....).
- Para considerar los efectos de las diferencias de formulación, identificar los tipos de pruebas o datos sobre los que se deben enfocar para confirmar la similitud de estabilidad.
- a) Se deben observar las diferencias de mediciones de pureza/impureza que hayan entre los productos de Referencia y Biosimilar.
- b) Se deben considerar las condiciones apropiadas para estudios comparativos de degradación forzada. (Alta Temperatura, Iluminación, pH Bajo/Alto, Oxidación por H₂O₂ y/o iones metálicos, etc.....)

80

D. Ejemplo de Evaluación de Comparabilidad Analítica

(Métodos y Criterio de Aceptación)

(1) Estructura Primaria y Peso Molecular

Propiedades	Atributo	Método de Prueba	No. de Lotes (RP/Similar)	Criterio de Aceptación de Similitud	Resultado	Conclusión	Idoneidad de Método
Estructura Primaria	Composición de Aminoácido	Hidrólisis y HPLC	3/3	dentro de variabilidad de método	Similar	Aceptable	Cal (Lado a lado)
	Secuencia de Aminoácido	Mapeo peptídico por HPLC	3/6	Perfil idéntico a RBP	Idéntico	Aceptable	Cal (Lado a lado)
	Secuencia de Aminoácido	Secuenciación de Aminoácidos por LC-ESI-MS/MS	3/6	Idéntico a RBP	Idéntico	Aceptable	Cal (Lado a lado)
	Secuencia de N/C-terminal	Secuenciación de N/C-terminal Por mapeo peptídico (LC-MS), Degradación de Edman	3/6	Idéntico a RBP	Idéntico	Aceptable	Cal (Lado a lado)
	Masa Molecular	SDS-PAGE, MALDI-TOF, ESI-QTOF-MS	3/6	dentro de \pm X%(ppm) MW pronosticado O Idéntico a RBP	Similar	Aceptable	Cal (Lado a lado)

* Este ejemplo es virtual.

* Abreviaciones en idoneidad de método,

- Val: validación, Qual: Cualificación, Cal: calibración

81

D. Ejemplo de Evaluación de Comparabilidad Analítica							
(Métodos y Criterio de Aceptación)							
(2) Modificaciones Postraduccionales (PTMs)							
Propiedades	Atributo	Método de Prueba	No. de Lotes (RP/Similar)	Criterio de Aceptación de Similitud	Resultado	Conclusión	Idoneidad de Método
PTMs	Heterogeneidad de N/C-terminal	LC-MS	10/6	dentro de variabilidad de método	No Similar -Diferencia de nivel de Licinas C-terminal - Solo detectada la variante específica N-terminal en Biosimilar	Discusión Ortogonal (Perfil de carga, prueba funcional, etc.....), Lotes adicionales, Literatura ⇒ No hay impacto clínico ⇒ Aceptable	Cal (Lado a lado)
	Oxidación	LC-MS	10/6	Perfil idéntico a RBP	No Similar -Diferencia de nivel en algunos sitios	Discusión Ortogonal (Estudios de degradación forzada, prueba funcional, etc.....), Lotes adicionales, Literatura ⇒ No hay impacto clínico ⇒ Aceptable	Qual/Cal (Lado a lado)
	Desamidación	LC-MS	10/6	Idéntico a RBP	No Similar -Diferencia de nivel en algunos sitios	Discusión Ortogonal (Estudios de degradación forzada, prueba funcional, etc.....), Lotes adicionales, Literatura ⇒ No hay impacto clínico ⇒ Aceptable	Qual/Cal (Lado a lado)
	Glicación	LC-MS	10/6	Idéntico a RBP	Idéntico	Aceptable	Cal (Lado a lado)

82

D. Ejemplo de Evaluación de Comparabilidad Analítica							
(Métodos y Criterio de Aceptación)							
(3) Estructura de orden superior							
Propiedades	Atributo	Método de Prueba	No. de Lotes (RP/Similar)	Criterio de Aceptación de Similitud	Resultado	Conclusión	Idoneidad de Método
Estructura de Orden Superior	Estructura Secundaria	Absorción de UV	3/3	Perfil Similar	Similar	Aceptable	Cal/SST (Lado a lado)
	Estructura Secundaria/ Terciaria	UV CD Lejano/Cercano	3/3	Perfil Similar	Similar	Aceptable	Cal/SST (Lado a lado)
	Estructura Secundaria	FT-IR	3/3	Perfil Similar	Similar	Aceptable	Cal/SST (Lado a lado)
	Estructura Secundaria	DSC	3/3	Perfil Similar	Similar	Aceptable	Cal/SST (Lado a lado)
	Estructura Secundaria	HDX	3/3	Perfil Similar	Similar	Aceptable	Cal/SST (Lado a lado)
	Estructura de Enlace de Disulfuro	Mapeo peptídico/ LC-MS	3/6	Idéntico a RBP	Idéntico	Aceptable	Cal (Lado a lado)
	Tiol libre	Kit de ensayo de Tiol	3/6	Similar a RBP	No similar	Pero, muy bajo nivel en Biosimilar y Producto de Referencia) (< 1 mol/mol) Aceptable	Qual/Cal (Lado a lado)

83

D. Ejemplo de Evaluación de Comparabilidad Analítica							
(Métodos y Criterio de Aceptación)							
(4) Glicosilación							
Propiedades	Atributo	Método de Prueba	No. de Lotes (RP/Similar)	Criterio de Aceptación de Similitud	Resultado	Conclusión	Idoneidad de Método
Glicosilación	Sitio de glicosilación N-vinculado	LC-MS	3/6	Idéntico al sitio esperado	Idéntico	Aceptable	Cal (Lado a lado)
	Estructura de N-glicano	HPLC-MS, UPLC-MS	30/10	TI de T-lado, O Media \pm 3SD	Identificado, similar	Aceptable	Cal (Lado a lado)
	Perfil de N-glicano (%Afucosilado/ %G0F%G1F%G2F%Hi gh Man)	HPLC (2-AB), HILIC	30/10	TI de T-lado, O Media \pm 3SD	NO similar -diferente de áreas relativas de algunas especies de glicano	Discusión Ortogonal (Perfil de carga, prueba funcional, etc...), Lotes adicionales, Literatura \Rightarrow No hay impacto clínico \Rightarrow Aceptable	Val/Cual
	Ácido siálico	HPLC (DMB), LC-MS	30/10	TI de T-lado, O Media \pm 3SD	NO similar	Discusión Ortogonal (Perfil de carga, prueba funcional, etc...), Lotes adicionales, Literatura \Rightarrow No hay impacto clínico \Rightarrow Aceptable	Val/Cual

84

D. Ejemplo de Evaluación de Comparabilidad Analítica							
(Métodos y Criterio de Aceptación)							
(5) Heterogeneidad de Carga							
Propiedades	Atributo	Método de Prueba	No. de Lotes (RP/Similar)	Criterio de Aceptación de Similitud	Resultado	Conclusión	Idoneidad de Método
Heterogeneidad de Carga	Isoformas de Carga	IEF	30/10	Similar rango de pI, Similar patrón de banda	NO similar -diferencia de patrón de banda (cambio de carga básica o ácido, etc...)	Discusión Ortogonal (ID de pico, prueba funcional, etc...), Lotes adicionales, Literatura \Rightarrow No hay impacto clínico \Rightarrow Aceptable	Val
	Perfil de Carga (%ácido/ %principal/ %básico)	IEX, icIEF (con CpB)	30/10	TI de T-lado, O Media \pm 3SD	NO similar -diferencia de cantidad relativa de variantes de carga	Discusión Ortogonal (ID de pico, prueba funcional, etc...), Lotes adicionales, Literatura \Rightarrow No hay impacto clínico \Rightarrow Aceptable	Val
	Perfil de Carga (%ácido/ %principal/ %básico)	IEX, icIEF (sin CpB)	30/10	TI de T-lado, O Media \pm 3SD	NO similar -diferencia de cantidad relativa de variantes de carga	Discusión Ortogonal (ID de pico, prueba funcional, etc...), Lotes adicionales, Literatura \Rightarrow No hay impacto clínico \Rightarrow Aceptable	Val

85

D. Ejemplo de Evaluación de Comparabilidad Analítica

(Métodos y Criterio de Aceptación)

(6) Heterogeneidad de Tamaño

Propiedades	Atributo	Método de Prueba	No. de Lotes (RP/Similar)	Criterio de Aceptación de Similitud	Resultado	Conclusión	Idoneidad de Método
Heterogeneidad de Tamaño	Distribución de tamaño (% principal/%HM WS/%LMWS)	HPLC(SEC)	30/10	1 Perfil Similar TI de 2 T-lado , O Media \pm 3SD	NO similar -diferencia de cantidad relativa de isoformas menores	Discusión Ortogonal (ID de pico, prueba funcional, perfil de estabilidad, etc.), Lotes adicionales, Literatura \Rightarrow No hay impacto clínico \Rightarrow Aceptable	Val
	Distribución de tamaño (% principal/%HM WS/%LMWS)	CE-SDS(R/NR), SDS-PAGE(R/NR)	30/10	1 Perfil Similar TI de 2 T-lado , O Media \pm 3SD	NOT similar -diferencia de cantidad relativa de isoformas menores	Discusión Ortogonal (ID de pico, prueba funcional, perfil de estabilidad, etc.), Lotes adicionales, Literatura \Rightarrow No hay impacto clínico \Rightarrow Aceptable	Val
	Perfil de HMWS	SV-AUC	6/6	1. Perfil Similar 2. Informe Resultados	similar (Todo dímero)	Aceptable	Cual/SST (Lado a lado)
	Perfil de HMWS	SEC-MALS	6/6	1. Perfil Similar 2. Informe Resultados	similar (Todo dímero)	Aceptable	Cual/SST (Lado a lado)

86

D. Ejemplo de Evaluación de Comparabilidad Analítica

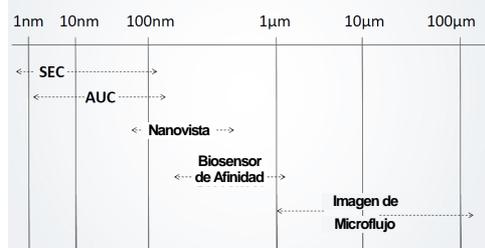
(Métodos y Criterio de Aceptación)

(7) Características Físicoquímicas Adicionales

Propiedades	Atributo	Método de Prueba	No. de Lotes (RP/Similar)	Criterio de Aceptación de Similitud	Resultado	Conclusión	Idoneidad de Método
Análisis Biofísico	Determinación de coeficiente de extinción	Análisis de Aminoácido	6/6	N/Disp. (Similar a valores estimados)	Similar	Aceptable	Cual/SST (Lado a lado)
	Partículas subvisibles	MFI	30/10	N/Disp.	Similar	Aceptable	Val/SST (Lado a lado)
	Concentración proteínica	UV/VIS a A280	30/10	TI de T-lado, O Media \pm 3SD	Similar	Aceptable	Val/SST

Caracterización de Métodos Analíticos & Cuantificación de Agregados y Partículas

Cortesía de John Carpenter, Universidad de Colorado



Biopharma Excellence

87

D. Ejemplo de Evaluación de Comparabilidad Analítica

(Métodos y Criterio de Aceptación)

(8) Actividades Biológicas: Relacionado con Fab

Propiedades	Atributo	Método de Prueba	No. de Lotes (RP/Similar)	Criterio de Aceptación de Similitud	Resultado	Conclusión	Idoneidad de Método
Actividad Biológica (Relacionado con Fab)	Unión al blanco (blanco soluble)	SPR, ELISA, FRET, Pantalla Alfa	30/10	TI de T-lado, O Media \pm 3SD	Similar	Aceptable	Qual/Cal (Lado a lado)
	Unión al blanco (unión a membrana)	FACS, ELISA basado en célula	30/10	TI de T-lado, O Media \pm 3SD	Similar	Aceptable	Qual/Cal (Lado a lado)
	Ensayo de potencia	Ensayo de neutralización, etc..	30/10	TI de T-lado, O Media \pm 3SD	Similar	Aceptable	Qual/Cal (Lado a lado)

88

D. Ejemplo de Evaluación de Comparabilidad Analítica

(Métodos y Criterio de Aceptación)

(9) Actividades biológicas: relacionado con Fc

Propiedades	Atributo	Método de Prueba	No. de Lotes (RP/Similar)	Criterio de Aceptación de Similitud	Resultado	Conclusión	Idoneidad de Método
Actividad Biológica (Relacionado con Fc)	Unión FcR	ELISA, SPR, Pantalla Alfa	30/10	TI de T-lado, O Media \pm 3SD	Similar	Aceptable	Cualificación (Lado a lado)
	ADCC	Ensayo ADCC -ensayo PBMC -ensayo de célula NK modificada -ensayo de gen reportador	30/10	TI de T-lado, O Media \pm 3SD	Similar	Aceptable	Qual/Cal (Lado a lado)
	Unión C1q	ELISA	30/10	TI de T-lado, O Media \pm 3SD	Similar	Aceptable	Qual/Cal (Lado a lado)
	CDC	Ensayo CDC	30/10	TI de T-lado, O Media \pm 3SD	Similar	Aceptable	Qual/Cal (Lado a lado)
	Unión FcRn	ELISA, SPR	30/10	TI de T-lado, O Media \pm 3SD	Similar	Aceptable	Qual/Cal (Lado a lado)

89

D. Ejemplo de Evaluación de Comparabilidad Analítica

(Métodos y Criterio de Aceptación)

(10) Evaluación de la Comparabilidad de Perfiles de Estabilidad (incluyendo Estudios de Degradación Forzada)

Atributo	Método de Prueba	No. de Lotes (RP/Similar)	Criterio de Aceptación de Similitud	Resultado	Conclusión
Perfil de Estabilidad	Tiempo real/temperatura real (5±3°C)	3:3	Sin nuevos degradantes, Perfil de estabilidad similar	Similar	Aceptable
	acelerado (25±2°C/60±5%RH)	3:3	Sin nuevos degradantes, Perfil de estabilidad similar	Similar	Aceptable
	Condiciones de tensión (40±2°C/75±5%RH)	3:3	Sin nuevos degradantes, Perfil de estabilidad similar	Similar	Aceptable
Estudios de Degradación Forzada	Fotoestabilidad	1:1	Sin nuevos degradantes, Perfil de estabilidad similar	Similar	Aceptable
	pH Bajo	1:1	Sin nuevos degradantes, Perfil de estabilidad similar	Similar	Aceptable
	pH Alto	1:1	Sin nuevos degradantes, Perfil de estabilidad similar	Similar	Aceptable
	Oxidación (H ₂ O ₂ , etc.)	1:1	Sin nuevos degradantes, Perfil de estabilidad similar	Similar	Aceptable

90

E. Criterio de aceptación de similitud y Enfoques Estadísticos

- Comparación cualitativa** en forma lado a lado
 - a) Secuencia de Aminoácido, unión S-S, perfil de mapeo peptídico, perfil IEF (enfoque isoeléctrico), etc.
- Deben establecerse, dentro de lo posible, los **Rangos Cuantitativos** para el ejercicio de comparabilidad biosimilar. (*ref....: EMA, Directrices sobre medicamentos biológicos similares que contienen como sustancia activa proteínas derivadas de biotecnología: cuestiones de calidad, 2014*)
 - a) debe basarse en los datos de las pruebas de un número suficiente de lotes del producto de referencia;
 - b) utilizar estadístico (El enfoque estadístico utilizado debe ser justificado.)
 - Ventaja: Proporciona una regla de decisión coherente para todas las presentaciones de biosimilares.
 - Desventaja/desafío: La prueba de equivalencia estadística para la evaluación analítica de biosimilitud es desafiante debido a los tamaños limitados de muestra y la falta de conocimiento científico de los márgenes de equivalencia.
- Número de lotes de biosimilar para la Comparabilidad
 - a) A mayor número, mejor análisis.
 - b) Considerar lo necesario para alcanzar el intervalo de confianza apropiado.

91

E. Criterio de aceptación de similitud y Enfoques Estadísticos

Ejemplos de Rango Cuantitativo

1. Min-Max: rango definido por valor mínimo & valor máximo de las mediciones del lote de producto de referencia

2. Media \pm X Desviación Estándar ($\pm 2SD$ ó $\pm 3SD$, etc.)

a) basado en lotes de Referencia

b) Usualmente fácil de aplicar y ser consistente con el principio de control de calidad.

c) Debe considerarse la variabilidad de método.

d) Si los datos están distribuidos en forma normal, simplemente se pueden expresar varios intervalos de cobertura, como sigue: (*NIST/SEMATECHe-Handbook*)

- $\pm 1SD$ intervalo alrededor de la media tiene cobertura del 67% de la totalidad de datos

- $\pm 2SD$ intervalo alrededor de la media tiene cobertura del 95% de la totalidad de datos

- $\pm 3SD$ intervalo alrededor de la media tiene cobertura del 99,7% de la totalidad de datos

- Estos porcentajes de cobertura son verdaderos siempre y cuando son conocidas la media de la población y la SD (desviación estándar)

e) Si el tamaño de la muestra es suficientemente grande, $\pm 3SD$ y TI con 99,7 % de cobertura están cerca uno del otro.

92

E. Criterio de aceptación de similitud y Enfoques Estadísticos

3. Intervalo de Tolerancia

a) Un intervalo que contiene una cierta proporción de la población de datos con un grado de confianza especificado.

- Al menos una cierta proporción (p) de la población cae dentro de un nivel de confianza dado ($1-\alpha$).

b) Si los datos se distribuyen normalmente, el TI de dos lados se puede determinar usando la siguiente ecuación (*Howe, 1969*):

- Media $\pm k \cdot s$

$$k = Z_{(1-p)/2} \sqrt{\frac{N-1}{\chi^2_{(\gamma, N-1)}}} \sqrt{1 + \frac{1}{N}}$$

s : desviación estándar

k : multiplicador para ajustar el ancho del intervalo definido

N : tamaño de muestra que fue utilizado para estimar la media y la Desviación Estándar-SD)

$\chi^2_{(\gamma, N-1)}$: el valor crítico de la distribución de chi-cuadrado con grados de libertad N-1 que se excede con probabilidad γ

$Z_{(1-p)/2}$: el valor crítico de la distribución normal que se excede con la probabilidad $(1-p)/2$

c) El ancho del TI depende del tamaño de muestra, nivel de confianza, y nivel de cobertura.

d) Teniendo en cuenta la incertidumbre asociada con un conjunto de datos tan pequeño, un TI con el nivel de confianza adecuado sería el método estadístico recomendado.

e) ejemplo: TI de dos lados/un lado con un nivel de confianza del 95% / 95% de población (TI 95/95),
N = 35

- Dos lados (*Howe, 1969*): $k = \pm 2490$

- Un lado (*Hatrella, 1963*): $k = \pm 2157$

93

E. Criterio de aceptación de similitud y Enfoques Estadísticos

4. Prueba de Equivalencia

- Si se utiliza estadística inferencial, generalmente debe aplicarse la prueba de equivalencia.
- El margen de equivalencia es determinada previamente a la experimentación utilizando el nivel de confianza y potencia.
- El margen de equivalencia se relaciona fuertemente con los tamaños de muestra, la diferencia permitida, el nivel de significado y la potencia.
- Se debe evaluar si la diferencia de medias (y el intervalo de confianza en la diferencia de medias) se encuentra dentro de un margen aceptable.
 - El intervalo de confianza está dentro del límite de similitud => equivalente
 - Prueba de dos lados: límite superior y límite inferior
 - La prueba de un lado puede ser aceptable para algunos atributos de calidad (p.ej., impurezas)

94

E. Criterio de aceptación de similitud y Enfoques Estadísticos

✓ **Pensamiento actual de la FDA de EE.UU. con respecto al enfoque estadístico para respaldar la decisión de similitud** *(véase también Sección III Caso de Inflectra)*

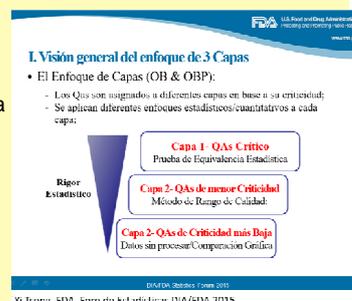
1. Enfoque basado en riesgo para revisión de calidad (p.ej. enfoque de capas)

- 1er paso: Evaluar la criticidad de los atributos de calidad,
 - considerando el impacto sobre desempeño crítico y el grado de incertidumbre en el impacto
- 2do paso: Asignar atributos de calidad a las diferentes capas en base a su criticidad
 - En la clasificación de riesgos de deben tener en cuenta la probabilidad y seriedad del impacto (sobre la eficacia, seguridad & inmunogenicidad), así como la incertidumbre asociada con la evidencia para el impacto.

2. Enfoque de 3 capas

- Capa 1 (Qas Críticos): prueba de equivalencia
 - Analíticamente similar:
 - si el intervalo de confianza del 90% de la diferencia de media real está dentro de los márgenes de equivalencia (δ_1 , δ_2)
 - incrementando el tamaño de muestra: mínimo de 6 lotes (se requieren 10 ó más para alcanzar niveles apropiados de potencia)
- Capa 2 (Qas de menor criticidad): Rango de calidad +/-X SD
- Capa 3 (Qas Criticidad más baja): Comparación de Datos/ Gráficos

3. Inflectra y Zarzio: Margen de equivalencia = 1.5SD ($\delta = 1.5\sigma_R$)



95

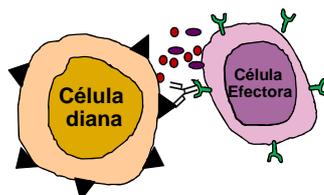
F. CCDA : Sistema fisiológico & Sistema desmesurado

- Principios del ensayo de CCDA (Citotoxicidad medida por Células Dependientes de Anticuerpos)
- Las células NK reconocen sus células blanco mediante FcγR11a (CD16) que se une al anticuerpo unido a la superficie de las células diana.
 - La unión de células NK a sus células diana induce la liberación de mediadores citotóxicos preformados por exocitosis de gránulos.
 - La lisis de las células diana es extracelular, requiere contacto directo de célula a célula y no involucra complemento.
- Factores que afectan la Sensibilidad y su Relevancia para las condiciones fisiológicas
- Células diana: expresión de diferentes niveles de ligandos de diana
 - Células Efectoras: PBMC de donante sano/paciente, células NK primarias aisladas de donante sano/paciente
 - Diferentes ratios E/T
 - Presencia o ausencia de suero autólogo

96

F. CCDA : Sistema fisiológico & Sistema desmesurado

- Sistemas
- Métodos Clásicos (ensayos basados en célula primaria)
 - Células efectoras: PBMCs de donante sano/paciente, células NK primarias aisladas de donante sano/paciente
 - Método de punto final: mediciones de ^{51}Cr , ensayo de liberación de LDH, FACS
 - Inconvenientes: Requerimiento sangre fresca de donantes, resultados altamente variable según las diferencias de los donantes, el requisito de la cultura y expansión celular.
 - Ensayo de gen ADCC-Reportador
 - Células efectoras: Células Jurkat diseñadas (sobre-expresión de FcγR11a humano) y gen reportador de NFAT-luciferasa
 - Métodos de punto final: Expresión de Luciferasa (p.ej., equivalente al ensayo clásico de liberación de LDH)

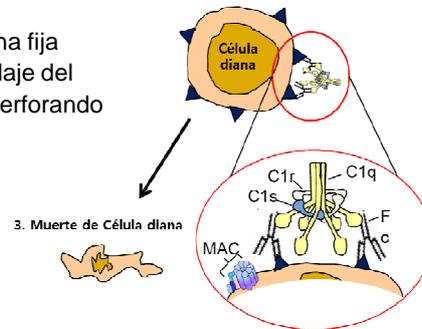


97

G. CDC (Citotoxicidad Dependiente de Complemento)

Principios

- a) El anticuerpo terapéutico se diluye en la matriz del complemento y se agrega a una línea celular objetivo.
- b) El anticuerpo unido a la superficie de la célula diana fija el complemento dando como resultado el ensamblaje del complejo de ataque de membrana y finalmente, perforando la membrana de la célula diana.
- c) Las células son lisadas.



Métodos

a) FACS

- 7-Amino-actinomicina D (7-AAD) se intercala en ácidos nucleicos bicatenarios; es excluido por las células viables, pero puede penetrar las membranas celulares de las células moribundas o muertas;
- se puede usar un citómetro de flujo para medir la citotoxicidad derivada del complemento dependiente de la dosis

b) Medición de ATP (Ensayo de viabilidad celular luminiscente Cell Titer-Glo®)