



UNIVERSIDAD
DE GRANADA

TESIS DOCTORAL

**METODOLOGÍA ELISA PARA
ESTUDIAR LA ESTABILIDAD
DE MEDICAMENTOS
BIOTECNOLÓGICOS**

**INMACULADA
SUÁREZ GONZÁLEZ**



Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autora: Inmaculada Suárez González

ISBN: 978-84-9163-270-2

URI: <http://hdl.handle.net/10481/47150>



UNIVERSIDAD
DE GRANADA

**METODOLOGÍA ELISA PARA
ESTUDIAR LA ESTABILIDAD DE
MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Mayo 2017

METODOLOGÍA ELISA PARA ESTUDIAR LA ESTABILIDAD DE MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS

LOS DIRECTORES



**Fdo. Natalia África
Navas Iglesias**

Profesora Titular del
Departamento de Química
Analítica.
ibs.granada
Facultad de Ciencias.
Universidad de Granada



**Fdo. Luis Fermín
Capitán Vallvey**

Catedrático del Departamento
de Química Analítica.
Facultad de Ciencias.
Universidad de Granada

Trabajo presentado como Tesis Doctoral para aspirar al
Grado de Doctora en Química




Fdo. Inmaculada Suárez González
Licenciada en Farmacia. Universidad de Granada

Natalia África Navas Iglesias, Profesora Titular del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada e investigadora adscrita al Instituto Biosanitario de Granada (ibs.granada) y Luís Fermín Capitán Vallvey, Catedrático del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, en calidad de directores de la Tesis Doctoral presentada por la Licenciada en Farmacia por la Universidad de Granada, Inmaculada Suárez González

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “METODOLOGÍA ELISA PARA ESTUDIAR LA ESTABILIDAD DE MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS”, enmarcada en el proyecto de investigación FIS 110-00201 (Instituto Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad): “Estudio formal y propuesta de validación del perfil indicador de la estabilidad de medicamentos de naturaleza biotecnológica (y química) en condiciones normales de uso hospitalario”, ha sido desarrollada totalmente en los laboratorios del grupo de investigación FQM-118, perteneciente al Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, y que a nuestro juicio, reúne todos los requisitos exigidos a este tipo de trabajo.

Y para que conste y surta los efectos pertinentes, expiden el presente certificado en la ciudad de Granada, el 20 de abril de 2017.



NATALIA ÁFRICA NAVAS
IGLESIAS



LUÍS FERMÍN CAPITÁN
VALLVEY

La doctoranda Inmaculada Suárez González y los directores de la Tesis Doctoral: Natalia África Navas Iglesias y Luís Fermín Capitán Vallvey

Garantizamos, al firmar esta Tesis Doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Lugar y Fecha. En Granada a 20 de abril de 2017

Directores de la Tesis Doctoral	
<p>Natalia África Navas Iglesias</p>  <p>Firma</p>	<p>Luís Fermín Capitán Vallvey</p>  <p>Firma</p>
Doctoranda	
<p>Inmaculada Suárez González</p>  <p>Firma</p>	

Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total, es una victoria completa.

Mahatma Ghandi

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral no ha sido solo fruto mío, sino que de una u otra forma, han sido muchas las personas que han formado parte de su desarrollo. Por tanto, me veo en la obligación como mínimo de

Agradecer

En primer lugar a mis directores de Tesis, la Profesora Titular Natalia África Navas Iglesias y el Catedrático Luís Fermín Capitán Vallvey, el haberme dado la oportunidad de formar parte de este proyecto y brindarme su apoyo, conocimientos y experiencia en todos esos momentos en los que ha sido necesario, así como permitirme entrar en este mundo de altibajos que es la investigación.

La financiación de esta Tesis Doctoral mediante el proyecto FIS PI10/00201 (Instituto Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, España), por tanto, ha sido parcialmente financiada por los Fondos Europeos de Desarrollo Regional (European Regional Development Funds, ERDF).

Todas las muestras de medicamentos empleadas en los estudios aquí mostrados fueron amablemente cedidas por la Unidad de Farmacia del Hospital Clínico Universitario San Cecilio de Granada, España. Por tanto darles las gracias por ello. Dentro de esta Unidad, agradecer muy especialmente a Antonio Salmerón García y Jose Cabeza Barrera, que no solo forman parte de este proyecto, que me hayan tratado como uno más de su equipo y me hayan ofrecido su apoyo y ayuda siempre que ha sido necesaria. Igualmente, dentro del personal de este Servicio, no quiero olvidarme de nombrar a Javier, persona que se ha encargado de preparar el 90 % de las muestras excedentes de todos los medicamentos biotecnológicos que he empleado en este Trabajo. Gracias por esos ratitos de risa y por tu amabilidad.

Agradecer al Catedrático Antonio Osuna Carrillo de Albornoz y a la Doctora Teresa Cruz Bustos, pertenecientes al Departamento de

Parasitología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, la ayuda y asesoramiento prestados. Gracias por mostrarme sugerencias sobre cómo realizar la investigación al inicio de la misma y resolver la miles de dudas que me han surgido a lo largo de todo su desarrollo.

A Vircell, agradecerles el haberme permitido pasar varios días trabajando con ellos y mostrarme como desarrollan algunos de sus inmunoensayos, indicándome en todo momento los pasos y parámetros más comunes a aplicar en este tipo de metodología.

Agradecer también el apoyo recibido por la Fundación de Investigación Biomédica Alejandro Otero (FIBAO) a lo largo de todo el desarrollo de esta Tesis y la beca para la formación práctica en investigación que me fue otorgada por dicha fundación.

A la UGR y CEI BioTic el haberme concedido las becas: II Convocatoria de Ayudas a la Enseñanza Práctica dirigidas a estudiantes de Másteres Oficiales y Programas de Doctorado de la UGR, CEI BioTic Granada; y la Beca de Formación de Estudiantes de Tercer Ciclo (doctorado) concedida por la UGR.

A mis compañeros de laboratorio, Alfonso, Miguel, María A., María P., M^a Luisa, Alejandro, Manuel, Julio, Ismael, Antonio, Jose y Agustín, agradecerles la ayuda y apoyo que me han prestado, por escucharme y aguantarme, por hacerme pasar muy buenos momentos y lo más importante, por convertirse en amig@s más que compañeros.

A Ignacio de Orbe, simplemente por estar ahí y preocuparse en todo momento.

A mis amigas Ana, Belén e Inma, así como Antonio, gracias por formar parte de mi día a día y aguantarme tal cual soy.

Muy especialmente quiero dar las gracias *A MI PADRE*, pues sin él nada de esto habría sido posible. Cualquier cosa que pueda dejar plasmada aquí, se queda pequeña con lo que en realidad siento. Gracias por creer en mí, por mostrarme tu apoyo incondicional y animarme siempre a lograr

las locuras que se me ocurren hacer. Gracias por aguantar mis cambios de humor y mis manías. Gracias por la inversión que has realizado durante todos estos años y que ha permitido que yo pueda hacer de esta Tesis Doctoral un hecho. Gracias por estar ahí siempre. Te quiero y solo puedo decirte gracias, gracias, gracias.

De igual forma quiero agradecer muy especialmente a mis hermanas el apoyo incondicional que me muestran, su comprensión, sus consejos, su confianza en mí y como no su amistad. Sabéis que os quiero con locura.

También agradecer a mi cuñado, que más que cuñado es un hermano para mí, su apoyo y confianza; y a una personita que me tiene robado el corazón y que es mi sobrino Sergio, agradecerle simplemente el existir, porque en los tres años de vida que tiene, solo consigue sacarme sonrisas, incluso en los momentos más difíciles y amor incondicional.

Y por qué no, también quiero hacer partícipe de mi agradecimiento a la bolita peluda que tengo en casa, mi Syrka, que siempre está a mi lado, y a la otra bolita Kyra.

No puedo estar más orgullosa de la familia que tengo y faltan palabras para expresar lo que siento. Os quiero, siempre.

A las personas que ya no están conmigo y sé que desde aquel lugar en el que se encuentren me apoyan y cuidan como siempre lo hicieron. Abuelas os quiero.

Para terminar, muy especialmente doy las gracias a mi ejemplo a seguir, mi madre, que, aunque ya no está entre nosotros, continúa dándome fuerzas para continuar con todo lo que emprendo y ser siempre fuerte tal y como ella; ha sido y será mi mayor apoyo.

*UN PLACER HABEROS CONOCIDO A TODOS Y QUE HAYÁIS
ENTRADO A FORMAR PARTE DE MI VIDA.*

A mi madre

Permaneces en mi alma.

Nunca te fuiste. Siempre conmigo.

ÍNDICE

ACRÓNIMOS	13
OBJETIVOS	21
INTRODUCCIÓN	23
1. BIOTECNOLOGÍA	25
1.1. <i>Concepto y breve historia</i>	25
1.2. <i>Aplicaciones de la biotecnología</i>	30
2. MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS	31
2.1. <i>Definición</i>	31
2.2. <i>Características de los medicamentos biotecnológicos. Diferencias con los medicamentos de síntesis química</i>	33
2.3. <i>Marco legal: la regulación de los MB</i>	40
2.4. <i>Medicamentos biológicos comercializados en España</i>	43
2.5. <i>Gasto farmacéutico en medicamentos biotecnológicos</i>	45
2.5.1. <i>Medidas de ahorro</i>	51
3. ANTICUERPOS MONOCLONALES TERAPÉUTICOS	53
3.1. <i>Definición</i>	53
3.2. <i>Estructura</i>	55
3.3. <i>Nomenclatura</i>	58
3.4. <i>Obtención</i>	59
3.4.1. <i>Tecnologías para la producción de anticuerpos monoclonales terapéuticos</i>	60
3.5. <i>Tipos de anticuerpos monoclonales terapéuticos</i>	64
3.6. <i>Mecanismo de acción de anticuerpos monoclonales terapéuticos</i>	67

3.7.	<i>Usos clínicos de los anticuerpos monoclonales terapéuticos</i>	68
3.8.	<i>Mercado de anticuerpos monoclonales terapéuticos</i>	70
4.	CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES TERAPÉUTICOS	75
4.1.	<i>Estudios de estabilidad. Guías ICHs</i>	75
4.2.	<i>Parámetros analíticos indicadores de estabilidad</i>	78
4.3.	<i>Caracterización físico-química de anticuerpos monoclonales</i>	81
	4.3.1. Electroforesis	82
	4.3.2. Cromatografía líquida de alta resolución	82
	4.3.3. Espectrometría de masas	85
	4.3.4. Otros métodos de análisis de mAbs	85
4.4.	<i>Caracterización de la actividad biológica de FBIOs mediante inmunoensayos</i>	86
	4.4.1. <i>Inmunoensayos heterogéneos</i>	87
	4.4.2. <i>Inmunoensayos homogéneos</i>	88
5.	ELISA.TIPOS Y FACTORES INFLUYENTES	91
5.1.	<i>ELISA competitivo</i>	92
	5.1.1. Ensayo competitivo de un solo paso	93
	5.1.2. Ensayo competitivo de dos pasos	93
5.2.	<i>ELISA no competitivo</i>	94
	5.2.1. ELISA directo	94
	5.2.2. ELISA indirecto	96
	5.2.3. ELISA sándwich	97
5.3.	<i>Factores clave en el desarrollo de un ELISA</i>	100
	5.3.1. Adsorción	100
	5.3.2. Unión y lavados	101
	5.3.3. Tiempos de incubación y temperaturas	101
	5.3.4. Enzimas y sustratos	102

5.3.5.	Anticuerpos y antígenos empleados	104
5.3.6.	Detectores	104
6.	DESCRIPCIÓN DE LOS FBIOs ESTUDIADOS	104
6.1.	INFLIXIMAB	104
6.1.1.	Forma farmacéutica, composición y excipientes	105
6.1.2.	Procedimiento de obtención	106
6.1.3.	Mecanismo de acción	106
6.1.4.	Aplicaciones	108
6.1.5.	Consideraciones farmacológicas	111
6.1.6.	Efectos adversos	112
6.2.	BEVACIZUMAB	113
6.2.1.	Forma farmacéutica, composición y excipientes	113
6.2.2.	Procedimiento de obtención	114
6.2.3.	Mecanismo de acción	115
6.2.4.	Aplicaciones	116
6.2.5.	Consideraciones farmacológicas	118
6.2.6.	Efectos adversos	120
6.3.	CETUXIMAB	120
6.3.1.	Forma farmacéutica, composición y excipientes	120
6.3.2.	Procedimiento de obtención	121
6.3.3.	Mecanismo de acción	123
6.3.4.	Aplicaciones	125
6.3.5.	Consideraciones farmacológicas	129
6.3.6.	Efectos adversos	130
6.4.	TRASTUZUMAB	132
6.4.1.	Forma farmacéutica, composición y excipientes	132
6.4.2.	Procedimiento de obtención	133
6.4.3.	Mecanismo de acción	134
6.4.4.	Aplicaciones	136

6.4.5.	Consideraciones farmacológicas	138
6.4.6.	Efectos adversos	140
BIBLIOGRAFÍA		142
CAPÍTULO I. METODOLOGÍA EMPLEADA		163
1. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN		165
1.1.	REACTIVOS: PRODUCTOS QUÍMICOS, PROTEÍNAS Y SUS DISOLUCIONES	165
1.1.1.	Productos químicos	165
1.1.2.	Proteínas	166
1.1.3.	Disoluciones empleadas	168
1.2.	ANTICUERPOS MONOCLONALES ESTUDIADOS	171
1.3.	INSTRUMENTOS Y EQUIPOS	173
1.3.1.	Instrumentos de medida	173
1.3.2.	Equipos	173
1.4.	MATERIAL DE LABORATORIO	175
1.5.	ORDENADORES Y SOFTWARES	178
2. METODOLOGÍA ANALÍTICA EMPLEADA		178
2.1.	MÉTODOS ELISA: ASPECTOS GENERALES SELECCIONADOS PARA EL DESARROLLO DE LOS MISMOS	179
2.2.	VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ELISA DESARROLLADOS	182
2.2.1.	Función de calibrado	183
2.2.2.	Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)	183
2.2.3.	Intervalo de cuantificación (IC) y de detección (ID)	184

2.2.4.	Precisión	185
2.2.5.	Exactitud/veracidad	186
2.2.6.	Especificidad/Selectividad	187
2.3.	ESTUDIOS DE DEGRADACIÓN ACELERADA	189
2.3.1.	Exposición a temperatura	191
2.3.2.	Exposición a la luz visible	192
2.3.3.	Fuerza iónica del medio	193
2.3.4.	Exposición a medio ácido y básico	194
2.3.5.	Exposición a medio oxidante	194
3.	ESTUDIOS DE ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DE LOS MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS	195
	BIBLIOGRAFÍA	199
CAPÍTULO II.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE INFLIXIMAB (REMICADE®) MEDIANTE ELISA DIRECTO	205
1.	DETERMINACIÓN DE INFLIXIMAB EN ESTUDIOS CLÍNICOS/FARMACÉUTICOS. TÉCNICAS ANALÍTICAS COMUNMENTE EMPLEADAS	207
2.	OBJETIVO	210
3.	DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ELISA	211
3.1.	Selección de la modalidad ELISA	211
3.2.	Selección de las placas de microtitulación	211
3.3.	Selección del anticuerpo secundario (conjugado)	211
3.4.	Selección de la concentración óptima de conjugado	213
3.5.	Selección del tampón diluyente y de fijación	214
3.6.	Selección del intervalo de concentración de IFX	215
3.7.	Selección de las variables restantes	216
3.8.	Evaluación de la estabilidad de las placas sensibilizadas con IFX	218
4.	DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS DEL ELISA DESARROLLADO	218

5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ELISA	226
5.1. <i>Validación del método ELISA propuesto</i>	226
5.1.1. Función de calibrado	227
5.1.2. Linealidad	230
5.1.3. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)	231
5.1.4. Intervalo de detección (ID) e intervalo dinámico lineal (IDL)	232
5.1.5. Precisión	233
5.1.6. Exactitud/veracidad	235
5.2. <i>Resumen de los parámetros de calidad del ELISA propuesto</i>	236
6. CONCLUSIONES	237
BIBLIOGRAFÍA	238
CAPÍTULO III. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE INFLIXIMAB (REMICADE®) MEDIANTE ELISA INDIRECTO	243
1. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE INFLIXIMAB	245
2. OBJETIVO	250
3. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ELISA	250
3.1. Selección de la modalidad ELISA	250
3.2. Selección de las placas de microtitulación	250
3.3. Selección del anticuerpo secundario (conjugado)	251
3.4. Selección de la concentración óptima de conjugado	252
3.5. Optimización del proceso de sensibilización de las placas ELISA	252
3.6. Selección del volumen de disoluciones a adicionar en la placa ELISA	255
3.7. Selección de las variables restantes	257

4. DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS DEL ELISA DESARROLLADO	259
5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ELISA	264
5.1. <i>Validación del método ELISA propuesto</i>	264
5.1.1. Función de calibrado	264
5.1.2. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)	269
5.1.3. Intervalo de detección (ID) e intervalo de cuantificación (IC)	269
5.1.4. Precisión	270
5.1.5. Exactitud/veracidad	272
5.1.6. Especificidad/selectividad	274
5.2. <i>Estudios de degradación acelerada</i>	275
5.3. <i>Aplicación del método ELISA propuesto. Evaluación de la actividad biológica en el tiempo de IFX (Remicade[®])</i>	278
6. CONCLUSIONES	283
BIBLIOGRAFÍA	285
CAPÍTULO IV. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE BEVACIZUMAB (AVASTIN[®]) MEDIANTE ELISA INDIRECTO	287
1. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE BEVACIZUMAB	289
2. OBJETIVO	295
3. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ELISA	295
3.1. Selección de la modalidad ELISA	295
3.2. Selección de las placas de microtitulación	296
3.3. Selección del anticuerpo secundario (conjugado)	296
3.4. Selección de la concentración óptima de conjugado	296

3.5.	Optimización del proceso de sensibilización de las placas ELISA	297
3.6.	Selección del volumen de disoluciones a adicionar en la placa ELISA	298
3.7.	Selección de las variables restantes	298
4.	DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS DEL ELISA DESARROLLADO	300
5.	VALIDACIÓN DEL MÉTODO ELISA	302
5.1.	<i>Validación del método ELISA propuesto</i>	302
5.1.1.	Función de calibrado	302
5.1.2.	Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)	306
5.1.3.	Intervalo de detección (ID) e intervalo de cuantificación (IC)	307
5.1.4.	Precisión	308
5.1.5.	Exactitud/veracidad	310
5.1.6.	Especificidad/selectividad	311
5.2.	<i>Estudios de degradación acelerada</i>	313
5.3.	<i>Aplicación del método ELISA propuesto. Evaluación de la actividad biológica en el tiempo de BVZ (Avastin®)</i>	316
6.	CONCLUSIONES	322
	BIBLIOGRAFÍA	324
CAPÍTULO V.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE CETUXIMAB (ERBITUX®) MEDIANTE ELISA INDIRECTO	329
1.	ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE CETUXIMAB	331
2.	OBJETIVO	335
3.	DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ELISA	336

3.1.	Selección de la modalidad ELISA	336
3.2.	Selección de las placas de microtitulación	336
3.3.	Selección del anticuerpo secundario (conjugado)	337
3.4.	Selección de la concentración óptima de conjugado	337
3.5.	Optimización del proceso de sensibilización de las placas ELISA	338
3.6.	Selección del volumen de disoluciones a adicionar en la placa ELISA	339
3.7.	Selección de las variables restantes	339
4.	DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS DEL ELISA DESARROLLADO	341
5.	VALIDACIÓN DEL MÉTODO ELISA	343
5.1.	<i>Validación del método ELISA propuesto</i>	343
5.1.1.	Función de calibrado	343
5.1.2.	Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)	347
5.1.3.	Intervalo de detección (ID) e intervalo de cuantificación (IC)	347
5.1.4.	Precisión	348
5.1.5.	Exactitud/veracidad	350
5.1.6.	Especificidad/selectividad	352
5.2.	<i>Estudios de degradación acelerada</i>	353
5.3.	<i>Aplicación del método ELISA propuesto. Evaluación de la actividad biológica en el tiempo de CTX (Erbitux®)</i>	356
6.	CONCLUSIONES	360
	BIBLIOGRAFÍA	362
	CAPÍTULO VI. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE TRASTUZUMAB (HERCEPTIN®) MEDIANTE ELISA INDIRECTO	367
1.	ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE TRASTUZUMAB	369

2. OBJETIVO	376
3. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ELISA	377
3.1. Selección de la modalidad ELISA	377
3.2. Selección de las placas de microtitulación	377
3.3. Selección del anticuerpo secundario (conjugado)	378
3.4. Selección de la concentración óptima de conjugado	378
3.5. Optimización del proceso de sensibilización de las placas ELISA	378
3.6. Selección del volumen de disoluciones a adicionar en la placa ELISA	380
3.7. Selección de las variables restantes	380
4. DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS DEL ELISA DESARROLLADO	381
5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ELISA	384
5.1. <i>Validación del método ELISA propuesto</i>	384
5.1.1. Función de calibrado	384
5.1.2. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)	388
5.1.3. Intervalo de detección (ID) e intervalo de cuantificación (IC)	388
5.1.4. Precisión	389
5.1.5. Exactitud/veracidad	392
5.1.6. Especificidad/selectividad	393
5.2. <i>Estudios de degradación acelerada</i>	394
5.3. <i>Aplicación del método ELISA propuesto. Evaluación de la actividad biológica en el tiempo de TTZ (Herceptin®)</i>	397
6. CONCLUSIONES	405
BIBLIOGRAFÍA	407
CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS DE ACTUACIÓN	411

ANEXOS	417
ANEXO I. COSTES ASOCIADOS AL TRATAMIENTO CON INFLIXIMAB	419
1. COSTES ASOCIADOS AL TRATAMIENTO CON INFLIXIMAB	421
2. POSIBLES MEDIDAS DE AHORRO	448
BIBLIOGRAFÍA	449
ANEXO II. COSTES ASOCIADOS AL TRATAMIENTO CON BEVACIZUMAB	455
1. COSTES ASOCIADOS AL TRATAMIENTO CON BEVACIZUMAB	457
2. POSIBLES MEDIDAS DE AHORRO	472
BIBLIOGRAFÍA	473
ANEXO III. COSTES ASOCIADOS AL TRATAMIENTO CON CETUXIMAB	477
1. COSTES ASOCIADOS AL TRATAMIENTO CON CETUXIMAB	479
2. POSIBLES MEDIDAS DE AHORRO	489
BIBLIOGRAFÍA	490
ANEXO IV. COSTES ASOCIADOS AL TRATAMIENTO CON TRASTUZUMAB	495
1. COSTES ASOCIADOS AL TRATAMIENTO CON TRASTUZUMAB	497
2. POSIBLES MEDIDAS DE AHORRO	513
BIBLIOGRAFÍA	515

ACRÓNIMOS

Ab	Anticuerpo
ABT	Abatacept
a.C.	Antes de Cristo
ADA	Adalimumab
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo
ADCP	Fagocitosis celular dependiente de anticuerpo
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
Ag	Antígeno
APs	Artritis psoriásica
AR	Artritis reumatoide
ATI	Anticuerpo anti-infliximab
AUC	Ultrafiltración analítica
AVG	Años de vida ganados
AVAC	Años de vida ajustados por calidad
BVZ	Bevacizumab
BT	Biotecnología
CEDIA	Inmunoensayo por clonado de dador
CCECC	Cáncer de células escamosas de cabeza y cuello
CCNEP	Cáncer de células no escamosas de pulmón
CCR	Cáncer colorrectal
CCRm	Carcinoma de células renales avanzado o metastásico
CCRm	Cáncer colorrectal metastásico
CD	Dicroísmo circular
CDC	Citotoxicidad dependiente de complemento
CDR	<i>Complementary Determining Region</i> (Regiones determinantes de complementariedad)
chAb	Anticuerpo monoclonal quimérico
CHMP	<i>Committee for Human Medicinal Products</i> (Comité de Medicamentos para Uso Humano)
CHO	Ovario de hámster chino
CI	Colitis indeterminada
CL	Dominio constante
cm	Centímetros
CMIA	Inmunoensayo magnético quimioluminiscente
CMM	Cáncer de mama metastásico
CMP	Cáncer de mama precoz

CPMP	Comité de Especialidades Farmacéuticas
CRS	Síndrome de liberación de citoquinas
CTX	Cetuximab
CU	Colitis ulcerosa
CV	Coefficiente de variación
DCI	Denominaciones comunes internacionales
DER	Desviación estándar relativa
DLS	Dispersión dinámica de luz
DMAE	Degeneración macular asociada a la edad
€	Euros
EA	Espondilitis anquilosante
EC	Enfermedad de Crohn
ECLIA	Ensayo electroquimioluminiscente
EE.UU.	Estados Unidos
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EIA	Enzimo inmuno ensayo
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> (Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas)
EMA	Agencia Europea del Medicamento
EMIT	Inmunoensayo de multiplicación enzimática
ER	Error relativo
ETN	Etanercept
etc.	Etcétera
Fab	Fragmento monovalente
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FARME	Fármacos antiinflamatorios modificadores de la enfermedad
FBIO	Fármacos biotecnológicos
Fc	Fragmento cristizable
FDA	Food and Drug Administration
fhAb	Anticuerpos monoclonales completamente humanos (<i>fully human</i>)
FPIA	Inmunoensayo de polarización fluorescente
GLM	Golimumab
GMP	Buenas prácticas de fabricación

h	Hora
H	Cadenas pesadas
HAMA	<i>Human anti-mouse antibodies</i>
HER-2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
HER-2+	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano positivo
HHT	Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria
HIC	<i>Hydrophobic Interaction Chromatography</i> (Cromatografía de interacción hidrofóbica)
HILIC	<i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i> (Cromatografía de interacción hidrofílica)
HMSA	Ensayo de cambio de movilidad homogéneo
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta resolución)
HPV	Virus del papiloma humano
hzAb	Anticuerpos monoclonales humanizados
IA	Intervalo de aplicabilidad del método
ICH	International Conference on Harmonisation
I+D	Investigación y Desarrollo
ID	Intervalo de detección
IDL	Intervalo dinámico lineal
IE	Inmunoensayo
IEC	<i>Ion Exchange Chromatography</i> (Cromatografía de intercambio iónico)
IFX	Infliximab
Ig	Inmunoglobulina
IgA	Inmunoglobulina A
IgD	Inmunoglobulina D
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IM	Intramuscular

INNs	<i>International nonproprietary names</i>
ITV	Intravítrea
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
i.v.	Intravenosa
IVA	Impuesto sobre el valor añadido
IVB	BVZ intravítreo
<i>k</i>	Kappa
kD	Kilodalton
Kg	Kilogramo
£	Libras
L	Cadenas ligeras
l	Litro
LC	Límite de cuantificación
LC/MS	Cromatografía líquida/espectrometría de masas
LD	Límite de detección
LES	Lupus eritematoso sistémico
LF	Flujo lateral rápido
M	Molar
mM	Milimolar
m ²	Metros cuadrados
mAb	Anticuerpo monoclonal
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight</i> (Espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz con detector de iones de tiempo de vuelo)
MB	Medicamentos biotecnológicos
MBE	Modificadores biológicos de la enfermedad
MBio	Medicamentos biológicos
MEIA	Inmunoensayo enzimático con micropartículas
mg	Miligramos
ml	Mililitros
MS	Espectrometría de masas
MSQ	Medicamentos de síntesis química
MTX	Metrotexato
ng	Nanogramos
NHS	Sistema Nacional de Salud del Reino Unido

nm	Nanometros
NSCLC	<i>Non-small cell lung cancer</i> (cáncer de pulmón de células no pequeñas)
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPD	Orto-fenilendiamina dihidrocloruro
OS	Tiempo de supervivencia global
PBS	Tampón fosfato salino
PC	Policarbonato
pCr	Proteína C reactiva
PEG	Polietilenglicol
PEGilación	Polietilengilación
p.ej.	Por ejemplo
PFS	Tiempo de supervivencia libre de progresión
pI	Punto isoeléctrico
PNT	Panitumumab
PP	Polipropileno
Ps	Psoriasis
PS	Poliestireno
PVC	Cloruro de polivinilo
PVL	Precio de Venta de Laboratorio
PVP	Precio de Venta al Público
QALY	Expectativa de vida ajustada por calidad
QC	Quality control
QT	Quimioterapia
®/™	Marca registrada
R	Recuperación
R ²	Coefficiente de variación
RCEI	Razón coste-eficacia incremental
r-DNA	Ácido desoxiribonucleico recombinante
RGA	Ensayo de gen reportero basado en células funcionales
RIA	Radioinmunoanálisis
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNZ	Ranibizumab
RPC	<i>Reversed Phase Chromatography</i> (Cromatografía de fase reversa)
r.p.m.	Revoluciones por minuto

RSV	Virus respiratorio sincitial
RT	Radioterapia
\$	Dólares
S.A.	Sociedad Anónima
sc	Subcutánea
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i> (Cromatografía de exclusión por tamaño)
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SKN	Secukinumab
SPR	Resonancia de plasmón superficial
T	Temperatura
TCZ	Tocilizumab
TDM1	Tratuzumab-Emtansina
TFA	Trifluoroacético
TGA	Administración de Bienes Terapéuticos
TGF- α	Factor de crecimiento transformante alfa
TK	Tirosina kinasa
TMB	Tetrametilbencidina
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNF- β	Factor de necrosis tumoral beta
TTZ	Trastuzumab
UE	Unión Europea
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de ultra resolución)
UV-V	Ultravioleta-Visible
VEGF	Factor de crecimiento epidérmico vascular
VL	Dominio variable
VLZ	Vedolizumab
vs.	Versus
v/v	Volumen/volumen
w/v	Peso/volumen
°C	Grados centígrados
λ	Lambda / longitud de onda
%	Porcentaje
μg	Microgramos

μl	Microlitros
μm	Micrometros
1 ^{ario}	Primario
2 ^{ario}	Secundario
3CM-	Triple cáncer de mama negativo
5-FU	5 Fluoro-uracilo



OBJETIVOS

OBJETIVOS

❖ OBJETIVO GENERAL

Los fármacos biotecnológicos son medicamentos obtenidos a partir de tecnología del ADN recombinante o de la expresión controlada de genes que codifican proteínas biológicamente activas que se emplean en la actualidad para el tratamiento de diversas patologías. A este tipo de fármacos pertenecen los anticuerpos monoclonales de uso terapéutico. El empleo de estos supone un gasto farmacéutico muy por encima del que conllevan los tratamientos con medicamentos de síntesis química; lo cual unido a que la estabilidad de los mismos una vez abierto el vial, está limitada a 24-48 horas según indicaciones del fabricante, hace que la cantidad de fármaco remanente desechada sea muy elevada, aumentando por lo tanto el gasto farmacéutico.

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es el estudio de la estabilidad de fármacos biotecnológicos de uso más común centrado en el estudio de su funcionalidad a través de la evaluación de su actividad biológica; en concreto es objetivo el estudio de la estabilidad de infliximab, bevacizumab, cetuximab y trastuzumab en sus correspondientes medicamentos innovadores y en preparaciones farmacéuticas de uso hospitalario con vistas a aportar datos para evaluar su potencial reutilización de forma segura y eficaz para el paciente.

❖ OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A. Desarrollo de un inmunoensayo tipo ELISA específico para cada uno de los fármacos biotecnológicos seleccionados que permita la cuantificación de la actividad biológica de cada uno de ellos de forma rápida, sencilla y sin un coste demasiado elevado.

B. Validación y determinación de los parámetros de calidad de los diferentes métodos ELISA desarrollados según las recomendaciones de

Objetivos

organismos internacionales, como las ICH (International Conference Harmonization).

C. Realización de estudios de degradación acelerada con un doble objetivo, ayudar a validar los métodos ELISA desarrollados y conocer las pautas de degradación por factores externos de los fármacos ensayados.

D. Determinación de la especificidad de cada uno de los métodos ELISA desarrollados mediante estudios de reacciones cruzadas con los diferentes anticuerpos monoclonales ensayados.

E. Aplicación de los inmunoensayos desarrollados en estudios de estabilidad en el tiempo de la actividad biológica de infliximab, bevacizumab, cetuximab y trastuzumab en el propio medicamento (Remicade[®], Avastin[®], Erbitux[®] y Herceptin[®], respectivamente) una vez abierto y conservado en condiciones habituales de uso hospitalario y en condiciones diferentes a las indicadas por el fabricante, de manera que contribuyan a evaluar la posibilidad de reutilización de los sobrantes del medicamento, con los beneficios fármaco-económicos que este hecho puede suponer.



INTRODUCCIÓN

1. BIOTECNOLOGÍA

1.1. Concepto y breve historia

La palabra “biotecnología” (BT) fue usada inicialmente en 1919 por el ingeniero húngaro Karl Ereky. En 1992 se estableció en el marco de la Convención sobre Diversidad Biológica la definición comúnmente aceptada: “cualquier aplicación tecnológica que utiliza sistemas biológicos, organismos vivos o sus derivados, para crear o modificar productos y procesos para usos específicos”. Esta definición fue más tarde ratificada por 168 países y aceptada por la Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Actualmente la BT, en un sentido amplio, se puede definir como la aplicación de organismos vivos, componentes, sistemas o procesos biológicos para la obtención de bienes y servicios y la solución de problemas de interés para la comunidad mediante la generación de innovaciones y su manufactura industrial [1].

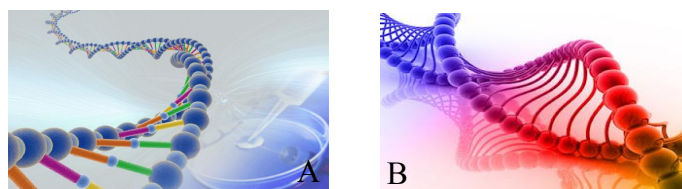


Figura 1. A. Trabajo biotecnológico. Fuente: biotecnologiakevin98.blogspot.com B. Doble hélice de DNA. Fuente: mind42.com

Se trata de una especialidad con carácter multidisciplinar, en la que se engloban múltiples y variadas ramas científicas [2]. Sin embargo, el

Introducción

panorama de la BT es tan amplio y variado, que para su análisis y comprensión suele ser acotado, quedando reducido exclusivamente a la tecnología de los procesos microbiológicos y a la BT de avanzada, siendo definida esta última como el conjunto de técnicas utilizadas para la generación de bienes y servicios mediante el empleo de organismos vivos o sus productos, y que han sido puestas a punto en los últimos 20 años como resultado de la labor básica desarrollada simultáneamente en los campos de la biología molecular, bioquímica, enzimología, genética, microbiología, virología, inmunología y biología celular que han sentado las bases de un nuevo tipo de especialidad denominado “ingeniería genética” y una serie de tecnologías conexas que en su conjunto dan lugar a la denominada BT de avanzada [3].

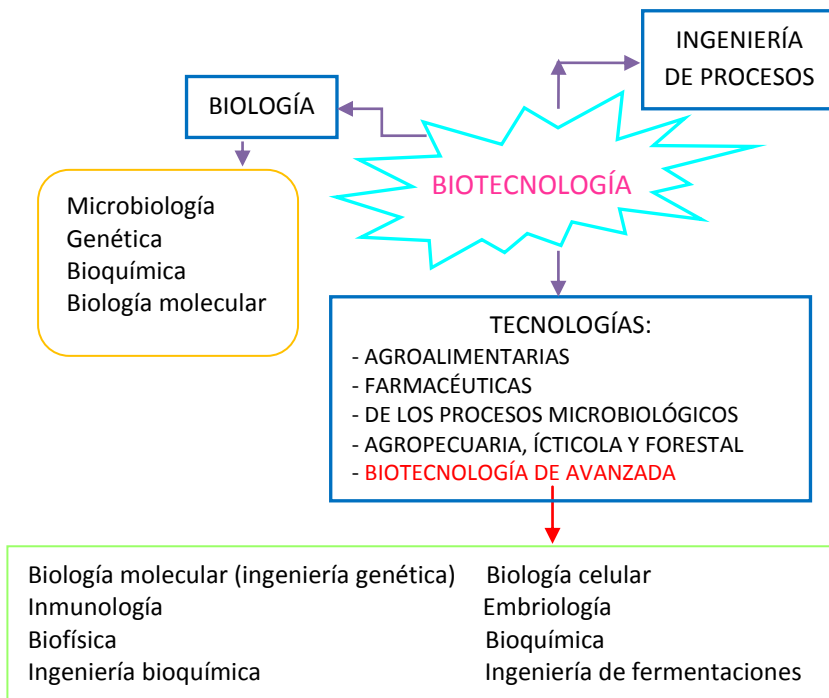


Figura 2. Biotecnología. Carácter multidisciplinar. Fuente: elaboración propia

La humanidad ha utilizado la BT desde la antigüedad hasta la época moderna, de un modo empírico, sin base científica. Desde aproximadamente el año 1800 a.C., el hombre ya utilizaba la BT, realizando por ejemplo (p.ej.) fermentaciones de levaduras para la fabricación de vino, pan, queso, etc. Sin embargo, a lo largo de los años, las técnicas de manipulación de los seres vivos se ampliaron, promoviendo un desarrollo significativo en áreas como la agricultura, medicina, industria farmacéutica y química, etc. Así, en la actualidad, la utilización de BT ha posibilitado el surgimiento de productos como vacunas, anticuerpos (Abs), enzimas y hormonas [2].

En la tabla 1 se recogen algunos de los avances científicos alcanzados a lo largo del tiempo desde que surgió la BT.

Introducción

Tabla 1. Avances biotecnológicos

AÑO	USO DE BIOTECNOLOGÍA
6000 a.C	Las civilizaciones sumeria y babilónica ya conocían cómo elaborar cerveza.
4000-2000 a.C	Egipto: producción de cerveza y pan usando la técnica de fermentación, por medio de la levadura.
1440-1400 a.C	Fermentación espontánea mosto de la uva; fabricación de queso, cultivo de champiñones, alimentos y bebidas fermentadas; tratamiento de aguas residuales. *
Hitos científicos que han sentado las bases de la BIOTECNOLOGÍA CONTEMPORÁNEA	
1322	Caballos de una raza superior sanos son inseminados artificialmente por un líder árabe.
1676	Inicio de la microbiología: Van Leeuwenhoek y Hooke (siglo XVII) describen los "animáculos"(1).
1760-1800	Cruce de plantas de especies diferentes por Joseph Gottlieb Koelreuter. Primera administración de la vacuna contra la viruela.
1859-1900	Charles Darwin: "Teoría de la Evolución de las especies por selección natural". Surge la Genética. Gregor Mendel: patrones de la herencia. Cruce de especies diferentes de algodón → variedad superior de la planta. Louis Pasteur: fermentaciones causadas por acción de microorganismos. Alexander Fleming descubre la cromatina. Eduard Buchner: conversión del azúcar en alcohol en ausencia de organismos vivos. "Edad de oro bacteriología"→ técnicas microscópicas, asépticas, esterilización y pasteurización, cultivos puros en medios de cultivo de laboratorio.
1900	Bioquímica y microbiología convergen → bases enzimáticas y metabólicas procesos de fermentación. Procedimientos industriales para producir enzimas (invertasa, proteasas, amilasas, etc.) (1). La mosca de la fruta, la <i>Drosophila melanogaster</i> es usada en los primeros estudios de genes.
1906	Surge el término "genética". Descubrimiento de eritropoyetina.
1919-1930	Palabra biotecnología usada inicialmente por Karl Ereky. 1 ^{ra} administración de extracto pancreático. Descubrimiento de penicilina (1928).
1941-1950	Producción y uso de antibióticos (penicilina por ej), ácidos orgánicos, esteroides, polisacáridos y vacunas (1). Término ingeniería genética usado por primera vez (1942). ADN estructura responsable transmisión información genética (1944).
1950-1969	Watson y Crick: estructura del ADN (genética moderna) (1953). Enzima ADN polimerasa I. Replicación del ADN (1956). ADN producido por primera vez en un tubo de ensayo (1958). Enzima sintetizada <i>in vitro</i> por vez primera (1969).
1970-1980	Tecnología ADN recombinante <i>in vitro</i> : Ingeniería Genética (1). Identificación enzimas de restricción (nucleasas específicas); inicio clonación molecular de genes (1970). Composición ADN humano 99% similar a la de chimpancés y gorilas (1972). Primeros anticuerpos monoclonales (mAbs) (1975).
1981-1989	Aprobación 1 ^{ra} insulina humana producida por bacterias genéticamente modificadas (1982). Clonación del virus VIH y secuenciación completa de su genoma (1984). 1 ^{ra} vacuna recombinante contra hepatitis B. Primera droga contra cáncer producida a través de biotecnología (1986).
1990-2000	Proyecto Genoma Humano. Primer tratamiento de terapia génica (1990). Descubrimiento primer gen cáncer de mama (1994). Secuenciación completa de genoma organismo vivo diferente de virus (1995). Clonación copias idénticas de corderos (1996). Nacimiento oveja Dolly, 1 ^{er} animal clonado de una célula adulta (1997). Descubrimiento de células-tronco embrionarias humanas. Secuenciación genoma completo animal: el gusano <i>C elegans</i> (1998). 1 ^{er} mAb aprobado por FDA: Rituximab (1997).

<p>2001-2009</p>	<p>Eutanasia oveja Dolly. Primera reglamentación de un producto para terapia génica (2003). Primera mascota clonada: un gato. Genoma del ratón de laboratorio (2004). Medicina para problema cardíaco exclusivo para raza negra. Genoma del perro (2005) (2). Primera vacuna fabricada en una planta (2006). Vacunos clonados y transgénicos que portan gen que codifica para insulina humana. Gestación 1^{er} clon equino América latina. Transgénicos: Argentina siembra maíz con características acumuladas. Brasil autoriza un maíz GM por primera vez (2007). Proyecto Genoma Personal (PGP) (genomas de diez voluntarios) (3). Proyecto 1.000 Genomas (secuencias de dos personas de grupos étnicos distintos al caucásico: un nigeriano y un chino (4). 1^{ra} rosa azul. Vacas que dan leche con hormona de crecimiento bovino (2008). Secuenciación genoma bovino de vaca Hereford. Clon de camello. Clon del toro campeón de la raza Brangus. Secuencia completa del genoma del sorgo, del maíz y del cerdo doméstico. Mapeo del genoma de todos los rinovirus causantes del resfriado común. Descubrimiento bacterias vivas bajo glaciario de la Antártida. Aprobación fármaco (antitrombina) producido en cabras. Siembra de algodón con características acumuladas (resistencia a insectos y tolerancia a herbicida) (2009).</p>
<p>2010-2016</p>	<p>Secuenciación genoma completo de la frutilla silvestre, soja, durazno, manzano, ricino y una gramínea del grupo del trigo y la cebada. Secuenciación genoma de toro cebú. Comercialización de enzimas para producción etanol celulósico. Clonación espermatozoides. Célula controlada por genoma sintético. Clonación de caballo. 15 años de cultivos GM en agricultura argentina (2010). Secuenciación del genoma de la papa y de Medicago truncatula (leguminosas). Creación de cerdo transgénico capaz de producir órganos para trasplantes a humanos. Argentina, bovino genéticamente modificado del país (2011). Genoma del gorila, cerdo y jabalí, tomate, melón, cebada, pera, sandía y banana. Aprobación 1^{er} medicamento producido por zanahorias genéticamente modificadas. Siembra de cultivos GM en 28 países. Argentina autoriza siembra comercial de maíces con 4 y 5 genes acumulados para control de malezas e insectos (2012). Genoma del garbanzo. Secuencia y ensamblaje del genoma del kiwi (2013) (5). ADN artificial con un nuevo alfabeto (ATGC). Bacteria con ADN artificial. Células β para curar diabetes (2014) (6). Mecanismo celular puede mejorar eficacia de vacunas contra el sida (poxvirus, inducen respuestas inmunes específicas frente a antígenos del VIH) (7). Aprobación del primer biosimilar: Zarxio® (2015). Diseño de nanomateriales para limpiar agua. Desarrollo maíz cisgénico. Avances reprogramación células (2016).</p>

- (1) Enrique Iáñez Pareja. Biotecnología. Instituto de Biotecnología Universidad de Granada.
<http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/introbiotec.htm#01>
- (2) <http://www.shireargentina.com.ar/shire-argentina/biotecnologia.aspx>
- (3) www.personalgenomes.org.
- (4) <http://www.eluniverso.com/2008/12/25/1/1384/BB25101D77264F648E35AE89568E1ED7.html>
- (5) <http://porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1¬e=100>
- (6) Sergio Ferrer y Rocio P. Benavente. Los diez descubrimientos científicos más importantes de 2014. Science. Noticias de Tecnología. 18.12.2014
- (7) Química.es >> <http://www.quimica.es/noticias/152011/ Un mecanismo celular puede mejorar la eficacia de las vacunas contra el SIDA> 04.03.2015

Introducción

1.2. Aplicaciones de la biotecnología

La BT se aplica fundamentalmente en tres sectores: agroalimentario, salud y energía-petroquímica-minería. Así, dentro del *sector agroalimentario* ha dado lugar a avances como la propagación de especies conocidas, desarrollo de nuevas variedades vegetales, mejora de la reproducción animal y construcción de nuevos y mejores microorganismos en la industria de la alimentación. Dentro del *sector de la salud*, a nivel de la industria farmacéutica, se destacan como productos de esta tecnología: antibióticos, hormonas como la insulina y la eritropoyetina, inmunomoduladores, factores estimulantes de colonias, interleuquinas, enzimas como uroquinasa y vacunas (hepatitis B, Chagas, Leishmania, malaria, rabia, aftosa, virosis aviaria, etc.) entre otros. Además, dentro del ámbito de la industria química y farmacéutica, son de trascendental importancia las técnicas de inmunodiagnóstico sobre fase sólida que permiten efectuar evaluaciones de estados fisiológicos (glucemia, fertilidad, embarazo, etc.) o de distintos estados patológicos. Así, por ejemplo, el uso de la tecnología de anticuerpos monoclonales (mAbs) ha abierto nuevas posibilidades en el inmunodiagnóstico, la inmunoterapia, la preparación industrial de antígenos (Ags) y la purificación de proteínas. También posibilita el diagnóstico de distintos tipos de patologías de forma simple y barata (herpes, rotavirus, colitis enteropatogénica, etc.), así como la disponibilidad de mejores vacunas (peste africana porcina, diarrea infecciosa, seudorrabia, rabia, etc.) o de agentes antivirales como los interferones, además de dar lugar a mejoras en el control de la contaminación ambiental mediante el uso de microorganismos genéticamente adaptados o diseñados por técnicas de ingeniería genética.

Dentro del *sector energía-petroquímica-minería*, la BT ha posibilitado la mejora en el aprovechamiento de fuentes de energías renovables mediante el uso de biopolímeros, reducción del número de etapas de síntesis de algunos productos, generación de menor cantidad de residuos, mejoras en los procesos de concentración y purificación de metales por lixiviación así como en la recuperación secundaria y terciaria del petróleo de yacimientos semiagotados [3].

Por tanto, y a modo de resumen, se puede decir que la BT supone en la actualidad uno de los ámbitos más importantes de investigación y desarrollo, estando basados en la misma un número cada vez mayor de descubrimientos científicos y dando lugar a la obtención y/o modificación de productos y procesos de esencial importancia en el transcurso de la vida.

2. MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS

2.1. Definición

La BT ha crecido y evolucionado durante los últimos años hasta tal punto que el número de profesionales que trabajan en las distintas áreas relacionadas directamente con ella es cada vez mayor.

Dentro de las diferentes áreas que engloba la BT, se encuentra el desarrollo de medicamentos biotecnológicos (MB).

La creación de MEDICAMENTOS INNOVADORES surge de la necesidad de combatir enfermedades debilitantes y potencialmente mortales que aquejan a nuestra sociedad, y cuyo efecto sería mejor y más efectivo que el esperado con los medicamentos tradicionales (de síntesis química). En este caso, la INNOVACIÓN consiste en poder desarrollar un fármaco con ayuda de procesos biotecnológicos, con un alto grado de calidad, a un coste competitivo y cuya función sea capaz de satisfacer las necesidades para las cuales fue desarrollado [4].

No existe a nivel mundial una definición y clasificación unánimes de medicamentos biológicos (MBio) y MB. La autoridad regulatoria sanitaria de los diferentes países establece en cada caso la definición que utilizará y en base a ella realiza el tratamiento de las especialidades farmacéuticas correspondientes a productos biológicos/biotecnológicos a la hora del registro y su vigilancia en el mercado [5].

Considerando como definición de MB la dada por la Agencia Europea del Medicamento (EMA), se puede decir que los MB pueden ser proteínas

Introducción

recombinantes, mAbs, vectores para el transporte de material genético, fragmentos de Abs, ácidos nucleicos, oligonucleótidos antisentido, vacunas, etc. que comparten la característica de ser productos medicinales obtenidos a partir de técnicas de BT (r-DNA, expresión génica controlada, métodos basados en Ab, etc.) [6].

En España el MBio se define en el Real Decreto 1345 del año 2007 en el que también se indica que un MBio es un producto cuyo principio activo es biológico y cuyos materiales de partida son toda sustancia de origen biológico tales como los microorganismos, órganos y tejidos de origen vegetal o animal, las células o fluidos (incluyendo sangre y plasma) de origen humano o animal y los diseños celulares biotecnológicos (sustratos celulares sean o no recombinantes incluidas las células primarias) [7].

Por otra parte, la clasificación de la OMS acerca de los productos biológicos de carácter sanitario, los distingue en:

- Alérgenos
- Citoquinas y factores de crecimiento
- Enzimas
- Derivados de plasma y sangre humana
- Inmunoglobulinas (Igs) (incluidos mAbs)
- Sueros inmunes
- Vacunas, toxoides
- Productos de fermentación (se incluyen aquéllos obtenidos por técnicas de ADN recombinante)
- Oligonucleótidos anti-sentido.

Así, los MB actualmente constituyen la base para la prevención o el tratamiento de diversas enfermedades [8] y abren nuevas expectativas para el tratamiento de enfermedades para las cuales, y hasta ahora, los recursos terapéuticos eran limitados; convirtiéndose en menos de 10 años en el tratamiento de elección para enfermedades tan graves como el cáncer, la artritis reumatoide (AR), el infarto de miocardio y otras para las que con frecuencia existían pocas alternativas [9]. Estos fármacos han permitido reducir la mortalidad y la morbilidad y han mejorado la calidad de vida de millones de pacientes con enfermedades crónicas, además de

contribuir al desarrollo de nuevos métodos diagnósticos, siendo así considerados como la punta de lanza en la innovación de la terapéutica farmacológica.

Cerca de un 20 % de los fármacos de tipo innovador introducidos actualmente al mercado o lo que es lo mismo, 1/5 del total de fármacos lanzados cada año al mercado, son obtenidos por técnicas de BT, aunque si se tienen en cuenta los fármacos que se encuentran en fase de desarrollo, los fármacos biotecnológicos (FBIO) pueden representar el 50 % de los fármacos en fase de investigación clínica [6]. La investigación tanto experimental como clínica con los biotecnológicos duplica a la de los de síntesis química. Desde el año 2002, el porcentaje de moléculas, obtenidas por BT, autorizadas, supera a las obtenidas por síntesis química, estimándose que en la actualidad, los FBIO representan alrededor del 15 % del arsenal terapéutico disponible. Cerca del 30-40 % de los proyectos internacionales de investigación que se están desarrollando se realizan con MB, cifra que probablemente se incrementará en las próximas décadas [9]. De esta forma, los FBIO orientados hacia líneas de investigación en el área de oncología, hematología, neurología, enfermedades inflamatorias y metabólicas parecen ser el futuro de la medicación denominada a la carta.

2.2. Características de los medicamentos biotecnológicos. Diferencias con los medicamentos de síntesis química.

Como se ha comentado anteriormente, para la obtención de MB se suele emplear la tecnología del ADN recombinante e hibridomas, generalmente incorporando el material genético a organismos vivos (bacterias, hongos, etc.), lo que permitirá que estos organismos sinteticen un producto terapéutico concreto.

Los MB, incluidos los biosimilares, presentan características que los diferencian claramente de los medicamentos de síntesis química (MSQ) desde el momento en que comienza su investigación, hasta su utilización clínica y sus aspectos regulatorios.

Introducción



Figura 3. A. Ilustración 3D de ADN dentro de la cápsula. Fuente: fmdiabetes.org B. Medicamentos de síntesis química. Fuente: demedicina.com

El origen y la estructura de los MB marcan de manera especial características tales como sus propiedades farmacológicas, utilización práctica, aspectos regulatorios y seguridad, entre otras, que los diferencian de los MSQ. Por ello, muchos de los conceptos que se aplican a estos últimos no son extrapolables a los MB. Por ejemplo, la sustitución de un medicamento por otro: es distinta para un MSQ por un genérico que en el caso de un biotecnológico por un biosimilar. Los peligros que caracterizan a esta última sustitución son numerosos y se deben fundamentalmente a las diferencias que existen entre un MB y otro similar [9].

✦ Las principales diferencias entre MB y MSQ son las que se enumeran a continuación:

1. Los MB son sustancias terapéuticas semejantes a las proteínas humanas o que interactúan con éstas. Son producidos a partir de organismos vivos, o extractos de éstos, como bacterias, hongos o células de animales o humanas, con lo cual el *proceso de producción* es *mucho más complejo* que el de los MSQ. Esta es la **diferencia fundamental con los medicamentos tradicionales**. El primer paso para desarrollar un MB consiste en modificar genéticamente una célula o microorganismo para introducir una secuencia de código genético que produzca la proteína elegida. La célula – o microorganismo – es conservada, y réplicas de ésta son cultivadas durante el proceso de fabricación. Al contrario de los medicamentos comunes que se desarrollan a través de procesos de extracción con reactivos que eliminan cualquier contaminación, los MB son elaborados utilizando materia prima procedente de dos orígenes: **a.**

componente activo de origen biológico: extraído de microorganismos, órganos, tejidos de origen vegetal o animal, células o fluidos de origen humano o animal; **b.** componente activo de origen biotecnológico: generalmente proteínas obtenidas a partir de células modificadas genéticamente para producirlas. Así, el hecho de que los MB tengan generalmente como material primario un cultivo celular de miles de litros con reactivos biológicos, es una posible fuente de contaminación viral, por lo que los procesos de purificación son indispensables [2][10].

Los MB desde el punto de vista químico son esencialmente cadenas polipeptídicas, proteínas o glucoproteínas que se obtienen a partir de procesos de producción que pueden durar meses y que comprenden varias etapas complejas. Éstas van desde la definición de la secuencia de ADN que codifica la proteína deseada, pasando por el desarrollo del banco de células en el cual se producirá la expresión de esta secuencia para obtener la proteína recombinante que posteriormente será purificada y analizada adecuadamente. Es fundamental que la unión de los aminoácidos, así como la posterior glucosilación de la molécula proteica, se efectúe de forma adecuada para lograr el plegamiento correcto que determina la estructura tridimensional del compuesto, con el fin de conservar los procesos farmacodinámicos y farmacocinéticos inherentes al producto, garantizando además su eficacia, tolerancia y seguridad [8]. La complejidad de este proceso convierte a la molécula final en un producto totalmente dependiente de cada una de las etapas del proceso de fabricación, de manera que pequeños cambios (en los excipientes, uso de nuevos bancos de células, etc.) podrían dar lugar a alteraciones clínicamente significativas en términos de seguridad y eficacia del producto final.

2. Los MB tienen una *estructura molecular mucho más compleja* y de *mayor tamaño* que los MSQ, además, el *componente activo* es *heterogéneo*. Esto implica que su análisis, caracterización y proceso de producción sea más complicado que en los otros fármacos, y que, al contrario que estos últimos, los biológicos no puedan replicarse de manera exacta, ya que su estructura y características van a depender en gran medida de determinados factores como el método de producción, el tipo de línea celular empleada por el fabricante, el transporte o el

Introducción

almacenamiento. Esto va a determinar que incluso pueda existir cierto grado de variabilidad, controlada y admitida por las autoridades sanitarias, entre los distintos lotes del mismo fármaco [11].

Los MB en muchos casos contienen moléculas de carbohidratos que matizan su actividad biológica. La cadena proteica puede presentar además, hélices en distinto número, tamaño y configuración. Todo ello da lugar a una estructura compleja y con frecuencia inestable, con un tamaño de hasta 1000 veces el de las moléculas de síntesis química. La actividad biológica de estas moléculas estará condicionada en gran medida por su estructura tridimensional, por el grado y el patrón de glicosilación en el caso que se trate de una glicoproteína, y el perfil de isoformas del producto final. Las moléculas de un MB son más diversas que las moléculas pequeñas que componen los medicamentos convencionales [2] [10]. Por otro lado, esta estructura tan compleja hace que una sola molécula desempeñe varias funciones y que distintas partes de las proteínas presenten diferentes funciones. En un Ab IgG el sitio de fijación del antígeno (Ag) se localiza en una parte, mientras que el lugar de fijación del complemento y las interacciones con los macrófagos en otro nivel y la glicosilación en otro. Por tanto, la identificación completa de una molécula de un MB es un proceso complejo que requiere un análisis extenso y difícil [9].

3. La diferencia fundamental entre los MSQ y los MB es el riesgo de ***inmunogenicidad*** inherente a éstos últimos. Al tratarse de moléculas biológicamente activas derivadas de células vivas, tienen el potencial de activar la respuesta inmunitaria y de desarrollar dicha inmunogenicidad, con las posibles consecuencias clínicas que se pueden derivar de este hecho [2].

La inmunogenicidad es una característica muy importante a la hora de desarrollar un nuevo MB. Se refiere al proceso mediante el cual, el cuerpo humano genera una respuesta a la introducción de una proteína extraña (u otra sustancia). La respuesta humana a una sustancia extraña, habitualmente consiste en producir Abs que se unen a las proteínas extrañas, inactivándolas y formando un complejo Ag-Ab, el cual puede dar lugar a la producción de serias complicaciones y efectos adversos [6].

Así, dicha inmunogenicidad, representa la preocupación de seguridad más importante relacionada con los productos biológicos diferentes a vacunas quedando los requisitos de evaluación del potencial inmunógeno descritos en directrices específicas (*Guideline on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins*) [12] [13]. Principalmente, se asume que es imposible de caracterizar en ausencia de pruebas clínicas en humanos y sigue siendo el factor principal para el fracaso de medicamentos en pruebas pre-clínicas.

Entre los **factores que afectan la inmunogenicidad** se pueden citar: la secuencia de aminoácidos del MB; la naturaleza de la proteína (produciendo menor inmunogenicidad las proteínas endógenas que las proteínas exógenas); la glicosilación; la pureza del medicamento (material celular patrón, presencia de agregados y contaminantes); los excipientes empleados y su estabilidad. La aparición de inmunogenicidad también está relacionada con la sustancia activa y la formulación del MB. Existe mayor riesgo de inmunogenicidad ante el empleo de dosis elevadas de MB. De igual forma, la administración del MB por vía subcutánea (sc) genera mayor riesgo de inmunogenicidad que la administración intravenosa (i.v.) [9] [14]. El uso de tratamientos prolongados también puede dar lugar a la aparición de inmunogenicidad.

Las consecuencias del desarrollo de inmunogenicidad son variadas y pueden ir desde reacciones leves relacionadas con la reducción o pérdida de eficacia a largo plazo, debido al desarrollo de Abs neutralizantes o incluso reacciones graves de inmunogenicidad cruzada con proteínas del propio individuo. Además, debido a su mayor tamaño, complejidad estructural y a aspectos relacionados con el proceso de producción, la reacción inmunitaria que activan es diferente en cada fármaco [11].

4. Un MB se somete a alrededor de 250 **pruebas del control de proceso** durante el proceso de elaboración para garantizar su eficacia, en comparación con las alrededor de 40-50 pruebas que se efectúan para un MSQ de moléculas pequeñas [15] [16]. Este proceso de elaboración parte de una línea de células genéticamente modificadas, por tanto de naturaleza única, e implica procesos de fermentación y purificación que deben ser estrictamente controlados para garantizar la calidad, seguridad y

Introducción

eficacia del producto final. Es la naturaleza de cada línea celular y la complejidad del proceso de fabricación, lo que determina que cada MB se pueda considerar como un medicamento único [10] [11].

5. Los MB, por el momento, *se administran mayoritariamente mediante inyección o infusión en medio hospitalario* y no pueden administrarse por vía oral como sucede mayoritariamente con los FSQ convencionales [15].

6. **Farmacocinética.** El estudio de las características farmacocinéticas de los MB es complejo [9] [16]. La determinación de péptidos o proteínas en fluidos biológicos resulta difícil por su similitud con péptidos endógenos y proteínas que provienen de nutrientes. Sin embargo, los avances en las técnicas analíticas lo han hecho posible, y cada vez más asequible, si bien hay que recurrir a procedimientos complejos como inmunoensayos y espectrometría de masas entre otros.

Cuando se administra un MB no se conoce bien cuál es la cantidad de fármaco que va a alcanzar el sitio de acción y cuáles son las consecuencias que se pueden derivar de ello. Algunos MB son similares a proteínas endógenas y, en principio, cabría esperar que sus efectos fueran parecidos. Sin embargo, esto no sucede así porque su mecanismo de acción puede diferir de las sustancias endógenas [9].

La farmacocinética de los MB (Tabla 2) presenta una serie de características claramente diferenciadas [9] [16]:

Tabla 2. Características farmacocinéticas de los MB. Fuente: [9]

Biodisponibilidad oral muy baja
Difícil distribución tisular
Degradación por enzimas proteolíticas
Excreción rápida a través del riñón
Generación de anticuerpos neutralizantes
Vida media de eliminación corta
Frecuente fenómeno de “flip-flop” cuando se usa vía sc.

7. **Precio.** Los MB en algunos casos son extremadamente caros, por lo que en muchos casos se está limitando su uso por diferentes gobiernos autonómicos, creando protocolos médicos en ocasiones alejados de la que sería la práctica médica ideal, debido a que su precio multiplica en muchos casos por 00 el de la terapia que se estaba manteniendo hasta el momento. La dificultad de producción y la inexistencia de una forma rápida, barata y accesible para producirlos, hace que se encarezcan mucho los costes [17].

8. **Efectos adversos.** El perfil de seguridad y de eficacia de los MB depende en gran medida de la consistencia de los aspectos de calidad y de su monitorización durante los procesos de obtención y fabricación [9] [18]. Las diferencias entre los perfiles de seguridad de los MB y los MSQ han sido revisadas recientemente por investigadores [9] [19] del *Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences* de Holanda. De acuerdo con sus datos, desde enero de 1995 hasta junio de 2008 se comercializaron 174 MB que se asociaron a problemas de seguridad agrupados como trastornos generales, problemas en el lugar de administración (infusión i.v.), infecciones e infestaciones, que supusieron el 50 % del total de efectos adversos; otros problemas son trastornos del sistema inmune y neoplasias benignas, malignas y no especificadas. Los efectos adversos de los MSQ se concentran en alteraciones hepatobiliares, sanguíneas y del sistema linfático, alteraciones cardíacas y del sistema nervioso central.

La tabla 3 muestra un resumen de las principales características diferenciales entre los MSQ y los MB.

Tabla 3. Principales características diferenciales entre MSQ y MB.

CARACTERÍSTICAS	MSQ	MB
Estructura	No muy compleja. Bien caracterizada	Muy compleja. No bien caracterizados
Peso molecular	Bajo (< 1 kD)	Alto (> 50 kD)
Obtención	Síntesis química	Síntesis a partir de células/organismos vivos
Proceso de producción	Controlado. Pocos pasos críticos en su síntesis	Muchos pasos críticos en su síntesis
Estructura del compuesto	Simple. Homogeneidad en los principios activos. Bien caracterizada	Complejas mezclas heterogéneas. Menos caracterizada
Dosis	Dosis máxima tolerada	Dosis biológica óptima
Grado de inestabilidad	Menor	Mayor (depende de las células, cepa o cultivos empleados)
Curva dosis-respuesta	Lineal	No lineal
Mecanismo de acción	Conocidos. Generalmente específicos.	Variables o aún desconocidos
Eliminación	Por metabolización	Por degradación
Administración	Usualmente vía oral	Generalmente vía parenteral (IV, IM, SC, IVT)
Riesgo de inmunogenicidad	Bajo	Alto
Costes de producción/comercialización	Menores	Mayores
Monitorización terapéutica	Más simple	Más compleja
Medicamentos no innovadores	Genéricos	Biosimilares

2.3. Marco legal: la regulación de los medicamentos biotecnológicos

Desde la creación de la EMEA en 1995, la evaluación y autorización de los medicamentos obtenidos mediante tecnología del ADN recombinante se realiza por requerimiento legal, mediante el procedimiento centralizado. Es decir, efectuado en todos los países de la Unión Europea (UE) a la vez y coordinado por la EMEA. El período de evaluación tiene una duración de 210 días y concluye con la opinión científica del Comité de Medicamentos para Uso Humano (CHMP; *Committee for Human Medicinal Products*) [9] [20] [21].

El procedimiento centralizado de autorización está reglamentado por la Regulación (EC) N°. 726/2004 [22]. Este procedimiento es obligatorio para los medicamentos que se describen a continuación:

- Productos obtenidos por BT, es decir, el uso de organismos vivos.
- Medicamentos de terapia avanzada, es decir, basados en la manipulación de genes, células o tejidos.
- Medicamentos huérfanos, es decir, para el tratamiento de enfermedades raras.
- Productos que contengan cualquier nueva sustancia destinada a tratar el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), el cáncer, los trastornos neurodegenerativos, la diabetes u otras enfermedades inmunitarias y enfermedades víricas.

El procedimiento es opcional cuando se trate de una nueva sustancia activa, o cuando se considere una innovación de interés en el ámbito de la UE.

En la tabla 4 quedan recogidas las directrices más relevantes para productos biotecnológicos.

Introducción

Tabla 4. Título y referencia de las directrices aplicables a los MB (incluidos los biosimilares).

TÍTULO	N° DE REFERENCIA
Producción y control de calidad de productos medicinales obtenidos por tecnología del ADN recombinante.	3AB1A
Guía de especificaciones: procedimientos de ensayo y criterios de aceptación para productos biotecnológicos/biológicos.	CPMP/ICH/365/96 ICH Topic Q6B
Calidad de productos biotecnológicos: obtención y caracterización de sustratos celulares usados para producción de productos biotecnológicos/biológicos.	CPMP/ICH/294/95 ICH Topic Q5D
Calidad de productos biotecnológicos: análisis de la expresión creada en líneas celulares usadas para la expresión de r-ADN derivado de productos proteicos.	3AB2ACPMP/ICH/139/95 ICH Topic Q5B
Guía sobre productos biotecnológicos/biológicos sujetos a cambios en su proceso de fabricación.	CPMP/ICH/5721/03 ICH Topic Q5E
Calidad de productos biotecnológicos: Análisis de estabilidad de productos biotecnológicos/biológicos.	3AB5A CPMP/ICH/138/95 ICH Topic Q5C
Calidad de productos biotecnológicos: Evaluación de seguridad viral de productos biotecnológicos derivados de líneas celulares de origen humano o animal.	CPMP/ICH/295/95 ICH Topic Q5A
Estudio de validación virus: diseño, contribución e interpretación de estudios de validación, inactivación, eliminación virus	CPMP/BWP/268/95 3AB8A
Producción y control de calidad de anticuerpos monoclonales (excluye los destinados a uso diagnóstico)*	3AB4a
Necesidad de revisar la guía de producción y control de calidad de anticuerpos monoclonales (3AB4A, Revision December 1994)*.	CHMP/BWP/64/04
Producción y control de calidad de productos citoquinas obtenidos por procesos biotecnológicos.	3AB3A
Calidad de la actividad biológica de sustancias obtenidas por expresión transgénica estable en plantas mayores.	CHMP/BWP/48316/06
Uso de animales transgénicos en la fabricación de productos medicinales biológicos para uso humano.	3AB7A
Medicamentos biológicos similares que contienen proteínas derivadas de biotecnología como sustancia activa: temas de calidad.	CHMP/49348/05
Medicamentos biológicos similares.	CHMP/437/04
*Marco conceptual presentando los argumentos para actualizar la directriz de anticuerpos monoclonales. Actualmente ya se ha elaborado un borrador de la nueva guía.	

2.4. Medicamentos biológicos comercializados en España

Actualmente, aproximadamente el 10 % de todos los principios activos comercializados en España (alrededor de 200 vs. 2.000) como medicamentos, son biológicos, de los que alrededor de un 33 % son anticancerosos y/o inmunomoduladores, un 21 % son fármacos para el sistema hematopoyético (antitrombóticos, hemostáticos, antianémicos), un 11 % son fármacos utilizados en metabolopatías y otro 11 % en terapia antiinfecciosa (tabla 5); de ellos, unos 17 se han autorizado como medicamentos huérfanos.

En la tabla 5 quedan recogidos los grupos de medicamentos biológicos comercializados en España en los últimos 25 años (1990-2015).

Introducción

Tabla 5. Medicamentos biológicos comercializados en España en los últimos 25 años (1990-2015).

GRUPO TERAPÉUTICO	GRUPO
A10AB	Antidiabéticos: insulinas de acción rápida
A16AB	Otros productos aparato digestivo y metabolismo: enzimas
B01AB	Antitrombóticos: heparinas y derivados
B01AC	Antitrombóticos: antiagregantes plaquetarios (excluida heparina)
B01AD	Antitrombóticos: enzimas
B01AE	Antitrombóticos: inhibidores directos de la trombina
B02AB	Hemostáticos: antifibrinolíticos inhibidores de la proteinasa
B02BD	Hemostáticos: factores de coagulación sanguínea
B02BX	Hemostáticos: otros
B03XA	Antianémicos: factores estimulantes de la eritropoyesis
B06AB	Otros preparados hematológicos
D03AX	Cicatrizantes: debridantes de úlceras cutáneas
G03GA	Gonadotropinas
H01AC	Somatropina y análogos
H01AX	Antagonistas de la somatropina
H05AA	Hormonas paratiroideas
J06BB	Inmunoglobulinas específicas
J07AE	Vacunas bacterianas
J07BA	Vacunas virales
L01XC	ANTINEOPLÁSICOS: ANTICUERPOS MONOCLONALES
L03AA	Inmunoestimulantes: agentes estimulantes de colonias
L03AB	Inmunoestimulantes: interferones
L03AC	Inmunoestimulantes: interleukinas
L03AX	Inmunoestimulantes: otras citocinas e inmunomoduladores
L04AA	Inmunosupresores: selectivos
L04AB	Inmunosupresores: inhibidores del factor de necrosis tumoral
L04AC	Inmunosupresores: inhibidores de interleukinas
M03AX	Relajantes musculares de acción periférica: otros
M05BC	Proteínas morfogénicas del hueso
M05BX	Fármacos que afectan a la mineralización: otros
M09AB	Otros fármacos para alteraciones músculo-esqueléticas: enzimas
N02BG	Otros analgésicos y antipiréticos
R03DX	Otros antiasmáticos sistémicos
R07AA	Otros productos aparato respiratorio: surfactantes pulmonares
R07AX	Otros productos aparato respiratorio: otros
S01LA	Oftalmológicos: agentes antineovascularizantes
S01XA	Oftalmológicos: otros
V01AA	Extractos alérgicos
V03AF	Agentes destoxificantes para tratamientos antineoplásicos
V04CD	Agentes de diagnóstico: pruebas funcionales
V08DA	Medios de contraste para ultrasonidos
V09EB	Radiofármacos para diagnóstico
V10XX	Radiofármacos terapéuticos

2.5. Gasto farmacéutico en medicamentos biotecnológicos

Como ya ha sido comentado anteriormente, los MB han supuesto una revolución para el tratamiento de muchas patologías graves que contaban con escasas alternativas terapéuticas. Sin embargo, es necesario tener en cuenta la considerable inversión en I+D y el elevado coste del complejo proceso de producción que supone el desarrollo de un nuevo MB, junto con el riguroso control de calidad que se debe llevar a cabo durante la producción del mismo, y el coste asociado a su distribución (por ejemplo, fármacos termolábiles) cuando se compara con MSQ [23]. En el año 2007 investigadores de la Universidad de Tufts [9] [24] publicaron un artículo en el que estimaban el coste de los MB innovadores, mediante el cual, aunque con ciertas limitaciones derivadas del reducido número de la muestra (17 medicamentos), muestran la magnitud de los costes del proceso de I+D de los MB. Una vez valorado tanto el coste monetario de las distintas fases de la I+D de los MB, como las probabilidades de éxito del proyecto y el coste de capital asociado a este tipo de inversión (el 11,5 % anual), los autores cifraron en 1.241 millones de dólares el coste de I+D de un MB, frente a los 1.318 millones de dólares que los mismos autores estimaron como el coste de I+D de medicamentos tradicionales, una cifra comparable e incluso ligeramente superior a la de los MB (Figura 4) [9].

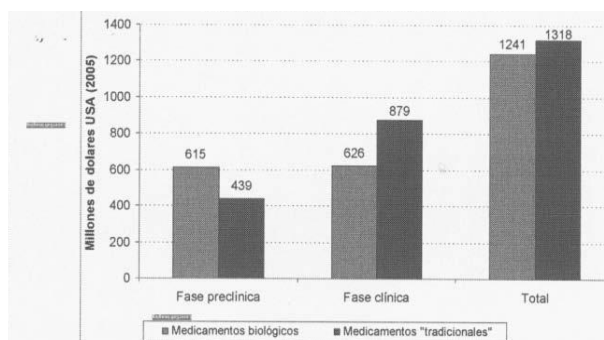


Figura 4. Los costes de la investigación de nuevos medicamentos. Fuente: [24].

Introducción

Pero además, ha de considerarse que la protección a través de las patentes de estos medicamentos dio lugar a que los precios por las innovaciones protegidas ascendieran alarmantemente y el periodo de tiempo que dura la comercialización del nuevo FBIO en solitario por parte de una única industria sin la existencia de competidores, se encuentra limitado debido a la cesión de una autorización de comercialización temprana a dichos competidores (Figura 5). Por tanto, la mayoría de industrias dedicadas al desarrollo de nuevos FBIO, apoya la necesidad de disponer de mayores periodos de comercialización en exclusiva, y la entrada prematura de competidores constituye un quebranto importante en las condiciones de comercialización de las innovaciones [9].

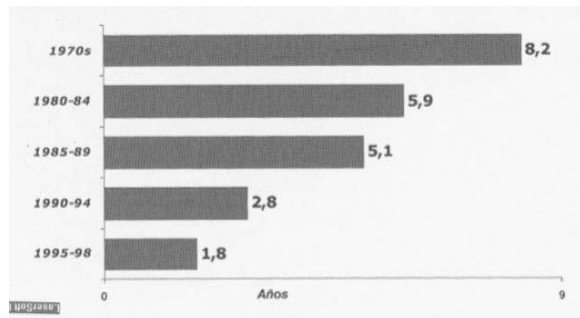


Figura 5. Tiempo de permanencia en el mercado. Fuente: [25].

A pesar de los hechos descritos anteriormente, las ventajas que presentan los FBIO frente a los FSQ hacen que en la actualidad la biotecnología aplicada a la sanidad sea un sector al alza, no solo en España sino en el resto de países desarrollados, al crecer el número de proyectos de biotecnología sanitaria. Así queda descrito en el Informe Anual de la Asociación Española de Bioempresas (ASEBIO) 2014 [26].

La industria farmacéutica española invierte en torno a 200 millones de euros anuales (alrededor del 20 % de su gasto total en I+D) en el ámbito biotecnológico. A su vez, unas 60 nuevas moléculas de origen recombinante se encuentran en fase de desarrollo en nuestro país, con más de 275 ensayos clínicos en marcha, principalmente en las áreas de

oncología, inmunología y hematología. Según datos de la OMS, un 40 % aproximadamente de las peticiones de asignación de nuevas denominaciones comunes internacionales, INNs (International nonproprietary names) corresponden a MB [27].

En nuestro país dicho crecimiento ha significado más de un 40 %, entre medicamentos (más de 200 nuevos MB), servicios de diagnóstico, tecnologías y plataformas de investigación. En los últimos 20 años los MB han ido teniendo un papel creciente en el tratamiento de muchas enfermedades, a pesar de que determinados precios son verdaderamente altos, llegando a alcanzar un coste de 16.000 € anuales por paciente tratado, o lo que es lo mismo, un coste 120 veces más caro que el de un tratamiento con FSQ. Incluso, y a modo de ejemplo, en Dinamarca se decidió incorporar un fármaco para combatir los melanomas metastásicos que tenía un precio de 100.000 € por paciente y que prolongaba la vida tres meses y medio. En 2006 salió al mercado otro fármaco para el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello, cuyo coste era de 110.000 \$ anuales o el MB Erlotinib, para el tratamiento del cáncer de páncreas, que prolongaba la vida de los pacientes 10 días costando cerca de 500.000 \$ anuales para un año más de vida (10 días por cada uno de los 36 pacientes) [28].

Así, y a pesar del elevado precio y el impacto creciente que tienen en la factura farmacéutica, 1/3 de los nuevos medicamentos aprobados, son MB. Según la AEMPS, en España ya hay autorizadas más de 2.000 presentaciones de MB en áreas terapéuticas tan variadas y críticas como el cáncer, hepatitis C, diabetes, esclerosis múltiple o artritis reumatoide [27]. Los 5 medicamentos más vendidos en el mundo tienen esa condición; entre los top 10 se encuentran 7, y entre los 100 primeros medicamentos por ventas, el 50 % corresponde a biomoléculas. Se estima que en la actualidad más de 400 millones de pacientes en todo el mundo se benefician ya de estos tratamientos [27]. Entre **1996-2005**: se comercializaron una media de 6 MB anualmente (9 % del total de fármacos comercializados). En **2005**: 85 MB disponibles en Europa (más del doble que en 1996). **2013-Abril 2014**: de 49 fármacos que recibieron opinión positiva del CHMP, **21 fueron biológicos**. Dentro del sector farmacéutico los porcentajes de este tipo de medicamentos son cada vez

Introducción

mayores y se espera lleguen al 20 % en 2017, de hecho, este tipo de biomoléculas suponen cerca del 50 % del pipeline de las compañías farmacéuticas; sólo en EE.UU. se están utilizando procesos biológicos para desarrollar más de 900 medicamentos destinados a un centenar de enfermedades distintas. Un 70 % del crecimiento del gasto sanitario se asocia al impacto de la incorporación de nuevas terapias y, muy especialmente, a la innovación farmacológica, que a su vez se concentra especialmente en la oncología y en los FBIO [29].

Son, por tanto, varias las razones por las cuales el gasto en MB crece, hasta tal punto que **en 10 años se ha multiplicado por 4** (Figura 6).

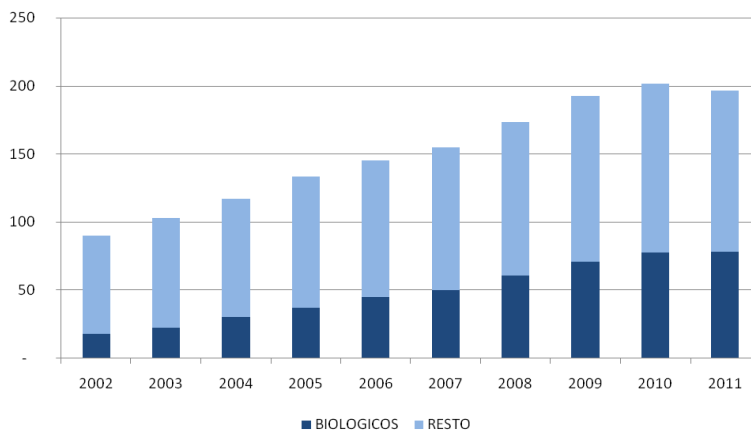


Figura 6. Gasto en MB. Fuente: [30].

Entre estas razones se encuentran:

- El **precio elevado de los MB**, superando en muchas ocasiones los 10.000 € por paciente.

Al ser medicamentos obtenidos mediante ingeniería genética, tienen un coste elevadísimo y un importante impacto económico en las cuentas de la sanidad. A continuación, y a modo de ejemplo, se dan cifras del gasto que supusieron este tipo de medicamentos para el Servicio Aragonés de Salud

en el año 2013 y el gasto general que supone el tratamiento de psoriasis con MB.

Ejemplo 1: de entre los 10 medicamentos que supusieron un mayor gasto para el Servicio Aragonés de Salud durante este año, seis eran de este tipo de medicamentos. Entre 2.000 y 2.200 pacientes aragoneses utilizaron los MB para la AR (adalimumab, etanercept e infliximab), fármacos que suponen un **coste medio por persona y año de entre 6.000 y 13.000 €** dependiendo del producto, el peso del paciente y la enfermedad (.000 € al mes por paciente). Según los cálculos del departamento de Sanidad, el número medio de pacientes tratados con fármacos oncológicos (bevacizumab y trastuzumab) todavía más caros, supuso un gasto de entre **3.000 y 4.000 € al mes por paciente** siendo tratados entre 250 y 300 pacientes al mes [31].

Ejemplo 2: actualmente los MB pueden representar hasta el 90 % del coste total en medicamentos de uso hospitalario en hospitales de referencia con unidades específicas de psoriasis. Además, el consumo de los mismos de un Servicio de Dermatología puede representar como media un 25-30 % del presupuesto total del Servicio, incluyendo todas las líneas de producción (hospitalización, cirugía, consultas externas, hospital de día médico, etc.) y capítulos presupuestarios (personal, prestaciones, fármacos, fungibles, etc.). El gasto actual de un Servicio de Dermatología de un hospital de referencia en MB, puede llegar a ser del 75 al 95 % del gasto en personal. En relación con los costes de personal, el coste anual para el sistema sanitario de un facultativo especialista en Dermatología, que no su retribución salarial, equivale al coste anual del tratamiento biológico de 4 pacientes en terapia continua, con cuentas de gasto en biológicos de entre **1 a 3 millones de euros anuales** en Servicios de Dermatología de hospitales de referencia [32].

- **El impacto presupuestario se produce en el ámbito hospitalario.** Así, por ejemplo, en la Comunidad de Madrid y en la Comunidad Autónoma Vasca, aproximadamente el 40 % del gasto hospitalario es debido a los MB, cifra que se extiende a todo el territorio español. Dicho gasto farmacéutico significa para España el 17,4 %, cifra cercana al 25 % si se incluyen los medicamentos de uso hospitalario [28]. En el año 2012, de

Introducción

los diez principios activos más consumidos en el ámbito hospitalario en la Comunidad de Madrid siete eran MB [33]. Además, ha de tenerse en cuenta que el carácter proteico de estos medicamentos, el cual supone que **no se puedan administrar por vía oral**, ya que la digestión destruye las proteínas, sino que deban ser administrados **por vía sc. o iv.**, supone un gasto hospitalario añadido, ya que los sc. se pueden aplicar en casa, pero los iv. requieren acudir al hospital y conectarse durante una hora a lo que los pacientes llaman 'la infusión' [31].

- **A nivel mundial el crecimiento de los FBIO dobla al del resto del mercado farmacéutico** [34]. En este ámbito, una de cada ocho prescripciones que se realiza, lo es de un FBIO y estos fármacos representan más del 16 % del gasto global en medicamentos [33]. Es decir, un mercado cercano a los 135.000 millones de euros y se estima que este año, 2017, alcance los 190.000 millones, cifra que representará en torno al 20 % [27] [33].

De tal forma, el impacto incremental de las nuevas terapias plantea a los sistemas de salud el dilema de si les será posible incorporarlas garantizando su sostenibilidad [29]. El sistema público de salud no puede costear la utilización de los MB si no es a partir del establecimiento de unos criterios de uso muy selectivos [28], de manera que este uso sea eficiente, administrando los mejores tratamientos a todos aquellos pacientes que realmente se vayan a beneficiar de los mismos [33]. Por tanto, facilitar el acceso de los pacientes a los MB se ha convertido en una prioridad dentro de la política sanitaria. Su precio suele ser elevado como consecuencia de las cuantiosas inversiones que requieren. Pero “precio elevado” no equivale a “alto coste” para el sistema sanitario, ya que la utilización de los MB evita o reduce costes derivados de ingresos y reingresos hospitalarios o por uso de fármacos no efectivos. En todo caso, el precio de los MB está llamado a disminuir por la competencia entre compañías farmacéuticas y por la autorización de los llamados biosimilares (cuando los medicamentos originales pierdan su patente) cuya cuota de mercado todavía es reducida, aunque cada vez va cobrando una mayor importancia [28], habiendo experiencias recientes que así lo avalan [32] [34].

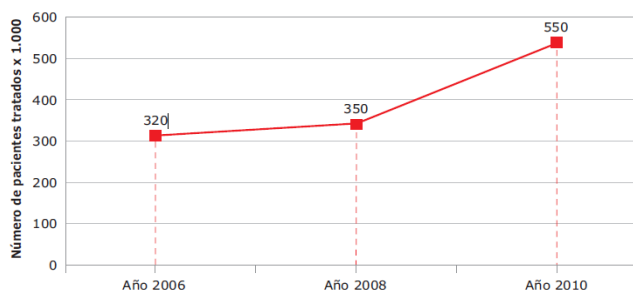


Figura 7. Evolución de la población total española tratada con productos biotecnológicos. Fuente: [35].

2.5.1. Medidas de ahorro

Entre las medidas a adoptar que pueden dar lugar a un ahorro del gasto sanitario que supone el empleo de MB se encuentran las citadas a continuación:

➤ *Implementación de políticas de racionalización* mediante una financiación de medicamentos selectiva, en la que la inclusión de un nuevo medicamento no dependa solo de su efectividad, sino de la relación entre los beneficios que aporta y el coste incremental que representa para el sistema de salud. Por ello, es esencial *evaluar el coste-efectividad de las terapias* y adoptar una perspectiva de ahorro a largo plazo, considerando costes directos, representados por los recursos sanitarios dedicados a la prevención y al tratamiento (medicación, consultas médicas y hospitalización, cirugías, etc.), y costes indirectos relacionados con la pérdida de productividad (costes derivados del cuidado por familiares, jubilación anticipada, etc.) [36].

➤ En condiciones de uso clínico habitual, se han ido definiendo una serie de acciones o *hábitos relacionados con la prescripción* que pueden mejorar la eficiencia de estos medicamentos. Entre estas estrategias se pueden destacar las siguientes: indicaciones de acuerdo a las fichas técnicas y consensos de las sociedades científicas; selección adecuada del paciente y del MB; abordaje de las comorbilidades, por ejemplo, la obesidad (estudios recientes demuestran el efecto negativo del peso sobre

Introducción

la eficacia de estos tratamientos); minimización de acontecimientos adversos, entendiendo el desarrollo de los mismos como generadores de costes indirectos añadidos al tratamiento biológico (hospitalización, baja laboral, medicamentos, etc.); en relación con estas dos últimas estrategias constituye también una estrategia esencial para la eficiencia la adquisición de un compromiso firme del paciente en la mejora de las comorbilidades (obesidad, enolismo, etc.), en el cumplimiento de las recomendaciones de seguimiento (visitas, analíticas de monitorización, información precoz de acontecimientos adversos, etc.), así como en la adecuada conservación y uso del MB; la terapia combinada (especialmente con medicamentos tópicos, fototerapia, metotrexato o acitretino) como alternativa previa a la suspensión o *switching* del biológico y para la prolongación de la supervivencia del biológico; finalmente la terapia intermitente, como una potente estrategia para la redistribución de recursos, permitiendo el acceso al tratamiento a un mayor número de pacientes en función de una misma dotación presupuestaria [32].

➤ Realización de estudios de estabilidad en condiciones de uso hospitalario de los diferentes MB susceptibles de alteraciones (en los que se enmarca esta Tesis), cuyo objetivo principal sea el establecimiento del tiempo real que el MB es capaz de conservar tanto su actividad biológica como sus características físico-químicas, pudiendo ser este, en algunos casos, superior al indicado por el fabricante, lo cual supondría un menor gasto sanitario puesto que la generación de remanentes sería reducida y cada vial de MB podría ser mejor aprovechado.

➤ También ha de tenerse en cuenta la reducción de precios de algunos productos biológicos debido a la entrada de *biosimilares* en el mercado, la cual deberá permitir destinar nuevas partidas presupuestarias a novedades terapéuticas, estimulando la competencia y la innovación, y dando respuesta a necesidades clínicas no cubiertas que requieren terapias muy específicas e innovadoras [29]. Datos de estudios recientes señalan que los medicamentos biosimilares generarán un ahorro para el Sistema de Salud español de 1.500 millones de euros de aquí al año 2020 y previsiblemente provocarán también un descenso en el coste de adquisición de biológicos de referencia que ya han perdido la patente [36].

3. ANTICUERPOS MONOCLONALES TERAPÉUTICOS

El descubrimiento de las tecnologías recombinantes de ADN y de mAbs en los años setenta marcó el nacimiento de la industria biotecnológica, - como se comentó en el apartado I. Biotecnología-, la cual ha permitido que la producción de este tipo de medicamentos (basados en proteínas) sea segura, eficaz y no aporte consecuencias negativas al medio ambiente.

En los años 40-50 la terapia con suero –también conocida como terapia Ab- fue considerada como una nueva forma de terapia de muchas enfermedades inflamatorias crónicas y enfermedades infecciosas. Desde entonces, la terapia con Abs se ha ido desarrollando rápidamente, comenzando con la producción de mAbs, Abs transgénicos, mAbs recombinantes (tales como fragmentos de Abs) y más recientemente la formación de Abs policlonales recombinantes [6] [37].

En esta Tesis Doctoral, nos vamos a centrar en los mAbs terapéuticos, debido a que los MB objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral pertenecen a este grupo de Abs.

3.1. DEFINICIÓN

Hasta 1975, momento en el que se produce el desarrollo de los mAbs, el uso de los Abs en diagnóstico y/o terapia se centraba únicamente en la utilización de sueros inmunes convencionales. Estos sueros son obtenidos a partir de distintas especies animales y contienen, entre otros muchos compuestos, una mezcla de Abs producidos por distintos clones de linfocitos B, por lo que se denominan Abs policlonales. Estos Abs reconocen en mayor o menor medida el Ag, pero con distinta especificidad y afinidad cada uno de ellos. En cambio, los Abs específicos para un solo epítipo y producidos por un único linfocito B y sus clones, se denominan mAbs [38]. Así, un mAb es un Ab homogéneo que reconoce específicamente una parte del Ag, es decir un epítipo concreto, y que es producido por un clon de células (de linfocitos B). Este clon está derivado de una célula híbrida, creada a partir de la fusión de una sola célula madre del sistema inmune y una célula plasmática tumoral.

Introducción

La tabla 6 muestra las principales diferencias entre Ab policlonales y mAbs.

Tabla 6. Principales diferencias entre Ab policlonales y mAbs. Fuente: adaptada de [39].

CARACTERÍSTICA	Ab POLICLONALES	mAbs
Pureza	Mezcla heterogénea	Químicamente puros
Variaciones entre lotes	Impredecibles	Invariables (predecibles)
Producción	Fácil e irrepetibles	Compleja, larga y limitada
Para su obtención	Preferible usar Ag puros	No necesitan Ag puros
Reconocimiento epítomos	Reconocen varios epítomos	Muy específicos (pueden no reconocer variantes antigénicas)
Isotipos	Multitud (plasticidad funcional y efectora)	Un solo isotipo
Coste	Baratos	Caros

Los mAbs son Abs idénticos generados por muchos clones de un único linfocito B. Debido a su especificidad por diferentes Ags, los mAbs constituyen un tipo relativamente nuevo de terapia dirigida para el cáncer y son muy importantes para tratamientos de distintas enfermedades como AR, distintos cánceres, enfermedad de Crohn, etc. El desarrollo de la tecnología de mAbs ha supuesto una notable herramienta al proporcionar la capacidad de producir elevadas cantidades de un Ab específico para cualquier Ag de interés. En la terapia del cáncer, los mAbs se emplean en la actualidad como moléculas bloqueadoras de ligandos o como agentes inmunomoduladores.

En el año 2015, los mAbs cumplieron 40 años desde su descubrimiento, dejando de ser una curiosidad biológica para ser una forma de tratamiento y diagnóstico muy importante en diversas enfermedades, existiendo actualmente más de 20 mAbs aprobados, y siendo el número de mAbs en fase de ensayo clínico, elevado.

3.2. ESTRUCTURA

Los Abs son proteínas altamente especializadas. Para cada Ag existen Abs moleculares con diseños específicos. La variedad de Abs es tan extensa que las células B tienen la habilidad de producirlos virtualmente frente a todos los microorganismos que se encuentran en el medio ambiente. Cuando los Abs reconocen a los microorganismos extraños, se unen físicamente a éstos e inician una compleja cadena de reacciones involucrando a otros componentes del sistema inmune que destruyen al microorganismo.

Las proteínas integrantes de los Abs se denominan inmunoglobulinas (Igs) o gammaglobulinas. Son una familia de glicoproteínas estructuralmente relacionadas, presentes en la membrana de linfocitos B y en el suero y fluidos tisulares. La unidad estructural básica de las Igs está dada por un monómero glicoproteico formado por cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) también idénticas, covalentemente unidas por puentes disulfuro y estabilizadas por uniones no covalentes, como puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. Cada cadena H y L presenta sólo un dominio variable. Las cadenas H presentan 3 ó 4 dominios constantes y las cadenas L solamente uno [40].

Las **cadena pesadas** tienen un peso molecular entre 55-77 kDa. Están constituidas por aproximadamente 450 ó 550 aminoácidos y contienen 3-15 % de carbohidratos, que resultan esenciales para mantener la estructura del monómero inmunoglobulínico y favorecer la activación del sistema del complemento y la unión a receptores Fc. Las diferencias estructurales en la región carboxiterminal permiten reconocer, en un mismo individuo, cinco clases o isotipos de cadenas pesadas, que se designan con letras griegas: gamma (γ) presente en la IgG, mu (μ) en la IgM, alfa (α) en la IgA, delta (Δ) en la IgD y épsilon (Σ) en la IgE.

La cadena pesada contiene además una región bisagra, rica en prolina y de gran flexibilidad, ubicada entre los dominios CH1 y CH2. La longitud de la región bisagra varía de 10 a 60 aminoácidos en los distintos isotipos de

Introducción

Ig y su flexibilidad es determinante en la orientación espacial de los paratopos y en la eficiencia de la unión Ag-Ab.

Las **cadena ligeras** de la Ig tienen un peso molecular en torno a 25 kDa, no contienen carbohidratos y están constituidas por aproximadamente 220 aminoácidos, separados en un dominio variable (VL) aminoterminal y un dominio constante (CL) carboxiterminal. Variaciones estructurales en el CL carboxiterminal, permiten distinguir dos tipos de cadena ligera: kappa (κ) y lambda (λ). Una Ig nunca podrá tener ambas, solamente o κ o λ [40].

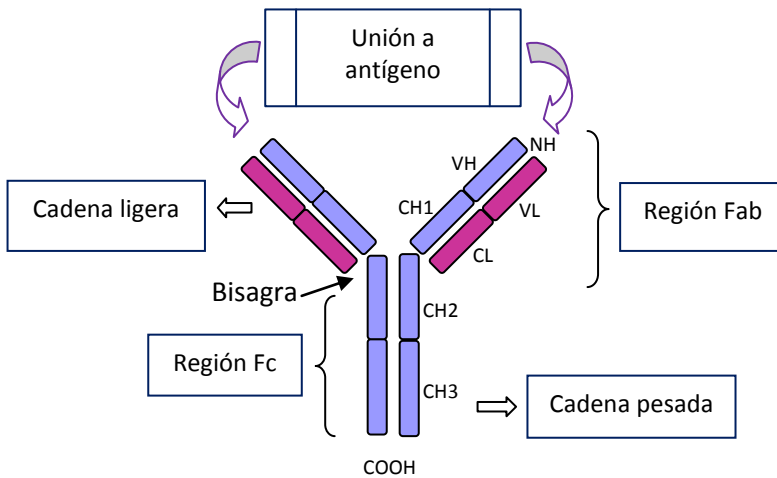


Figura 8. Estructura de un anticuerpo (Ig). Fuente: elaboración propia.

Al asociarse una cadena H con una L, sus extremos aminoterminales forman un paratopo o sitio de unión para el Ag; existiendo por lo tanto, dos sitios de combinación por monómero de Ig. Esto significa que una Ig es una molécula bivalente, que puede interactuar simultáneamente con dos epítomos idénticos.

De los 110 aminoácidos de la región variable de las cadenas H y L, en el sitio de unión con el Ag sólo participan alrededor de 30 residuos de cada cadena, situados en las regiones de mayor variabilidad aminoacídica,

denominadas **regiones hipervariables** o regiones determinantes de complementariedad (CDR: "Complementary-Determining-Region"). Las CDR de las cadenas H y L pueden dividirse en subgrupos, según la secuencia aminoacídica de las regiones de entramado. El número de subgrupos depende de cada especie. En humanos, existen cuatro subgrupos para cadenas k , seis para cadenas λ y tres para cadenas H [40].

Entre las regiones funcionales más importantes de la estructura de las Igs, destacan la región de unión con el Ag, que es el fragmento monovalente Fab (Fab), ubicada en el extremo amino. Este fragmento puede unirse específicamente al Ag pero no lo precipita, puesto que presenta un único sitio de combinación con el Ag; y el fragmento Fc (fragmento cristalizante) de aproximadamente 50 kDa, que contiene el segmento carboxiterminal de la cadena H y es responsable de la función efectora de un Ab. Participa en funciones tales como: activación del sistema del complemento, activación de células fagocíticas, citotoxicidad dependiente de Abs (ADCC), inmunidad de mucosas, inmunidad neonatal, hipersensibilidad inmediata y regulación de la respuesta inmune.

Así, hay 5 grandes clases de Abs o gammaglobulinas humanas: Inmunoglobulinas G (IgG), A (IgA), M (IgM), E (IgE) y D (IgD) que difieren en tamaño, carga, composición aminoacídica y contenido de carbohidratos de sus cadenas H [40]. Los Abs, en la fracción IgG, se forman en grandes cantidades y pueden viajar desde el fluido sanguíneo a los tejidos. Estas Igs son las únicas que cruzan la placenta y pasan la inmunidad de la madre al recién nacido. Los Abs en la fracción IgA se producen cerca de las membranas mucosas y llegan hasta secreciones como las lágrimas, bilis, saliva, mucosa, donde protegen contra infecciones en el tracto respiratorio y los intestinos. Los Abs de la clase IgM son los primeros que se forman en respuesta a las infecciones y por lo tanto son importantes para proteger durante los primeros días de una infección y los Abs en la clase IgE se encargan de reacciones alérgicas. La función especializada de las IgD todavía no se conoce por completo [41].

Desde el punto de vista de la producción de biofármacos, las IgG son las más empleadas por poseer las mayores estabilidades y tiempos de vida en fluidos corporales (sangre, humor vítreo, etc.).

3.3. NOMENCLATURA

Desde el año 1992 la OMS ha advertido la existencia de más de 300 denominaciones comunes internacionales (DCI) para mAbs; la nomenclatura, según la OMS (DCI), de los mAbs está basada en una revisión en progreso de 201 : “International Nonproprietary Names (INN) for biological and biotechnological substances (a review)” [42] [43].

Las DCI para los mAbs están compuestas de un prefijo, una partícula A, una partícula B y un sufijo. Tanto la partícula A como la B son un infijo, es decir una partícula que va entre el prefijo y el sufijo.

prefijo + infijo A (objetivo, órgano) + infijo B (origen) + sufijo

Ejemplo: **Tras + tu + zu + mab**

- El prefijo debe ser al azar, y su único requisito es el de contribuir a un nombre eufónico (armonioso, que suene bien) y distintivo.
- La partícula A indica el tipo de objetivo (molécula, célula, órgano, enfermedad): **-b (a) → bacteriano; -c (i) → cardiovascular; -t (u) → tumoral; -l (i) → inmunomodulador.**
- La partícula B indica la especie sobre la que está basada la secuencia de Ig del mAb: **(- o- ratón; -u- humano; -zu- humanizado; -xi- quimérico; -xizu- quimérico- humanizado; etc.) [43].**
- El sufijo (terminación) común para los mAbs es **-mab**.

De esta forma se podría decir:

*partícula B + sufijo.

-omab, mAb de ratón, p.ej. ibritum**omab**

-umab, mAb humano, p.ej. adalimum**ab**.

-zumab, mAb humanizado, p.ej. bevacizum**ab**, trastuzum**ab**.

-ximab, mAb quimérico p.ej. **infiximab**, **rituximab**.

*partícula A

-li- (infijo) mAb inmunomodulador, p.ej. **adalimumab**.

-tu- (infijo) mAb antitumoral, p.ej. **rituximab**.

-ci- (infijo) mAb cardiovascular, p.ej. **Abciximab**

-anib- (infijo) mAb inhibidor de la angiogénesis, p.ej. **ranibizumab**.

3.4. OBTENCIÓN

Tradicionalmente es posible obtener Abs contra un Ag conocido empleando modelos animales. Para producir Abs habitualmente en animales, como el conejo o el caballo (sueros con Abs policlonales), el primer paso consiste en inyectar al animal la sustancia frente a la cual se desean obtener las Igs. Posteriormente es posible extraer y aislar los Abs del suero. Este procedimiento por el cual al cabo de unos días se aíslan del suero de los animales los Abs, se denomina **inmunización** [38].

La producción de Abs a partir de un único clon de células B, es decir mAbs, no fue posible hasta el año 1975, año en el que los investigadores Cesar Milstein, George Köhler y Niels K. Jerne (Figura 9) describieron la técnica que permitía el cultivo de hibridomas o células híbridas de linfocitos B con células plasmáticas tumorales de mieloma múltiple. Con esta fusión de dos células, una programada para producir un Ab específico, pero que no se multiplica indefinidamente (linfocito B), y otra inmortal con gran capacidad de crecimiento, pero que no produce Ig (célula de mieloma), se combina la información genética necesaria para la síntesis del Ab deseado y una capacidad de síntesis proteica, permitiendo su multiplicación indefinida tanto *in vitro* como *in vivo*. La técnica se desarrolló inicialmente utilizando células de ratón, pero en la actualidad se producen hibridomas a partir de células de varias especies, incluyendo la humana [44]. Por esta aportación a la ciencia Jerne, Köhler y Milstein recibieron el Premio Nobel de Medicina en 1984. Posteriormente el

Introducción

británico Gregory Winter y el estadounidense Richard Lerner consiguieron humanizar los mAbs, eliminando así reacciones adversas que causaban en muchos pacientes.

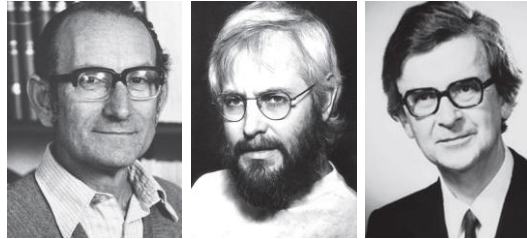


Figura 9. Cesar Milstein, George Köhler y Niels K. Jerne, descubridores de la técnica de generación de hibridomas.

3.4.1. Tecnologías para la producción de anticuerpos monoclonales terapéuticos

Las estrategias para la producción de mAbs incluyen la selección de nuevas dianas terapéuticas de interés, lo cual supone una gran dificultad ya que a menudo las rutas bioquímicas implicadas en la génesis y progresión de muchas patologías no se conocen, y sin esta información es muy difícil o imposible el diseño del Ab terapéutico [38].

Las dianas reconocidas por los mAbs terapéuticos comercializados actualmente son: virus, células tumorales, citoquinas, factores de crecimiento y otros Abs.

La obtención de mAbs se puede realizar mediante diferentes técnicas, sin embargo, la más común y usada es la denominada técnica de generación de hibridomas, anteriormente comentada.

Generación de hibridomas

A mediados de los años 90, y gracias al desarrollo de las técnicas de Biología Molecular entre otras, se obtuvieron distintos modelos de ratones transgénicos portadores de genes para las Igs humanas. Dichos genes (transgenes) que portan estos ratones posibilitan el desarrollo de una gran población de linfocitos B productores de un amplio repertorio de Abs humanos. Los animales pueden ser inmunizados con cualquier Ag y utilizar sus bazos para la obtención de hibridomas mediante el protocolo convencional [38].

Para producir *mAbs*, se extraen las células B del bazo de un animal que ha sido expuesto al Ag. Estas células B se fusionan en presencia de polietilenglicol (PEG) con células tumorales de mieloma múltiple, que pueden crecer indefinidamente en cultivo. Estas células fusionadas híbridas, llamadas hibridomas, pueden multiplicarse rápida e indefinidamente, puesto que son células tumorales y pueden producir gran cantidad de Abs. Posteriormente se cultivan los hibridomas para obtener un número diferente de determinadas colonias, las cuales producen sólo un tipo de Ab (Figura 10). Por último, los Abs de diferentes colonias son analizados para conocer su capacidad de unirse a un Ag determinado y para seleccionarse y aislarse de la manera más efectiva [44]. Mediante esta técnica, es posible obtener poblaciones homogéneas de Abs frente a un único Ag.

Mediante la tecnología de hibridoma la producción de *mAbs* murinos (100 % del Ab procede del ratón) es relativamente sencilla, sin embargo, la producción de *mAbs* humanos (derivados completamente de genes humanos) es dificultosa debido a la baja productividad. Por todo esto, en los últimos años ha tenido lugar el desarrollo de otras tecnologías alternativas a la generación de hibridomas para la producción de Abs humanos.

Introducción

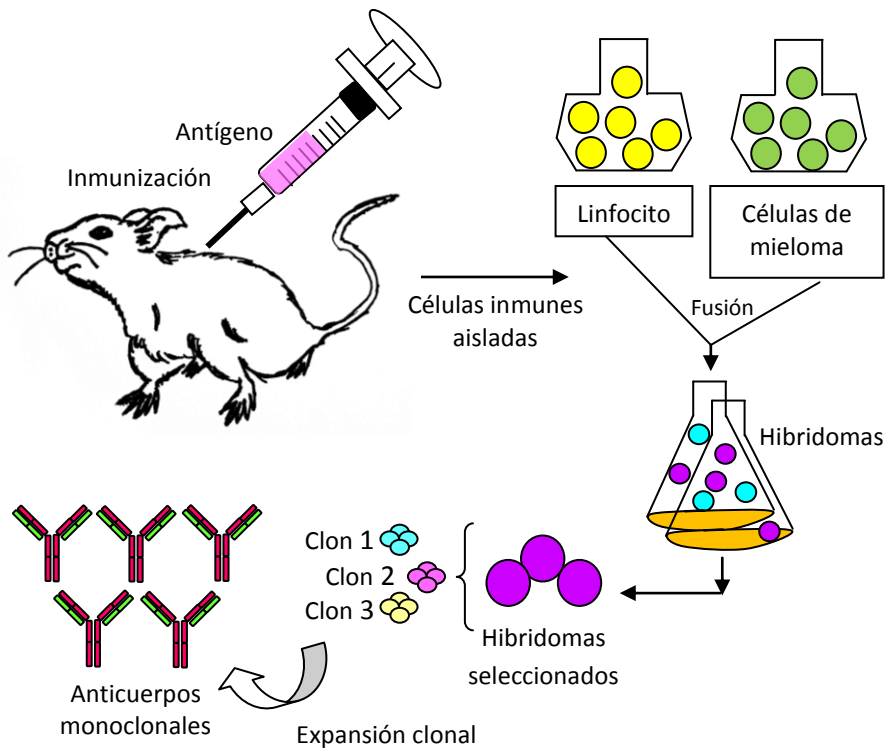


Figura 10. Proceso de obtención de anticuerpos monoclonales mediante la técnica de generación de hibridomas. Fuente: elaboración propia.

Entre estas tecnologías se encuentran:

- **Tecnología de los Ab recombinantes:** permite la producción de Abs en ausencia de inmunización del animal. Los avances en la tecnología génica han facilitado en gran medida la manipulación genética, producción, identificación y conjugación de fragmentos de Abs recombinantes, obteniéndose nuevos Abs multivalentes y multiespecíficos. Estas tecnologías han permitido desarrollar estrategias de *screening* de mAbs fuera del cuerpo humano. Para ello es necesario disponer de enormes bibliotecas de genes de Abs. El método de *screening* de estas bibliotecas debe tener una eficiencia comparable a la del sistema inmune, lo que se puede conseguir exponiendo en la superficie de microorganismos los Abs producidos [38].

Estas tecnologías incluyen la producción de fragmentos de Abs mediante:

A. Tecnología *Phage-Display*, que permite obtener grandes cantidades del mAb deseado y su expresión en *E. coli* u otras células, así como el desarrollo de ratones transgénicos para los genes de las Igs humanas. Normalmente con esta tecnología, lo que se produce no es un Ab entero, sino que solamente se inserta el ADN correspondiente a la parte del Ab que es capaz de reconocer el Ag. Mediante esta tecnología, ha sido posible crear amplias colecciones de fragmentos de Abs variables para numerosos Ags (drogas, tóxicos, moléculas implicadas en el desarrollo del cáncer, enfermedades autoinmunes...) que se denominan bibliotecas de fragmentos de Abs o genotecas de expresión de fagos. Con estas bibliotecas de Abs es posible generar Abs completamente humanos para su uso terapéutico.

B. Tecnología del ribosoma Display (*Ribosome Display*), mediante la cual también se producen fragmentos de mAbs y es posible generar bibliotecas de genes de Abs. El empleo de esta tecnología ofrece la ventaja de que el sistema de producción de Abs no depende del uso de células o fagos que podrían limitar el proceso, ya que la síntesis de los fragmentos de mAbs se realiza *in vitro*. Por esta razón, ofrece un potencial incluso mayor que *Phage-Display* en la producción de bibliotecas de Abs. Además, permite ventajas en la generación de diversidad y eficiencia en el desarrollo de Abs terapéuticos [38].

Como ya se ha comentado anteriormente, a través de estos dos procedimientos se han generado grandes bibliotecas de Abs que contienen más de cien billones de Abs humanos diferentes. Gracias a ello, se garantiza el aislamiento y la producción de Abs de sus bibliotecas para casi cualquier molécula diana.

Otra alternativa en fase de investigación es la que ofrecen las *plantas para la producción de mAbs*. La producción de Abs tanto en cultivos de células vegetales como en plantas, ofrecería ciertas ventajas como el aumento de productividad y la reducción de costes. Actualmente existen varios estudios que utilizan diversas especies de plantas como factorías de producción de Abs. Entre las variedades empleadas se encuentran la

Introducción

planta del maíz, el arroz, la planta del tabaco, *Arabidopsis thaliana* y *Lemna minor* [38].

3.5. TIPOS DE ANTICUERPOS MONOCLONALES TERAPÉUTICOS

Durante la década 1980-89 los mAbs *murinos* crearon la expectativa de revolucionar el tratamiento de muchas enfermedades, debido a su gran especificidad y homogeneidad. En estos, el 100 % del Ab procede del ratón. Sin embargo, presentaban el problema de desarrollo de respuesta inmune (contra secuencias de las regiones constantes de los mAbs murinos) por parte de los pacientes tratados, que reconocen estos Abs como extraños y generan sus propios Abs frente a ellos, lo cual limitaba su uso como agentes terapéuticos. Esta respuesta es conocida como HAMA (*human anti-mouse antibodies*) y puede dar lugar a síntomas como inflamación articular, eritema cutáneo y fallo renal, entre otros. Aumenta con la administración de dosis repetidas, reduciéndose de esta manera la actividad beneficiosa del mAb. Además, presentan otras limitaciones como son su corta vida media en suero, débil respuesta inmune, desarrollo de Abs humanos antiratón, posibilidad de reacciones alérgicas fatales, necesidad de repetidas y mayores dosis de Abs, particularmente en enfermedades crónicas, aumentando el riesgo de efectos colaterales. Así, los mAbs murinos sólo encontraron aplicación en los campos del diagnóstico clínico, análisis biológico en actividades productivas e investigación.

Con el fin de superar la limitación de la respuesta HAMA de los mAbs murinos, mediante la tecnología de ADN recombinante se desarrollaron mAbs con mayor proporción de proteína humana en su estructura. Esto ha permitido el desarrollo de mAbs *quiméricos* (chAb), mAbs *humanizados* (hzAb), y más recientemente, mAbs *completamente humanos* o *fully human* (fhAb). En los chAb, los dominios variables Ag-específico, tanto de las cadenas L como de las cadenas H de la molécula de Ig, son de origen murino (fracción que une Ag Fab), mientras los dominios constantes son de origen humano (fracción Fc) [45]. Estos Abs presentan un 70 % de componente humano y un 30 % de origen murino, por lo que,

a pesar de ser menos inmunogénicos que los denominados mAbs de primera generación y resolver el problema de interacción con el sistema inmune humano, siguen presentando problemas de inmunogenicidad [45]. De ahí el desarrollo de hzAb [37] [46] en los que aproximadamente el 85-90 % es de origen humano (incluyendo la fracción Fc), por lo que al ser inyectado en los pacientes no se produce respuesta del sistema inmune. En estos permanece solamente una mínima fracción de origen murino en la porción de unión al Ag (Fab), es decir, solo tienen de ratón los genes que entran en contacto con el Ag, o lo que es lo mismo, el paratopo de unión al Ag. Estos Abs murinos humanizados son menos inmunogénicos que los chAbs y tienen limitadas o ilimitadas reacciones inmunes serias, que a menudo ocurren en algunos pacientes [37] [47]. Este tipo de mAbs presenta además una desventaja derivada de la complejidad de la técnica de producción, ya que mientras que producir un chAb es un procedimiento relativamente expedito, la creación de un hzAb es más laborioso y consume un tiempo considerable [44].

Los fhAb derivan completamente de genes humanos, reduciendo así el riesgo de producir una respuesta inmune. Aun así, se ha detectado cierta inmunogenicidad "residual" en moléculas de fhAb debido, aparentemente, a epitopos asociados con el idiotipo del Ab. En la actualidad se están desarrollando un nuevo tipo de Ab, los **Abs bifuncionales o biespecíficos**, con sitios de combinación diferentes que pueden reconocer simultáneamente a dos Ags. Son producidos artificialmente al cruzar dos Abs, uno dirigido contra el Ag de superficie de la célula tumoral y el otro contra una molécula estimuladora de la célula efectora (complejo célula T receptora) [44].

Introducción

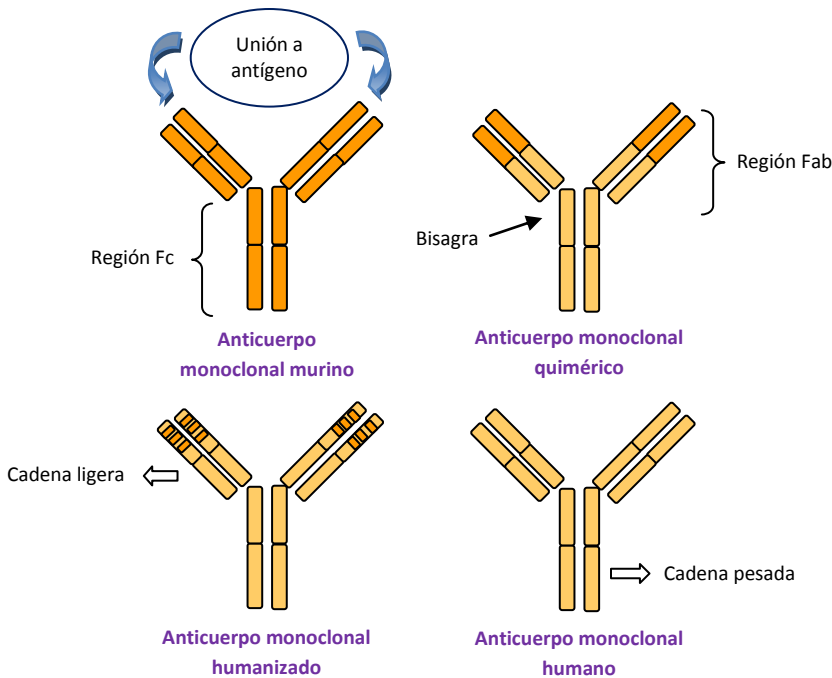


Figura 11. Tipos de anticuerpos monoclonales. Fuente: elaboración propia.

Aunque la mayoría de los mAbs que actualmente se comercializan son hzAbs, estos no están exentos de complicaciones o efectos colaterales serios. En consecuencia, esto requiere trabajar en nuevas técnicas de creación de fhAbs para evitar algunos efectos producidos en pacientes tratados con hzAbs y/o chAbs. Así, y como se ha descrito anteriormente, en los últimos años se han desarrollado nuevas formas de producción de mAbs, entre las cuales está teniendo un gran éxito la producción de **mAbs recombinantes** a través de pantallas de fagos o de levaduras [37] [48] [49] y el uso de ratones producidos por ingeniería genética para la obtención de Abs humanos [37] [50-52]. Ambas tecnologías han permitido la producción de reactivos terapéuticos más estables, específicos y asequibles. También están siendo usados **conjugados de mAbs** con diferentes moléculas como agentes tóxicos, enzimas, radioisotopos e inmunocitoquinas. La conjugación de estas moléculas con Abs puede paliar estos problemas al dirigirlas específicamente al lugar del organismo deseado, optimizando su efecto y su acción terapéutica.

Actualmente, la búsqueda de Abs con mayor afinidad por su diana mediante glicoingeniería o mediante la producción de fragmentos de Abs a través de bibliotecas sintéticas, es de gran interés, siendo la principal ventaja de esta estrategia la reducción de la dosis de Ab a administrar, con lo que disminuiría la toxicidad de las moléculas conjugadas a ellos, así como los costes de producción de los Abs. Otras tecnologías de mejora de la eficacia terapéutica de los mAbs, incluyen la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas, la polietilengilación (PEGilación) de fragmentos de Abs y el desarrollo de nanobodies y avímeros [38].

3.6. MECANISMO DE ACCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES TERAPÉUTICOS

Usando diferentes partes de su configuración, los mAbs logran sus efectos terapéuticos a través de una serie de mecanismos que incluyen programas de muerte celular y apoptosis, citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), fagocitosis celular dependiente de Abs (ADCP) y citotoxicidad celular dependiente de Ab (ADCC) [37] [53]. La región variable (Fab) de los mAbs interactúa con sus moléculas diana en una de las tres vías; uniéndose, bloqueándolas o señalizándolas [37] [53]. La unión de mAbs a sus Ags diana puede interrumpir las funciones de las células y sus interacciones con otras moléculas asociadas. Este hecho finalmente da lugar a la muerte celular.

También la unión de mAbs a compuestos tóxicos para la célula como radionuclidos o toxinas puede ser usada como vehículo para destruir células malignas. Estos conjugados se denominan **inmunotoxinas**. El mecanismo general de estos agentes se basa en la interacción específica con la célula tumoral. La toxina una vez en el interior celular puede ejercer su acción tóxica [44]. Un mAb terapéutico puede, además, ejercer su función por bloqueo de los receptores de la superficie celular y evitar la unión con sus ligandos. Esto normalmente conduce a la inhibición de la transducción de señales y proliferación celular. Por el contrario, el efecto terapéutico de mAbs que imitan el ligando e inducen la señalización entre moléculas ha sido asociado con la activación *in vivo* de células diana y la liberación de sus citoquinas.

Introducción

Las funciones efectoras de mAbs son mediadas por la interacción de sus regiones Fc con receptores de células del sistema inmune a través de CDC, ADCP o ADCC. Como resultado, la región Fc terapéutica de Abs produce una actividad citotóxica potente y efectiva. La potencia del daño antigénico en la respuesta inmune depende del isotipo IgG [37] [54]. Una vez conectado al epítipo diana usando sus regiones Fab, el mAbs realiza su actividad citotóxica usando sus regiones Fc.

Entre las funciones principales de los mAbs terapéuticos se pueden citar [45]:

- Bloqueo de una respuesta, previniendo el acceso de mediadores solubles (citoquinas), por unión al mediador o a su receptor.
- Marcaje de células tumorales por unión a Ags específicos, permitiendo la opsonización y posterior destrucción de la célula, por lisis mediada por el mAb y dependiente del sistema del complemento.
- Desencadenamiento de señales intracelulares, inductoras de apoptosis a través de Abs antiidiotipo.
- Transporte de sustancias radiactivas o citostáticas.
- Potenciación de la respuesta inmune de células T, dirigida contra Ags tumorales desconocidos. Entre estos se encuentran los anti-CD40, anti-CD137, anti-CTLA-4, anti-BAT2.

3.7. USOS CLÍNICOS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES TERAPÉUTICOS

Dado que los nuevos mAbs prácticamente no poseen las limitaciones de los mAbs murinos, durante los últimos años se ha incrementado el desarrollo de los mismos, de tal forma que algunos de ellos poseen ya usos clínicos precisos y efectivos y otros continúan en su etapa de investigación.

Como uso terapéutico, los mAbs pueden insertarse en las células cancerosas y bloquear las señales de crecimiento que promueven la división celular fuera de control. En otros casos, los mAbs pueden llevar

toxinas potentes a ciertas células, destruyendo las células peligrosas y dejando intactas las células vecinas no peligrosas.

Por todas las propiedades que poseen los Abs, han sido empleados en terapia desde que la FDA en 1986 aprobó el primer mAb para el tratamiento del rechazo del trasplante de riñón. Los mAbs por tanto, son empleados en terapia para el tratamiento de diversas enfermedades formando la familia de fármacos denominados **mAbs terapéuticos** [38].

Muchos de ellos han demostrado ser efectivos en oncología, permitiendo dirigir el tratamiento hacia células específicas, causando una menor toxicidad para las células sanas. La terapia con mAbs puede usarse sólo en tipos de cáncer cuyos Ags y sus respectivos Abs hayan sido identificados, como: cáncer de colon, gástrico, pulmonar, ovárico, de mama, contra el linfoma no Hodgkin y otras leucemias y enfermedades como artritis, enfermedad de Crohn, lupus eritematoso, espondilitis anquilosante, psoriasis, asma, etc. Incluso se han desarrollado mAbs con efecto sinérgico al de la quimioterapia, como rhuMAbVEG y otros capaces de inducir la apoptosis de células endoteliales como Vitaxin.

También han mostrado buenos resultados en el área de los trasplantes (sobre todo renales), de la infectología (ejemplo: Plimizumab) y como prevención frente a la exposición del virus de la hepatitis B, de la alergología e incluso de la cardiología [45][32].

Así, hay en el mercado gran cantidad de mAbs. Los hzAbs y los chAbs son los más utilizados en la práctica clínica para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades tumorales, autoinmunes, en el manejo de los trasplantes y prevención de enfermedades infecciosas entre otros. Además inhiben la proliferación celular y la angiogénesis y se utilizan como coadyuvantes de la quimioterapia en algunas neoplasias tales como leucemias y linfomas B y cáncer colorrectal metastásico (CCRm) entre otras. Los mAbs se unen a los receptores de superficie presentes en los linfocitos inhibiendo su activación. Además son capaces de unirse a citoquinas relevantes en la patogenia de la enfermedad como es el caso de los mAbs anti-TNF α utilizados en AR y enfermedad de Crohn (EC) [55]. Por tanto, cubren desde la prevención del rechazo de un órgano

Introducción

trasplantado hasta la oncoterapia. Pero la realidad muestra que las cosas son más difíciles, debido entre otras razones a la complejidad de producción, los problemas de inmunogenicidad a los que pueden dar lugar y el elevado coste que suponen. Sin embargo, y dado que las tecnologías para obtenerlos mejoraran a corto-medio plazo y que también se están incorporando nuevas dianas, actualmente se ha planteado como objetivo el tratamiento de enfermedades tales como hepatitis, SIDA, enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares mediante el uso de mAbs.

La mayoría de mAbs son de uso exclusivamente hospitalario y normalmente administrados por vía iv. o sc. para ser eficaces. Así, la administración por ejemplo de infliximab (Remicade[®]: indicado para uso iv. en adultos), sólo puede ser llevada a cabo bajo la supervisión de médicos especialistas con experiencia en el diagnóstico y tratamiento de la AR, espondilitis anquilosante (EA), artritis psoriásica (APs) o de las enfermedades intestinales inflamatorias para las cuales está indicado dicho medicamento [56].

3.8. MERCADO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES TERAPÉUTICOS

A pesar de todo lo comentado anteriormente, son más las ventajas que presentan los MB que las desventajas, y por ello el mercado de los mAbs terapéuticos no ha hecho sino subir en los últimos años. Hay más de un centenar en fase de ensayo en humanos, superadas con éxito las pruebas en animales, siendo en la actualidad un campo en expansión. Así, los nuevos tipos de mAbs ofrecen óptimas perspectivas ante una serie de enfermedades muy diversas [44].

Entre los años 2001 y 2002, el valor global del mercado de mAbs aumentó un 37 % hasta la cifra de 5,4 miles de millones de dólares. Los líderes del mercado fueron los chAbs con un crecimiento del 43 % y 3,8 miles de millones de dólares en ventas, seguidos de los hzAbs con más de 1,4 miles de millones de dólares y un crecimiento de un 29 % [57]. Ya en 2011 había comercializados unos 28 mAbs entre EE.UU. y la UE. A día de hoy, unos 10 mAbs han alcanzado ya la categoría de “blockbuster”, es

decir, son medicamentos ampliamente utilizados que han sido capaces de generar beneficios de más de 1.000 millones de dólares (cada uno) a las compañías que los comercializan. Y en 2012, las ventas mundiales de productos terapéuticos basados en Abs superaron los 50.000 millones de dólares; de los 15 medicamentos más vendidos en ese año, 6 eran moléculas basadas en Abs. Y, por supuesto, nuevos Abs terapéuticos se encuentran en diferentes fases de ensayo clínico.

Respecto a las indicaciones terapéuticas, el mercado de Abs terapéuticos está dirigido fundamentalmente a dos grandes grupos de indicaciones, oncología e inmunología, siendo los desórdenes autoinmunes y la inflamación los principales representantes de la segunda. En 2010, las indicaciones oncológicas constituyeron algo más del 50 % de las ventas, mientras que el área inmunológica representó casi el 40 % [58].

El coste individual que supone el tratamiento con cada uno de los FBIOs estudiados durante la presente Tesis Doctoral: infliximab, bevacizumab, cetuximab y trastuzumab, queda descrito en los Anexos I, II, III y IV respectivamente.

La tabla 7 muestra algunos de los mAbs de última generación comercialmente disponibles en el mercado europeo y estadounidense.

Introducción

Tabla 7. Anticuerpos monoclonales disponibles en el mercado. Fuente: elaboración propia.

Principio activo (mAb)	Nombre comercial	Tipo de Anticuerpo	Antígeno	Código ATC	Uso terapéutico	Fecha aprobación	
						FDA	EMA
Muronomab	OKT3 [®]	IG2a murino	CD3	L04AA02	Inmunosupresión (trasplantes)	1986	NA
Abxicimab	ReoPro [®]	Fab quimérica	GPIIb/IIIa	B01AC13	Prevención trombosis	1993	NA
Edrecolomab	Panorex [®]	IGg2A murino	CO17-1A (Ep-CAM)	L01XC01	Cáncer colorrectal C de Duke	Aprobado en Alemania en 1995	
Rituximab	Mabthera [®] Rituxan [®]	IgG1 quimérica	CD20	L01XC02	Linfoma no-Hodgkin	1997	1998
Daclizumab	Zenapax [®]	IgG1 humanizada	CD25	L04A A08	Inmunosupresión (trasplantes)	1997	1999
Basiliximab	Simulect [®]	IgG1 quimérica	CD25	L04AC02	Inmunosupresión (trasplantes)	1998	
Palivizumab	Synagis [®]	IgG1 humanizada	VRS	J06BB16	Profilaxis infección VRS	1998	1999
Infliximab	Remicade [®]	IgG1 quimérica	TNF- α	L04AB02	Enfermedad de Crohn; AR ⁽¹⁾	1998	1999
Trastuzumab	Herceptin [®]	IgG1 humanizada	HER-2	L01XC03	Metástasis cáncer de mama	1998	2000
Gemtuzumab	Mylotarg [®]	IgG4 humanizada	CD33	L01X C05	Leucemia mieloide aguda	2000	NA
Alemtuzumab	Campath [®]	IgG1 humanizada	CD52	L04AA34	Leucemia mieloide crónica	2001	
Adalimumab	Humira [®]	IgG1 humana	TNF- α	L04AB04	Enfermedad de Crohn; AR	2002	2003
Blinatumomab	Blinicyto [®]	Murino	CD19 y CD3 de células T	L01X C19	Leucemia linfoblástica aguda	2014	2003
Ibritumomab	Zevalin [®]	IgG1 murina	CD20	V10XX02	Linfoma no-Hodgkin	2002	2004
Efalizumab	Raptiva [®]	IgG1 humanizada	CD11a	L04A A21	Psoriasis	2003	2004
Cetuximab	Erbix [®]	IgG1 quimérica	EGFR	L01XC06	Cáncer colorrectal	2004	
Omalizumab	Xolair [®]	IgG1 humanizada	IgE	R03DX05	Asma	2003	2005
Tositumomab	Bexxar [®]	IgG2a murina	CD20	V10XA53	Linfoma no-Hodgkin	2003	NA
Bevacizumab	Avastin [®]	IgG1 humanizada	VEGF	L01XC07	Cáncer colorrectal	2004	2005
Natalizumab	Tyzabri [®]	IgG4 humanizada	α 4 integrina	L04AA23	Esclerosis múltiple	2004	2006
Ranibizumab	Lucentis [®]	Fab humanizada	VEGF	S01LA04	Degeneración macular	2006	2007
Panitumumab	Vectibix [®]	IgG2 humana	EGFR	L01XC08	Cáncer colorrectal	2006	2007
Eculizumab	Soliris [®]	IgG1 humanizada	C5	L04AA25	Enfermedades inflamatorias	2007	
Nimotuzumab	Theraloc [®]	IgG1 humanizada	EGFR	L01XC	Tumores de cabeza y cuello; astrocitoma; glioblastoma multiforme	2004 MH 2008	2004 MH 2008
Certolizumab	Cimzia [®]	Fab PEGylado humanizado	TNF- α	L04AB05	Enfermedad de Crohn; AR	2008	2009
Tocilizumab	RoActemra [®]	IgG1 recombinante humanizado	Anti receptor interleucina 6 (IL-6) humana	L04AC07	AR activa moderada-grave	2010	2009

Introducción

Canakinumab	Illaris®	Totalmente humano	Inhibidores de IL	L04AC08	SPAC ⁽²⁾ ; AIJS ⁽³⁾ ; Gota artrítica	2009	
Ustekinumab	Stelara®	IgG1k totalmente humano	Anti IL-12/23	L04AC05	Psoriasis en placa; Psoriasis pediátrica en placa; APs ⁽⁴⁾	2009	
Golimumab	Simponi®	IgG1k humano	TNF- α	L04AB06	AR; APs; EsA axial ⁽⁵⁾ ; EsA no-radiológica; CU ⁽⁶⁾	2009	
Catumaxomab	Removab®	Murino	EpCAM y CD3 humanos de linfocitos T	L01XC09	Ascitis maligna	NA	2009
Denosumab	Prolia® Xgeva®	IgG2 humano	Tratamiento óseo	M05BX04	Osteoporosis	2010	
Ofatumumab	Arzerra®	IgG1 Humanizado	CD20 linfocitos B	L01XC10	LLC ⁽⁷⁾ refractaria	2009	2010
Ipilimumab	Yervoy®	IgG1k totalmente humano	CTLA-4	L01XC11	Melanoma no resecable o metastásico	2011	
Belimumab	Benlysta®	IgG1 λ humano	BLyS	L04AA26	Lupus eritematoso generalizado	2011	
Brentuximab vedotina	Adcetris®	Quimérico Conjugado (13)	CD30+	L01XC12	Linfoma de Hodgkin CD30+ ; LACG ⁽⁸⁾ sistémico	2011	2012
Pertuzumab	Perjeta®	IgG1 humanizada	Agente antineoplásico	L01XC13	Cáncer de mama metastásico	2012	2013
Obinutuzumab	Gazyvaro®	IgG1 humanizada	CD20	L01XC15	LLC en combinación con clorambucilo	2013	2014
Pembrolizumab	Keytruda®	IgG4/isotipo kappa (con una alteración de la secuencia estabilizadora en la región Fc) humanizado	PD-1	L01XC18	Melanoma avanzado	2014	En revisión
Ramucirumab	Cyramza®	IgG1 recombinante humano	VEGFR2	L01XC21	Cáncer gástrico; CCRm ⁽⁹⁾ ; NSCLC ⁽¹⁰⁾	2014	NA
Vedolizumab	Entyvio®	Humanizado	Integrina α 4 β 7	L04AA33	Colitis ulcerosa activa; enfermedad de Crohn activa	2014	
Elotuzumab	Empliciti®	IgG1 humanizada	SLAMF7	Pendiente asignado	Mieloma múltiple	2015	NA
Daratumumab	Darzalex®	IgG1k humano	CD38	L01XC24	Mieloma múltiple en recaída y refractario al tratamiento	2015	NA
Evolocumab	Repatha®	Totalmente humano	PCSK9	C10AX13	Hipercolesterolemia y dislipidemia mixta	2015	
Dinutuximab	Unituxin®	Quimérico	Gangliósido GD2	L01XC16	Neuroblastoma de alto riesgo	2015	
Idarucizumab	Praxbind®	Humanizado	Dabigatrán-trombina	V03AB37	Reversión rápida de efectos anticoagulantes de dabigatran etexilato	2015	

Introducción

Mepolizumab	Nucala®	Humanizado	IL-5	L04AC06	Asma eosinofílica refractaria grave.	2015	
Alirocumab	Praluent®	Humano	PCSK9 ⁽¹⁵⁾	Pendiente asignación	Hipercolesterolemia primaria; dislipidemia mixta	2015	
Raxibacumab	Abthrax®	Ig G1λ recombinante humana	PA ⁽¹⁶⁾	J06BB18	Antrax por inhalación	2012	2015
Necitumumab	Portrazza®	IgG1 recombinante humana	EGFR	L01XC22	NSCLC escamoso metastásico	2015	NA
Nivolumab	Opdivo®	IgG4 humana	PD-1	L01XC17	Melanoma, CCR ⁽¹¹⁾ y CPNM ⁽¹²⁾	2015; no comercializado	
Sacituzumab govitecan	IMMU-132	Conjugado ⁽¹⁴⁾	Receptor Trop-2	Pendiente asignación	Cáncer de mama triple negativo; cáncer de pulmón; cáncer pancreático	2016	NA

- (1) AR: Artritis reumatoide
- (2) SPAC: Síndromes Periódicos Asociados a la Criopirina
- (3) AIJS: Artritis idiopática juvenil sistémica
- (4) APs: Artritis psoriásica
- (5) EsA: Espondiloartritis
- (6) CU: Colitis ulcerosa
- (7) LLC: Leucemia linfocítica crónica
- (8) LACG : Linfoma anaplásico de células grandes
- (9) CCRm: Cáncer colorectal metastásico
- (10) NSCLC: Cáncer no microcítico de pulmón
- (11) CCR: Cáncer de células renales
- (12) CPNM: cáncer de pulmón no microcítico
- (13) IgG1 quimérica recombinante unida de forma covalente al agente antimicrotúbulos monometil auristatina E (MMAE)
- (14) Fármaco moderadamente tóxico SN-38 unido a un anticuerpo humanizado (hRS7) que se dirige al receptor Trop-2
- (15) PCSK9: Proproteína convertasa subtilisina / kexina tipo 9
- (16) PA: Antígeno protector de *B. anthracis*

4. CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES TERAPÉUTICOS

4.1. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD. Guías ICHs.

Se describen a continuación las guías ICH (International Conference on Harmonisation) [59], especialmente aquellas relacionadas con el desarrollo de productos biológicos/biotecnológicos, ya que han sido las consideradas – en la medida de lo posible – a lo largo de esta Tesis Doctoral para abordar los estudios de estabilidad.

Con objeto de unificar los diferentes reglamentos que regulan el desarrollo y registro de nuevos medicamentos en Europa, Japón y EE.UU., en 1990 tuvo lugar la denominada ICH (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) como un proyecto conjunto entre las autoridades regulatorias y la industria farmacéutica, para discutir los aspectos científicos y técnicos del registro de medicamentos. La misión de la ICH es conseguir una armonización mundial para asegurar que la seguridad, efectividad y calidad de los medicamentos desarrollados y registrados se consiga de la forma más eficiente posible [59].

A partir de aquella primera conferencia, la ICH se ha constituido en una organización internacional que entre sus diversas actividades, genera una serie de guías y recomendaciones unificadas que las industrias farmacéuticas se comprometen a implementar y a seguir para asegurar la calidad de los medicamentos. Son varias las ICH que regulan los aspectos científicos y técnicos de los MB en cuanto a su estabilidad. En la siguiente tabla se muestran algunas de las ICH relacionadas con las directrices a seguir a la hora de llevar a cabo ensayos de estabilidad de MB.

Tabla 8. ICH para estudios de estabilidad de MB.

ICH	TÍTULO
Q5C	Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological products
Q1B	Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products
Q6B	Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological products
Q3A	Impurities in New Drug Substances
Q3B (R2)	Impurities in New Drug Products
Q1D	Bracketing and Matrixing Designs for Stability Testing of New Drug Substances and Products
Q1E	Evaluation for Stability Data
Q2A	Validation of Analytical Methods. Definitions and Terminology
Q2B	Validation of Analytical Procedures: Methodology
Q2 (R1)	Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology
Q1A (R)	Stability Testing of New Drug Substances and Products
Q1A (R2)	Stability Testing of New Drug Substances and Products (the parent guideline)
Q1C	Stability Testing: Requirements for New Dosage Forms

A la hora de llevar a cabo estudios de estabilidad de MB, es necesario saber que la ESTABILIDAD es definida como la capacidad que tiene un medicamento o un principio activo de mantener por determinado tiempo sus propiedades originales dentro de las especificaciones de calidad existentes, mientras que la FECHA DE CADUCIDAD es el periodo de tiempo durante el cual el medicamento mantiene un mínimo del 90 % de principio activo sin que se aprecien modificaciones físicas ni desarrollo microbiano [60] [61].

Los MB pueden sufrir diferentes tipos de reacciones y procesos que sean causa de inestabilidad y que pueden afectar tanto a la calidad del producto como a su seguridad y eficacia. Los componentes activos de los MB son habitualmente proteínas y/o polipéptidos, en los cuales el mantenimiento de la conformación molecular y de la actividad biológica depende tanto de fuerzas covalentes como no covalentes. En consecuencia son sensibles a

factores ambientales (temperatura, humedad y luz), a la oxidación, al contenido iónico y agitación en mayor medida en la que lo son los MSQ tradicionales. Por lo tanto, para poder asegurar el mantenimiento de la actividad biológica y evitar la degradación, se necesitan de forma general condiciones estrictas para su almacenamiento [62].

Así, se puede producir:

- *Inestabilidad de tipo físico*: puede alterar las propiedades mecánicas y el aspecto de las diferentes formas de dosificación.
- *Inestabilidad de tipo químico*: da lugar a la degradación del principio activo pudiendo producir una pérdida de la eficacia del mismo e incluso la formación de productos de degradación tóxicos que alterarán la actividad y la eficacia del mismo, lo que conlleva riesgos para el paciente.
- *Inestabilidad de tipo biológico*: pérdida de actividad del medicamento y producción de desarrollo microbiano por encima de los límites permitidos.
- *Inestabilidad biofarmacéutica*: cambios en la biodisponibilidad del medicamento.

Teniendo en cuenta los diferentes tipos de inestabilidad que pueden afectar a los medicamentos, es necesario realizar estudios para asegurar tanto su eficacia como calidad y seguridad a lo largo de todos los procesos a los que se ve sometido el MB, desde que comienza el proceso de fabricación, hasta las diferentes etapas por las que pasa, como ensayos clínicos, obtención de la autorización de comercialización, comercialización y postcomercialización. Cualquier modificación que se realice sobre el medicamento, debe ser evaluada bajo estos mismos conceptos.

La evaluación de la estabilidad de los MB requiere metodologías analíticas complejas. Los estudios de estabilidad de éstos, han de verificar aspectos físico-químicos y funcionales, incluyendo análisis inmunoquímicos, análisis de la entidad molecular y detección cualitativa y cuantitativa de los productos de degradación. **Los ensayos para la actividad biológica deben ser parte de los primeros estudios de estabilidad y suelen ser llevados a cabo mediante inmunoensayos (IE)** [62].

Introducción

Las distintas guías dan recomendaciones sobre cómo desarrollar, validar y aplicar los estudios de estabilidad sobre MB, así, la ICH Q1E (Evaluation for Stability Data) [63] nos indica cuando y como es posible aplicar una propuesta de ampliación del periodo de validez de un MB o de su vida media, obtenida mediante estudios de estabilidad a largo plazo y en condiciones de almacenamiento adecuadas [63]. La ICH Q1B (Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products) [64], establece que deben ser evaluadas las características de fotoestabilidad intrínseca de los MB para asegurar que son las adecuadas y no han sufrido daños por exposiciones inadecuadas a la luz. El estudio de exposición a distintas intensidades de luz debe ser incluido dentro del estudio de degradación forzada del medicamento ya que indicará si se han producido cambios en las propiedades físicas del mismo (aparición, transparencia, color) o si se ha producido degradación fotoquímica [4] [64].

Por tanto, es necesario desarrollar procedimientos de evaluación de la estabilidad de los MB, con el propósito de garantizar el mantenimiento de las condiciones inicialmente presentadas y/o aprobadas para la obtención, renovación o modificación del registro sanitario. Como ya ha sido indicado, también en aquellos casos en que se modifique o se amplie su uso, como es el objetivo de la presente Tesis Doctoral.

4.2. PARÁMETROS ANALÍTICOS INDICADORES DE ESTABILIDAD

Tal y como indica la ICH Q5C (Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological products) [62], no existe un solo ensayo o parámetro indicador que muestre las características de estabilidad de un producto biotecnológico/biológico. Como consecuencia, el fabricante debe proponer un perfil indicador de estabilidad que de manera cierta permita detectar los cambios en identidad, pureza y **potencia del producto** (actividad biológica), entendiendo esta última como la habilidad o capacidad específica de un producto para lograr el efecto para el que se ha diseñado.

Es aconsejable realizar además *ensayos* mediante los cuales se determine la *pureza y caracterización molecular del producto*. Debido al efecto de reacciones como glucosilación, desamidación u otras, la pureza absoluta de un producto biotecnológico/biológico de naturaleza proteica es extremadamente difícil de determinar. Habitualmente debe evaluarse por más de un método y el valor de la pureza obtenido es dependiente del método. Para los fines de las pruebas de estabilidad, las pruebas de pureza deben enfocarse en métodos para la determinación de productos de degradación. El grado de pureza, así como las cantidades tanto individuales como totales de los productos de degradación del producto biotecnológico/biológico, deben indicarse y documentarse siempre que sea posible. Los límites de degradación aceptables deben derivarse de perfiles analíticos de lotes del fármaco y del medicamento usado en los estudios preclínicos y clínicos.

El uso de metodologías analíticas físico-químicas, bioquímicas e inmunoquímicas debe permitir una *completa caracterización del fármaco y/o medicamento* (por ejemplo, tamaño molecular, carga, hidrofobicidad) *así como la detección precisa de la degradación que pueda resultar de reacciones de desamidación, oxidación, sulfo-oxidación, agregación o fragmentación durante el almacenamiento*. Siempre que se detecten cambios cualitativos o cuantitativos significativos que indiquen la formación de productos de degradación durante los estudios de estabilidad a largo plazo, acelerados y/o extremos, se deben considerar los posibles daños y la necesidad de caracterizar y cuantificar los productos de degradación dentro del programa de estabilidad a largo plazo.

Además, se debe realizar un *análisis de apariencia visual* del producto (color y opacidad para disoluciones/suspensiones; color, textura y tiempo de disolución para polvos), partículas visibles en disoluciones o después de la reconstitución de polvos o liofilizados, pH, y nivel de humedad de polvos y productos liofilizados.

Introducción



Figura 12. Formación de moho en muestras de infliximab por una mala conservación. Fuente: elaboración propia.

Tanto inicialmente como al final de la vida útil propuesta, ha de realizarse la denominada *prueba de esterilidad o pruebas alternativas* (p. ej. prueba de integridad envase/tapa). El envase/tapa puede presentar el riesgo de afectar de manera adversa al producto y debe evaluarse cuidadosamente.

El *establecimiento de la fecha de caducidad* se debe basar en datos de tiempo real/temperatura real. Sin embargo, se aconseja también que los estudios se realicen con el fármaco y el medicamento bajo condiciones aceleradas y extremas (*estudios de estrés*) que pueden proporcionar datos útiles de soporte para establecer la fecha de caducidad, proporcionar información de estabilidad del producto para un futuro desarrollo de productos, ayudar en la validación de métodos analíticos para el programa de estabilidad, o generar información que pueda ayudar a elucidar el perfil de degradación del fármaco o del medicamento. Los estudios bajo condiciones extremas pueden ser útiles para determinar si la exposición accidental a condiciones diferentes a las propuestas (p. ej., durante el transporte) es perjudicial para el producto y también para evaluar qué parámetros de prueba específicos pueden ser los mejores indicadores de estabilidad del producto y ayudar a revelar los patrones de degradación; de ser así, dichos cambios se deben monitorizar bajo las condiciones de almacenamiento propuestas [62].

Aunque los productos biotecnológicos/biológicos pueden estar sujetos a pérdidas significativas de actividad, cambios físico-químicos, o degradaciones durante el almacenamiento, las regulaciones

internacionales y nacionales han proporcionado pocas guías respecto a las diferentes especificaciones de liberación y término de vida útil. No se han desarrollado recomendaciones para las pérdidas máximas aceptables de actividad, límites para cambios físico-químicos, o degradación durante la vida útil propuesta para clases individuales o grupos de productos biotecnológicos/biológicos, sino que se consideran caso por caso. Cada producto debe mantener sus especificaciones dentro de los límites establecidos para la seguridad, la pureza y la potencia a lo largo de su vida útil propuesta [62].

Por tanto, podría resumirse que los estudios de estabilidad de los FBIO y por tanto de los mAbs, se deben llevar a cabo mediante el empleo de diferentes técnicas analíticas para su completa caracterización físico-química, además de emplear técnicas específicas bioquímicas/biológicas para demostrar su actividad/funcionalidad biológica.

Además, tal y como indican específicamente las guías ICH, los métodos que se emplean en estudios de estabilidad deben de cumplir unas especificaciones particulares, por lo que deben validarse con el objetivo de ser indicadores de estabilidad. Este aspecto será discutido en particular en el contexto de los métodos ELISA propuestos en esta Tesis Doctoral.

4.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Dada la gran variedad de técnicas analíticas que pueden ser empleadas en el estudio e investigación de proteínas y por lo tanto de mAbs, en este apartado solo se comentarán brevemente los tipos de técnicas analíticas más empleados para la caracterización de mAbs.

Las técnicas analíticas a emplear en el análisis de mAbs terapéuticos deben permitir el estudio de la concentración total de proteína, el tipo, las isoformas y la estructura molecular incluidas sus modificaciones como las reacciones de desamidación, oxidación, sulfo-oxidación, agregación o fragmentación durante su conservación o uso. También es de interés el estudio de la conformación de la proteína que asegura su funcionalidad.

Introducción

Teniendo en cuenta lo anterior, las técnicas analíticas de mayor uso para la caracterización físico-química de mAbs son las citadas a continuación:

4.3.1. *ELECTROFORESIS*

El proceso electroforético [65], característico de las proteínas, actualmente, es la base de un amplio número de técnicas analíticas, todas ellas empleadas en el estudio y análisis de proteínas, incluidas los mAbs. Entre estas técnicas cabe destacar actualmente el empleo de la electroforesis capilar [66-74].

4.3.2. *CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN*

La caracterización físico-química de mAbs suele llevarse a cabo mediante el empleo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC y UPLC con detección UV-Visible o acoplada a espectrometría de masas) como técnica analítica de elección, ya que además de poder analizar una batería de muestras a la vez, permite no solo separar, sino también caracterizar y cuantificar mAbs permitiendo la detección de algunos de los problemas causantes de la pérdida de estabilidad de mAbs como son la formación de agregados, la modificación del perfil de isoformas, la detección de oxidaciones de cisteínas (sulfo-oxidaciones), las desamidaciones de cadenas laterales de aminoácidos, la presencia de impurezas, la detección de cambios conformacionales en la estructura terciaria y replegamiento de proteínas recombinantes [75].

Por tanto, para la determinación de mAbs - y de proteínas en general -, pueden ser empleados diferentes tipos de cromatografía líquida [76-78] basados en el principio de que las proteínas pueden ser separadas en función de las diferencias en sus propiedades físico-químicas, como el tamaño, la carga, las características de adsorción, la solubilidad y estabilidad térmica. Así, entre las diferentes modalidades cromatográficas usadas en el análisis físico-químico de mAbs se encuentran:

- *Cromatografía de intercambio iónico* (Ion Exchange Chromatography, **IEC**) es la técnica de cromatografía de uso común para la mayoría de separación de proteínas, basada en el uso de polímeros de intercambio

iónico. Con ella se separan las moléculas en base a su carga iónica neta. El sólido retiene a los solutos gracias a interacciones electrostáticas. La separación se lleva a cabo por la competencia entre proteínas con diferente carga superficial por grupos cargados opuestamente sobre un adsorbente o una matriz de intercambio iónico. La fase estacionaria sólida lleva en la superficie cargas electrostáticas fijas, que retienen contraiones móviles que pueden intercambiarse por iones de la fase móvil. Actualmente, IEC es una de las técnicas de purificación de proteínas más usadas [75-77] como cromatografía preparativa [75-77] y como cromatografía analítica se emplea específicamente para el análisis conformacional de las isoformas de un mismo o diferentes mAbs [79-81].

- **Cromatografía de afinidad**: utiliza una fase estacionaria que generalmente es un polímero de tipo líquido inmovilizado sobre un sólido inerte por enlaces covalentes. Esta técnica es el medio más eficaz de separar una proteína individual de una mezcla de proteínas, pero es la más cara, debido a la necesidad de tener columnas con ligandos específicos vinculados a ellos [82].

Tanto la IEC como la cromatografía de afinidad se usan comúnmente para separar las proteínas y aminoácidos en el laboratorio. Se utilizan con menos frecuencia para las separaciones comerciales porque no son adecuadas para la rápida separación de grandes volúmenes y son relativamente caras. Son los dos principales tipos de cromatografía de adsorción de uso general para la separación de las proteínas y obtención de los perfiles de isoformas en el caso de los mAbs terapéuticos [83].

- **Cromatografía de interacción hidrofóbica** (Hydrophobic Interaction Chromatography, **HIC**) es uno de los métodos de purificación de macromoléculas biológicas más utilizado, especialmente para proteínas terapéuticas. Las interacciones hidrofóbicas son las fuerzas no covalentes más importantes que pueden estar relacionadas con diferentes procesos, como la estabilización de la estructura de las proteínas, la unión de enzimas a un sustrato y el repliegamiento de proteínas [75] [84].

- **Cromatografía de fase reversa** (Reversed Phase Chromatography, **RPC**). Es un tipo de cromatografía en la cual la fase estacionaria es apolar

Introducción

y la fase móvil polar. La RPC es una técnica de purificación capaz de separar componentes con características muy similares, como proteínas que difieren en sólo un aminoácido e isómeros conformacionales de péptidos. A pesar de que el valor de la RPC puede estar limitado por diversos factores, como el uso de solventes y su disposición final, así como por los bajos porcentajes de recuperación debidos a los cambios conformacionales ocasionados por las interacciones envueltas en el proceso, actualmente es la más utilizada [75] [76] [85-87]. Desde el punto de vista analítico, tiene importantes aplicaciones para la cuantificación de mAbs terapéuticos [88] [89], o la detección de desamidaciones tras la digestión enzimática del mAb [90-92].

Las separaciones que se llevan a cabo mediante interacciones hidrofóbicas entre la fase estacionaria, la fase móvil y las proteínas se realizan utilizando HIC y/o RPC.

- *Cromatografía de exclusión por tamaños* (Size Exclusion Chromatography, **SEC**): es el nombre general para los procesos de separación de biomoléculas de acuerdo a su tamaño o peso molecular. Se denomina también cromatografía de permeación de geles, de filtración en geles o de exclusión molecular. Las columnas de SEC de alto rendimiento son usadas analíticamente para estudiar la pureza de las proteínas, su plegamiento, las interacciones proteína-proteína, etc. Por otro lado, las separaciones preparativas se realizan utilizando matrices de SEC de baja presión y sirven para separar mezclas de proteínas con diferentes pesos moleculares, proteínas de otras macromoléculas biológicas y para la separación de proteínas agregadas de monómeros. Desde el punto de vista preparativo, SEC es frecuentemente utilizada como un paso de pulimiento final del producto [75-77] [93-96]. Desde un punto de vista analítico, es la técnica de elección para el estudio de agregados de mAbs terapéuticos [97].

- *Cromatografía de interacción hidrofílica* (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, **HILIC**): en esta modalidad de cromatografía líquida, la fase estacionaria es polar y la fase móvil contiene un alto porcentaje de disolvente orgánico (> 60 %), agua y tampón acuoso u otro disolvente siempre de naturaleza polar. El agua de la fase móvil forma

una capa acuosa adsorbida sobre la superficie de la fase estacionaria polar en la que se produce el reparto entre los analitos a separar. La separación se basa por tanto en interacciones de tipo hidrofílico. La ventaja principal de este modo de separación cromatográfico es la fuerte retención de compuestos polares hidrofílicos que no son retenidos en el modo cromatográfico de fase inversa. Es la modalidad cromatográfica de elección para el análisis de los glicanos de los mAbs, con detección fluorescente o mediante espectrometría de masas [98].

4.3.3. **ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS)**

El alto grado de desarrollo que ha adquirido actualmente la técnica de MS en sus diferentes modalidades y con las diferentes fuentes de ionización disponibles en el mercado, permite la obtención de información estructural de gran valor de los mAbs terapéuticos. Actualmente, esta técnica, incluido su acoplamiento a la cromatografía líquida (LC/MS), es clave en los estudios estructurales de los mAbs terapéuticos [99-101] en todas sus dimensiones, esto es, desde la determinación o estudios de la estructura intacta hasta la aplicación en estudios de detección e identificación de microvariaciones, así como en estudios conformacionales. Estos últimos constituyen a día de hoy importantes fronteras de la investigación en Abs terapéuticos [102] [103].

4.3.4. **OTROS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE mAbs**

- Para llevar a cabo la *separación de proteínas* de acuerdo a su tamaño también son empleadas otro tipo técnicas analíticas como la *diálisis* y la *ultrafiltración analítica (AUC)*.
- La *determinación de la estructura secundaria y terciaria de proteínas* suele realizarse mediante *espectroscopía UV-Visible*, *difracción cristalografía de rayos X*, *dicroísmo circular (CD)* y con mayor frecuencia mediante *resonancia magnética nuclear (RMN)* [76] [77].

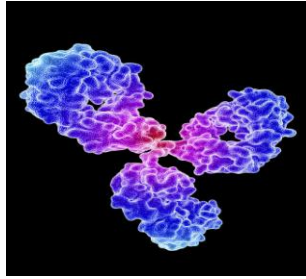


Figura 13. Imagen en 3D de la IgG. Fuente: www.keywordhut.com

- La **determinación de agregados** se suele realizar mediante SEC, como ya ha sido comentado, sin embargo existen otros métodos de análisis que permiten su estudio como son la **dispersión dinámica de luz (DLS)** y la **dispersión por ultrasonidos**, que permiten un estudio más amplio de la distribución del particulado, de los agregados.

4.4. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE FBIOs MEDIANTE INMUNOENSAYOS

Tal y como indica la ICH Q6B (Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological products) [14], los ensayos para determinar las propiedades biológicas y/o funcionales de un mAb terapéutico, constituyen un paso igual de esencial que la caracterización físico-química del mismo. La actividad biológica describe la capacidad específica de un producto para lograr un efecto biológico definido. **Los ensayos basados en la medida de reacciones enzimáticas inducidas por interacciones inmunológicas, inmunoensayos, son los principales procedimientos propuestos con este fin [74].**

Los inmunoensayos son ensayos analíticos basados en el uso de Abs. Desde 1959, año en el que Rosalyn Yalow y Solomon Berson desarrollaron los primeros inmunoensayos, hasta la actualidad, el desarrollo de esta técnica analítica ha ido creciendo de forma continua,

siendo empleada tanto en investigación como en diagnóstico clínico, en farmacia, veterinaria, bioquímica, ciencias forenses, alimentación, etc. [104]. Los inmunoensayos son técnicas inmunoquímicas analíticas de laboratorio que presentan un grado aceptable de exactitud y precisión, y que tienen en común el usar complejos inmunes, es decir, los resultantes de la conjugación de Abs y Ags, para el reconocimiento y la cuantificación de analitos, que pueden ser tanto Ab o Ag, con alta selectividad, usando diversas estrategias para poner de manifiesto la reacción (enzimas, moléculas fluorescentes o radioactivas) y permitir la medida [105]. El valor de la señal generada se relaciona con la concentración de analito presente en la muestra [104] [106].

Los inmunoensayos presentan las ventajas de alta sensibilidad, aplicabilidad a diferentes analitos, fácil automatización y amplio uso en el laboratorio de rutina para monitorización de fármacos. Su gran sensibilidad y especificidad permite la cuantificación de compuestos presentes en líquidos orgánicos en concentración muy pequeña, del orden de nanogramos/ml o de picogramos/ml [105]. Sin embargo, como inconvenientes se puede citar: medida compleja de la actividad enzimática, menor sensibilidad de los ensayos homogéneos, reactividad cruzada con metabolitos o sustancias estructuralmente análogas [78].

❖ Tipos de inmunoensayos para el análisis de mAbs terapéuticos

Dentro de los inmunoensayos, la variedad de tipos y diseños es muy elevada, siendo divididos en dos grandes grupos:

4.4.1. INMUNOENSAYOS HETEROGÉNEOS

Son aquellos ensayos en los que se requiere la separación de las moléculas no enlazadas (fracción libre) de la fracción ligada antes de que la señal analítica sea medida. Sin una previa separación mediante lavado antes de la medida de la señal, se obtendría siempre la misma señal [104]. En este tipo de ensayo la señal generada por la unión del Ag y el Ab se mide en un medio diferente que el utilizado para la unión del complejo inmune.

Introducción

Son más complejos de realizar. *A este tipo pertenecen los **ELISAs** desarrollados en esta Tesis Doctoral.*

4.4.2. INMUNOENSAYOS HOMOGÉNEOS

Son aquellos ensayos desarrollados de forma que no requieren la separación del complejo Ab-Ag del Ag libre, sino que la señal es generada por la unión del Ab al Ag y se mide directamente en el medio utilizado para permitir la formación del complejo inmune [104]. Generalmente son más fáciles y rápidos de realizar y se usan para detectar pequeños analitos: hormonas, medicamentos o drogas de abuso.

A continuación se describen brevemente algunos de los inmunoensayos usados con mayor frecuencia en los estudios de mAbs:

A. Técnicas usadas inicialmente para la determinación y cuantificación clínicas de mAbs terapéuticos:

a.1. *Immunoprecipitación*

a.2. *Inmunoelectroforesis*,

a.3. *Inmunofijación*,

a.4. *Inmunoanálisis de partículas* (Interacción cinética de micropartículas en solución (KIMS),

a.5. *Inmunonefelometría*

a.6. *Radioinmunoanálisis* (RIA).

B. Técnicas empleadas actualmente de forma habitual para el análisis de mAbs terapéuticos:

b.1. ENZIMOINMUNOANÁLISIS: técnica basada en la competencia de unión al Ab o Ag específico entre la sustancia a cuantificar (Ag purificado o Ab) y cantidades conocidas de la misma sustancia marcada con una enzima. Existen diferentes modalidades como:

b.1.1. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas, **ELISA**). Actualmente, ELISA es el método de inmunoanálisis más común usado para evaluar la actividad

biológica de mAbs comercializados. Esto se debe a que sus características inherentes lo hacen particularmente adecuado para el análisis de este tipo de productos biofarmacéuticos. La técnica ELISA se usa normalmente para detectar y cuantificar Abs, Ags, hormonas, citoquinas y una gran variedad de diferentes moléculas, incluyendo péptidos sintéticos por ejemplo, porque ofrece muchas ventajas sobre otro tipo de ensayos, incluyendo mayor facilidad de realización y medición en laboratorio que otros procedimientos recomendados como los basados en el cultivo de células o en el uso de animales [107], el uso de reactivos no radiactivos y el análisis simultáneo de un gran número de muestras. Además, y en comparación con otros métodos de IE, el ELISA tiene la ventaja de ser preciso, altamente sensible y fuertemente específico. Estas características son de particular importancia cuando se quiere analizar la concentración activa de los mAbs en el suero de pacientes y en estudios farmacocinéticos [108-114].

La técnica ELISA, término acuñado por los investigadores suecos Eva Engvall y Peter Perlmann [20], permite identificar inmunocomplejos por medio de enzimas unidas al Ag o Ab, estando uno de ellos adsorbido a un soporte sólido polimérico (una placa de poliestireno habitualmente).

Así, de forma general, las diversas modalidades de la técnica ELISA se realizan mediante la adición secuencial de todos los reactivos necesarios separados por etapas de lavado. Cada una de las operaciones puede realizarse manualmente con micropipetas o con equipamiento automatizado para todas y cada una de las etapas. Esta completa automatización se justifica por la necesidad de procesar y analizar un gran número de muestras, y sobre todo para mejorar la repetibilidad de los resultados [115].

Las 4 etapas básicas y comunes de un ensayo ELISA, independientemente de la variedad de que se trate, son las siguientes:

1) *Unión del Ag (o del Ab) a los pocillos.* La unión de Abs o Ags a la superficie de plásticos tratados se realiza con facilidad pues tienen gran afinidad por proteínas.

Introducción

2) *Bloqueo* para asegurar la unión del Ag (o del Ab) a los pocillos e inactivar los sitios de unión del material plástico no ocupados por el Ag (o Ab).

3) *Formación de una o más capas de inmunocomplejos*. En el caso del Ag unido a la placa se puede detectar mediante un Ab anti-Ag marcado (ELISA directo) o empleando un Ab primario anti-Ag y un secundario anti-primario marcado (ELISA indirecto).

4) *Revelado de la reacción enzimática*. Después de un lavado para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos, se añade el sustrato enzimático en solución. Se deja reaccionar y se lee la absorbancia empleando un espectrofotómetro [116].

Por tanto, se puede afirmar que la técnica ELISA se basa en: 1) El Ag y Ab pueden enlazarse a una superficie portadora insoluble y retener su reactividad inmunológica; 2) las enzimas tienen actividad específica alta y convierten una cantidad relativamente grande de sustrato en producto detectable, lo que permite detectar concentraciones muy bajas del ligando; 3) la actividad enzimática o reactividad inmunológica de los conjugados se preserva y permanece estable durante el análisis y el almacenamiento; y 4) las enzimas no están presentes en el líquido (biológico o no) que se va a analizar.

b.1.2. Otros, como por ejemplo: el IE de multiplicación enzimática (**EMIT**), IE por clonado de dador (**CEDIA**) e IE enzimático por micropartícula (**MEIA**).

b.2. INMUNOFLUORESCENCIA: en este caso se utiliza como marcador de la sustancia a detectar y medir (analito) una sustancia fluorescente. Ejemplo, IE de polarización fluorescente (**FPIA**). Los Abs específicos están marcados con una molécula fluorescente (fluoresceína normalmente) para revelar la presencia del correspondiente Ag en una célula o en un corte de un tejido a estudiar. Puede ser directa: fluoresceína unida directamente al Ab específico, o indirecta: utiliza un Ab anti-Igs marcado con la fluoresceína para detectar el Ab específico (no marcado) unido a la célula o tejido. La exposición de las preparaciones a la luz UV,

violeta o azul provoca en ellos fluorescencia y que emitan luz visible a una longitud de onda determinada que puede ser medida [117] [118].

b.3. QUIMIOLUMINISCENCIA: técnica similar a la anterior en la que se utiliza como marcador una sustancia quimioluminiscente, es decir, una sustancia que emite radiación visible medida con un fotodetector al sufrir una reacción química. Ejemplo, IE magnético quimioluminiscente (CMIA) [119].

b.4. ELECTROQUIMIOLUMINISCENCIA (ECLIA): proceso en el que se generan especies excitadas en la superficie de un electrodo por reacción electroquímica a partir de precursores estables (Ru), que se relajan por emisión en el visible [120].

b.5. CITOMETRÍA DE FLUJO: se trata de una técnica que permite analizar de forma rápida, objetiva y cuantitativa células, núcleos, cromosomas, mitocondrias u otras partículas en suspensión [121]. Presenta la capacidad de medir múltiples parámetros celulares, como el tamaño, forma y complejidad y, por supuesto, cualquier componente celular o función que pueda ser marcada con un fluorocromo. Entre sus aplicaciones se encuentran la determinación de la actividad biológica de mAbs [122], detección de subpoblaciones celulares (inmunofenotipado), detección de apoptosis, ciclo celular y/o viabilidad celular, ensayos funcionales (metabolismo oxidativo, proliferación, calcio intracelular, pH, etc.), separación celular, etc. [123].

5. ELISA. TIPOS Y FACTORES INFLUYENTES

Dado que en la presente Tesis Doctoral la técnica analítica seleccionada para determinar la funcionalidad de los diferentes FBIO objeto de estudio ha sido el ELISA, a continuación se describe con más detalle.

En la actualidad existe una gran diversidad de diseños de ELISAs que son el resultado de las múltiples posibilidades de muestras existentes, de Abs y Ags, de fases sólidas, de sistemas de separación y de métodos de

Introducción

calibración y del ingenio de muchos investigadores científicos. Los ELISAs en todas sus variedades son IE heterogéneos, es decir, requieren de un paso de separación para eliminar el conjugado enzimático libre antes de proceder a determinar la cantidad de conjugado enzimático enlazado.

Existen diferentes clasificaciones para los ELISAs, algunas de ellas contradictorias, aunque basadas fundamentalmente en los principios de reacción. La clasificación clásica es la que se describe a continuación y que queda resumida en la siguiente tabla 9:

Tabla 9. Clasificación clásica de tipos de ELISAs

ELISA COMPETITIVO	DE UN SOLO PASO		
	DE DOS PASOS		
ELISA NO COMPETITIVO	DIRECTO		
	INDIRECTO		
	SÁNDWICH	DOBLE O “DAS”	De doble Ab
			De doble Ag
		HETERÓLOGO “HADAS”	

- *Dependiendo de la actividad enzimática se dividen en dos grandes grupos, ELISA competitivo y ELISA no competitivo:*

5.1. ELISA COMPETITIVO

Se basa en la competición entre un Ag a cuantificar y concentraciones conocidas del mismo Ag marcado con una enzima, por unirse al Ab correspondiente que se ha adsorbido en un soporte sólido. El Ag marcado es capaz de unirse a los sitios de enlace del Ab que no han sido ocupados por el Ag presente en la muestra objeto de estudio. A mayor cantidad de Ag en la muestra, menor cantidad de Ag marcado se unirá al soporte, y viceversa [117], es decir, la proporción de analito que se une al Ab es inversamente proporcional a la concentración de analito en la muestra [104]. Una desventaja que

ofrece este tipo de inmunoensayo es que requiere una cantidad uniforme de Ag enlazado a la fase sólida, lo cual puede ser difícil de conseguir para algunos tipos de Ags. Sin embargo esto puede ser paliado mediante el uso de Ags purificados, Ags biotinilados o de placas cubiertas con estreptavidina [104]. Dentro de este tipo de ELISA existen dos variedades:

5.1.1. ENSAYO COMPETITIVO DE UN SOLO PASO

En el formato competitivo de un solo paso, tanto el reactivo del Ag marcado, como el analito presente en la muestra, compiten por una cantidad limitada de Ab [124].

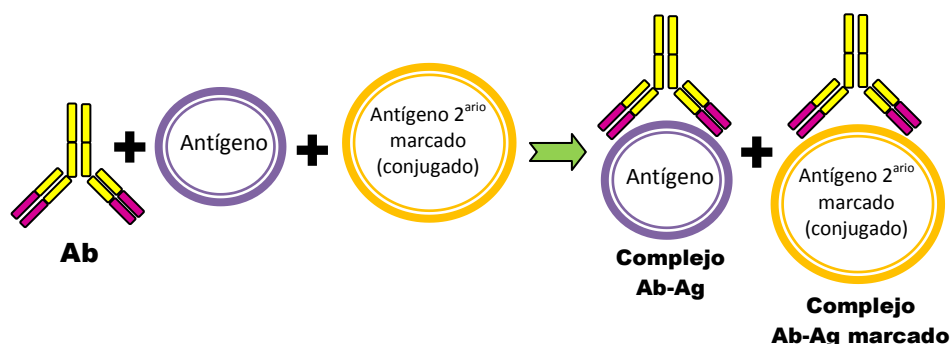


Figura 14. ELISA competitivo de un solo paso. Fuente: elaboración propia.

5.1.2. ENSAYO COMPETITIVO DE DOS PASOS

En el formato competitivo de dos pasos, la concentración de Ab del reactivo se encuentra presente en exceso comparada con la concentración de Ag. El reactivo del Ab primero se incuba con una muestra que contenga Ags de interés. A continuación en el segundo paso, se agrega el Ag marcado. Los formatos de ensayos competitivos de dos pasos proporcionan una sensibilidad mejorada, comparados con los formatos de ensayos de un solo paso [124].

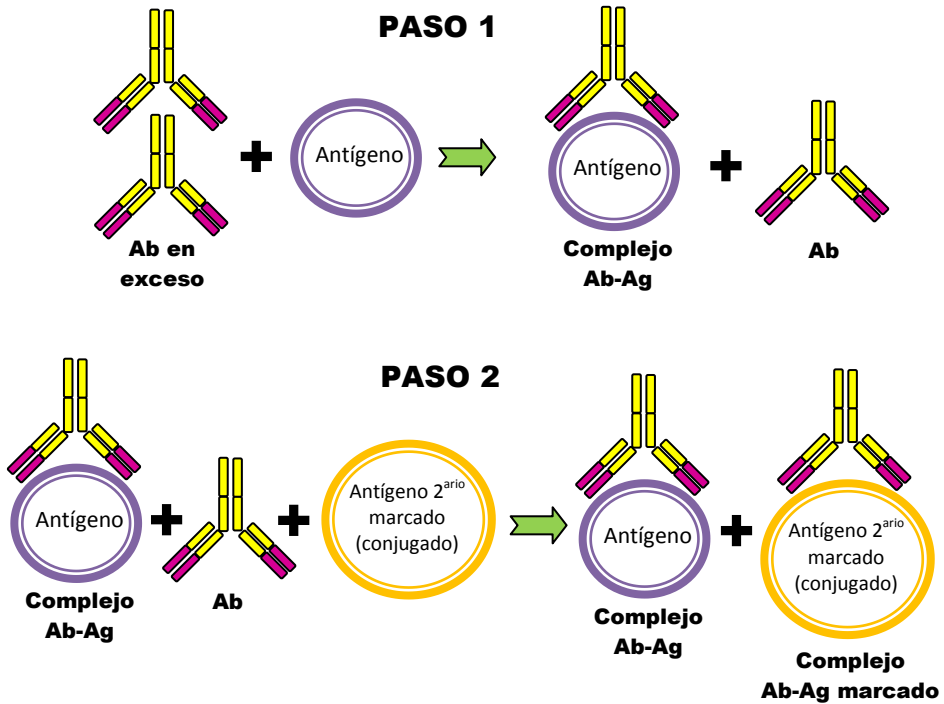


Figura 15. ELISA competitivo de dos pasos. Fuente: elaboración propia.

5.2. ELISA NO COMPETITIVO

Consiste en enfrentar la muestra objeto de análisis con el Ag o Ab que está fijado en la fase sólida. Se formará el complejo Ag-Ab y al agregar el conjugado reaccionará con el respectivo sustrato desarrollando color [125].

Dentro de los ELISAs no competitivos se diferencian:

5.2.1. ELISA DIRECTO

Usado para la detección de Ags. El Ag adsorbido en la placa se detecta mediante un Ab anti-Ag marcado. Consta de los siguientes pasos:

- a) Sensibilización de la placa con el Ag a determinar que contiene la muestra o analito.
- b) Adición del Ab anti-Ag marcado con la enzima que en presencia de su sustrato da un producto coloreado en disolución.
- c) Cuantificación del producto coloreado mediante el lector de ELISA. Entre etapa y etapa se harán los correspondientes lavados para eliminar las moléculas que no hayan reaccionado [126].

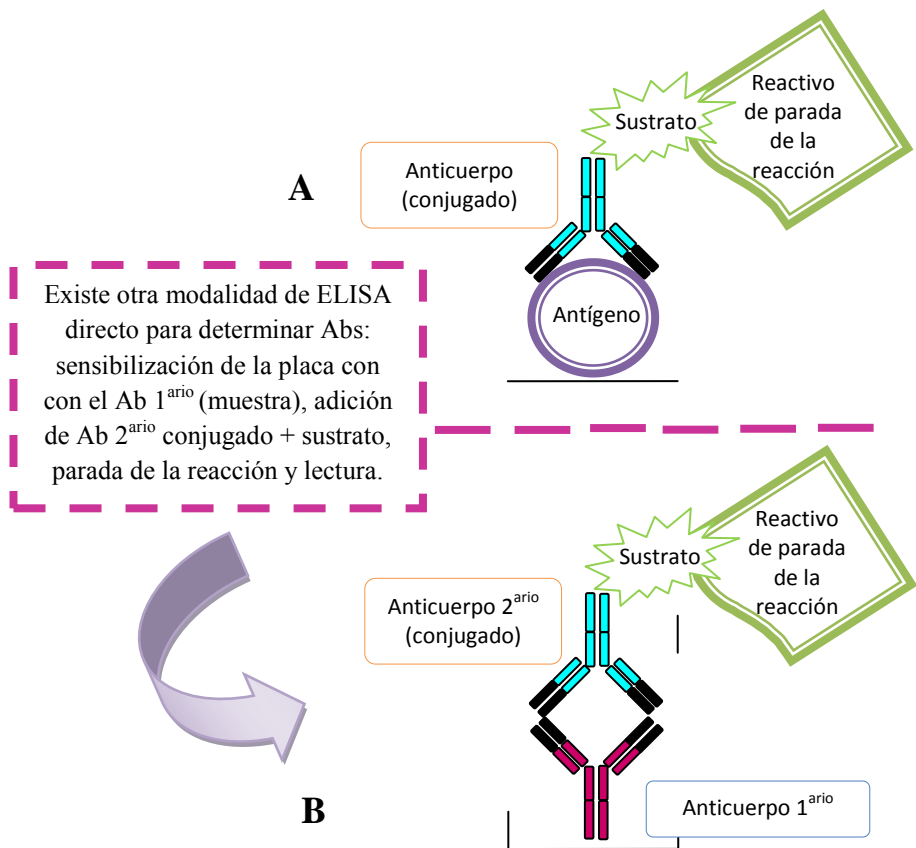


Figura 16. ELISA directo. Fuente: elaboración propia.

Introducción

5.2.2. ELISA INDIRECTO

Usado para la detección de Abs y Ags. Se incuba el Ag en un tampón apropiado en los pocillos de una placa de microtitulación y se adsorbe en las paredes de los pocillos. El Ag libre se elimina por lavado. Los Abs no unidos se eliminan por lavado y el Ag adsorbido en la placa reacciona con el Ab específico. El complejo Ag-Ab es entonces detectado mediante el empleo de un segundo Ab marcado enzimáticamente que reconoce dominios constantes de Abs y suele ser específico de especie, lo cual permite que un mismo Ab marcado sea capaz de detectar diferentes Ags [78] [126] [127]. El conjugado se une al Ab problema y una vez lavado el conjugado no ligado, el ligando unido se visualiza por la adición de un cromógeno (sustrato de la enzima). La cantidad de enzima enlazada indica la cantidad de Abs en la muestra y puede ser medida por la degradación de su sustrato [128].

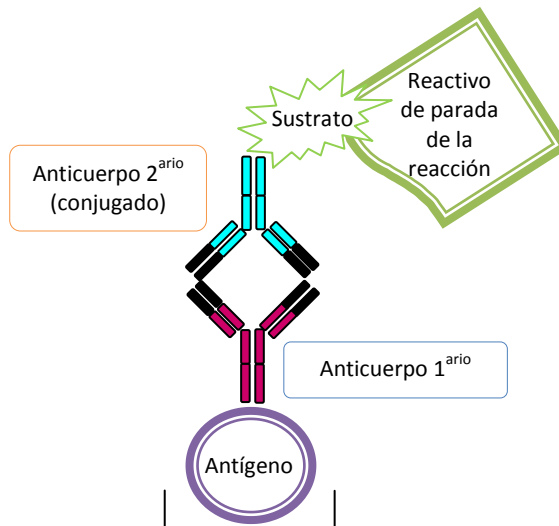


Figura 17. ELISA indirecto. Fuente: elaboración propia.

5.2.3. *ELISA SÁNDWICH* (no competitivo) o ensayo inmunométrico

El ELISA sándwich es un ensayo de captura de Ag o Ab y detección mediante inmunocomplejos. Se trata de un ensayo muy empleado y que tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo Ab o Ag.

a. ELISA sándwich doble o “DAS”

Existen dos tipos:

a.1. ELISA sándwich de doble Ab (Double Antibody Sándwich)

La prueba del doble Ab en sándwich se emplea para la detección de Ags [118]. Para su realización se necesitan 2 Abs apropiados: uno primario (unido a la fase sólida) y uno secundario (unido al enzima) que se unan a epítomos diferentes del Ag. Tras añadir la muestra que contiene el Ag a concentraciones variables, se incuba con el Ab secundario o conjugado (específico de Ag) [117]. El complejo final está formado por un Ab-enzima externo, un Ag en medio y un Ab interno, es decir, un sándwich en capas (Ab-Ag-Ab). Si el Ag ha reaccionado con los Abs adsorbidos en el primer paso, la prueba de ELISA es positiva. Si el Ag no es reconocido por el Ab adsorbido, la prueba de ELISA es negativa, porque el Ag no ligado es eliminado con el lavado, y no se une el conjugado Ab-enzima [118]. El sistema es adecuado para usar mAbs que puedan diferenciar epítomos en un mismo Ag. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo Ab [126]. Su sencillez y la disponibilidad de mAbs, hace que sea un sistema muy utilizado para la determinación de citocinas, hormonas, moléculas de adhesión solubles, receptores solubles, etc. [37] [117] [124].

Introducción

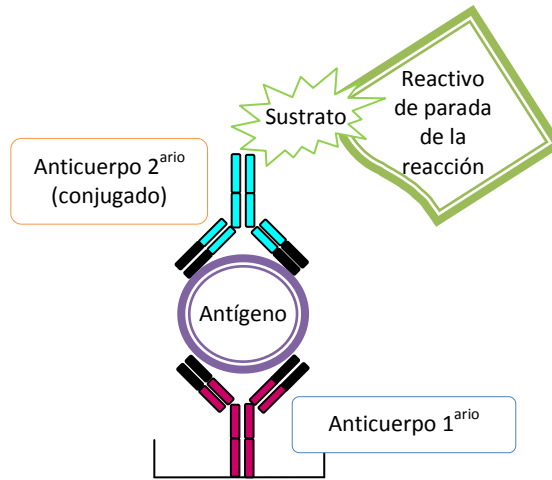


Figura 18. ELISA sándwich de doble Ab. Fuente: elaboración propia.

a.2. ELISA sándwich de doble Ag

Este tipo de ELISAs son usados para la detección de Abs y son muy útiles para la evaluación de la respuesta inmune inducida por vacunas; en estos ensayos, al igual que en los indirectos, los Ags capturan los Abs, pero en esta ocasión en lugar de un conjugado anti-Ig-enzima, se usa un Ag-enzima, de esta forma se alcanza la máxima sensibilidad y detectabilidad al no ser necesario diluir las muestras; sin embargo, se detectan todas las clases de Igs, lo que en ocasiones no es conveniente.

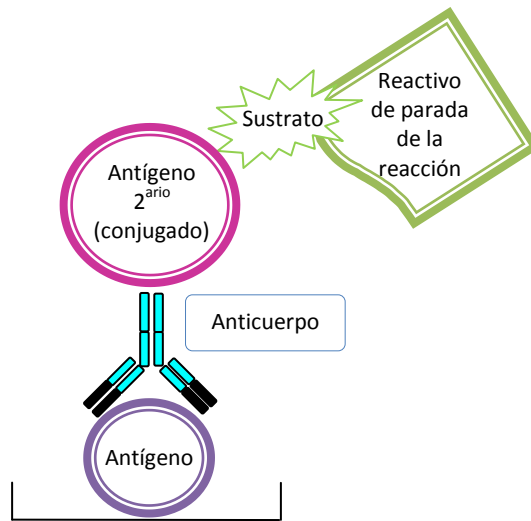


Figura 19. ELISA Sándwich de doble Ag. Fuente: elaboración propia.

b. ELISA sándwich heterólogo “HADAS”

Consta de las siguientes etapas: fijación al soporte insoluble de Abs específicos del Ag a detectar. Lavado para eliminar los Abs fijados deficientemente o no fijados. Adición de la muestra problema (Ag) que reaccionará específicamente con los Abs fijados al soporte. Lavado para eliminar los Ags que no hayan reaccionado y los restos de la muestra no fijados. Adición de Abs específicos del Ag a detectar (deben tener un epítipo diferente de los Abs con los que se ha tapizado el soporte), los cuales reaccionan con los Ags añadidos con la muestra problema y que se encuentran fijados a los Abs. Lavado para eliminar los Abs que no hayan reaccionado. Adición de Abs conjugados con una enzima anti-Abs empleados en el paso anterior. Lavado para eliminar los anti-Abs marcados que no hayan reaccionado. Adición de un sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcador. Se puede parar la reacción si se desea. Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado.

Introducción

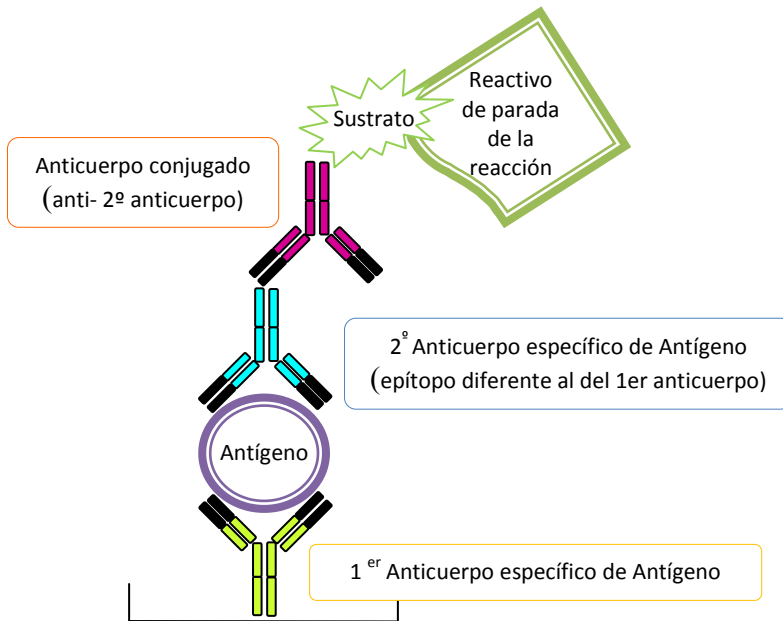


Figura 20. ELISA Sándwich heterólogo “HADAS”. Fuente: elaboración propia.

En general, los ensayos sándwich son más apropiados para la automatización de los sistemas ELISA, ya que puede disminuirse un paso de reacción añadiendo simultáneamente muestras y conjugado, aunque hay que prever las posibles interferencias del conjugado a elevadas concentraciones de Ags o Abs en la muestra.

5.3. FACTORES CLAVE EN EL DESARROLLO DE UN ELISA

Varios factores pueden afectar a la capacidad de un ELISA para detectar proteínas, siendo los más importantes los citados a continuación:

5.3.1. ADSORCIÓN

La fase sólida debe ser de un tipo que permita un fácil manejo (especialmente en los procesos de lavado) y que mantenga una buena reproducibilidad en la unión de Ags o Abs sobre su superficie. Se han ensayado numerosas fases sólidas, desde los tubos de cristal de los

orígenes, a las actuales microplacas de 96 pocillos de plástico tratado para aumentar su capacidad de adsorción, de moléculas, y con fondos de pocillo ópticamente transparentes para poder realizar las medidas espectrofotométricas en instrumentos adecuados, como son los espectrofotómetros de lectura de placas que han recibido el nombre de lectores ELISA. Las microplacas de 96 pocillos y un volumen de 350 μ l comúnmente empleadas, son especialmente ventajosas para procesar un elevado número de muestras, y una vez tapizadas, el material inmovilizado permanece reactivo mucho tiempo, siempre que se mantenga seco y a baja temperatura. Normalmente se utilizan microplacas de poliestireno de fondo plano que pueden adquirirse estériles y con o sin tapa [115] [116]. Actualmente se han desarrollado dispositivos de mayor capacidad, por ejemplo con 384 y 1.536 pocillos, adecuados para sistemas robotizados de screening masivo.

5.3.2. UNIÓN Y LAVADOS

Son dos procesos clave en el correcto desarrollo de un ELISA, ya que mediante las diferentes etapas de lavado se logra eliminar toda la fracción de moléculas que ha quedado libre, sin reaccionar, evitando de tal forma que se produzcan interferencias no deseadas. Además permite asegurar que la unión ha quedado establecida de forma correcta sin el impedimento de fracciones libres.

5.3.3. TIEMPOS DE INCUBACIÓN Y TEMPERATURAS

Ha de asegurarse que el tiempo y la temperatura de incubación son las correctas en cada etapa, ya que en este tipo de ensayos la mínima variación en cualquiera de estas dos variables puede dar lugar a grandes cambios en los resultados del ensayo. Por eso se debe trabajar con equipos bien calibrados, estufas de incubación, frigoríficos o congeladores en los que la temperatura sea exacta y no tenga leves variaciones y ser especialmente cuidadosos a la hora de finalizar una fase del ensayo y comenzar la siguiente, evitando que transcurra más o menos tiempo de incubación del adecuado.

Introducción

5.3.4. ENZIMAS Y SUSTRATOS

La popularidad de las enzimas como elemento marcador se debe a su enorme poder catalítico, su alta especificidad, el amplio espectro de sustratos que pueden usarse y la gran estabilidad de los conjugados.

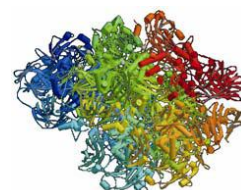
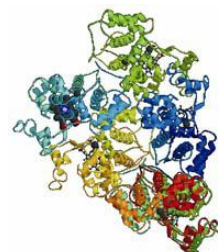
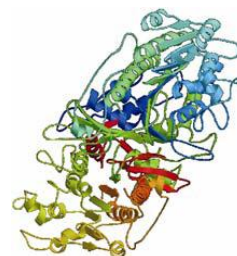
Existen determinados criterios de selección para una enzima marcadora:

- Económica y alto grado de pureza en su obtención.
- Presencia de grupos reactivos para la unión covalente.
- La conjugación debe ser sencilla y los conjugados activos y estables.
- Estable en forma libre y conjugada.
- Elevada actividad catalítica.
- Soluble.
- Sencilla, sensible y mensurable.
- No debe hallarse en el medio a examinar.
- Los elementos procedentes del material a examinar no deben interferir con la prueba.
- La actividad debe conservarse en las condiciones de la prueba.
- Disponibilidad de sustratos estables, baratos y no tóxicos que permitan la formación de productos estables.
- En los ensayos heterogéneos debe ser mínima la influencia de la fase sólida sobre la actividad enzimática.
- Las enzimas usadas en los ensayos homogéneos deben conjugarse fácilmente cerca del sitio activo sin que se altere su actividad.

Las enzimas más usadas en los ensayos heterogéneos (todas las modalidades de ELISA) son: peroxidasa, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucosa oxidasa, ureasa, glucoamilasa, acetilcolinesterasa, glutamato descarboxilasa y anhidrasa carbónica. Entre ellas, las enzimas empleadas con mayor frecuencia son: fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante y β -galactosidasa; a continuación se muestra una tabla (Tabla 10) con las ventajas y desventajas de cada una, así como los sustratos que se emplean con cada una de ellas. No obstante existen otras como son: microperoxidasa y citocromo C, entre otras [128] [129-132].

Tabla 10. Enzimas usadas con mayor frecuencia en ELISAs. Fuente: adaptada de [115].

FOSFATASA ALCALINA			
<p>SUSTRATOS</p> <table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> <p>Producto insoluble BCIP/NBT</p> </td> <td style="vertical-align: top;"> <p>Producto soluble -p-NPP: amarillo ($\lambda=405-410\text{nm}$). -4-MUP (fluorescente) $\lambda_{ex}=360\text{nm}$; $\lambda_{em}=440\text{ nm}$. -AMPPD (luminiscente).</p> </td> </tr> </table>		<p>Producto insoluble BCIP/NBT</p>	<p>Producto soluble -p-NPP: amarillo ($\lambda=405-410\text{nm}$). -4-MUP (fluorescente) $\lambda_{ex}=360\text{nm}$; $\lambda_{em}=440\text{ nm}$. -AMPPD (luminiscente).</p>
<p>Producto insoluble BCIP/NBT</p>	<p>Producto soluble -p-NPP: amarillo ($\lambda=405-410\text{nm}$). -4-MUP (fluorescente) $\lambda_{ex}=360\text{nm}$; $\lambda_{em}=440\text{ nm}$. -AMPPD (luminiscente).</p>		
<p>VENTAJAS</p> <ul style="list-style-type: none"> -Estable cuando se almacena y manipula adecuadamente. -Puede almacenarse a +4°C durante más de 6 meses. -Disponible como enzima libre o como conjugado. -Más estable que la peroxidasa. -Pequeño tamaño ($\approx 86\text{kDa}$). -Amplia variedad de sustratos comerciales disponibles. 			
<p>DESVENTAJAS</p> <ul style="list-style-type: none"> -Se inactiva por agentes quelantes, la acidez y los fosfatos orgánicos. -Menor relación de conjugación que la peroxidasa. -Necesita tampones específicos. -Puede causar impedimento estérico. -Más cara que la peroxidasa. 			
PEROXIDASA			
<p>SUSTRATOS</p> <table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> <p>Producto insoluble -TMB: azul $\lambda=650\text{ nm}$ amarillo $\lambda=450\text{nm}$ -DAB -4CN</p> </td> <td style="vertical-align: top;"> <p>Producto soluble -TMB: azul $\lambda=650\text{nm}$; amarillo $\lambda=450\text{nm}$ -ABTS: azul verdoso $\lambda=405-410\text{nm}$ -OPD: amarillo $\lambda=490\text{nm}$ -HPPA (fluorescente): $\lambda_{ex}=320\text{nm}$; $\lambda_{em}=404\text{nm}$ - HPA (fluorescente). - Luminol (quimioluminiscente glow). - Polifenoles (quimioluminiscente flash). - Esteres de acridina (quimioluminiscente flash). - Luciferina (bioluminiscente glow).</p> </td> </tr> </table>		<p>Producto insoluble -TMB: azul $\lambda=650\text{ nm}$ amarillo $\lambda=450\text{nm}$ -DAB -4CN</p>	<p>Producto soluble -TMB: azul $\lambda=650\text{nm}$; amarillo $\lambda=450\text{nm}$ -ABTS: azul verdoso $\lambda=405-410\text{nm}$ -OPD: amarillo $\lambda=490\text{nm}$ -HPPA (fluorescente): $\lambda_{ex}=320\text{nm}$; $\lambda_{em}=404\text{nm}$ - HPA (fluorescente). - Luminol (quimioluminiscente glow). - Polifenoles (quimioluminiscente flash). - Esteres de acridina (quimioluminiscente flash). - Luciferina (bioluminiscente glow).</p>
<p>Producto insoluble -TMB: azul $\lambda=650\text{ nm}$ amarillo $\lambda=450\text{nm}$ -DAB -4CN</p>	<p>Producto soluble -TMB: azul $\lambda=650\text{nm}$; amarillo $\lambda=450\text{nm}$ -ABTS: azul verdoso $\lambda=405-410\text{nm}$ -OPD: amarillo $\lambda=490\text{nm}$ -HPPA (fluorescente): $\lambda_{ex}=320\text{nm}$; $\lambda_{em}=404\text{nm}$ - HPA (fluorescente). - Luminol (quimioluminiscente glow). - Polifenoles (quimioluminiscente flash). - Esteres de acridina (quimioluminiscente flash). - Luciferina (bioluminiscente glow).</p>		
<p>VENTAJAS</p> <ul style="list-style-type: none"> -Estable cuando se almacena y manipula adecuadamente. -Puede almacenarse a +4°C durante más de 6 meses. -Disponible como enzima libre o como conjugado. -Bastante barata. -Pequeño tamaño ($\approx 40\text{ kDa}$). -Relación de conjugación 4:1. -No causa impedimento estérico. -Amplia variedad de sustratos comerciales disponibles. 			
<p>DESVENTAJAS</p> <ul style="list-style-type: none"> -Incompatible con bastantes estabilizantes (azida sódica, etc.). -La peroxidasa endógena y algunos metales interfieren en su actividad. 			
β-GALACTOSIDASA			
<p>SUSTRATOS</p> <p>Producto soluble -MUG (fluorescente) $\lambda_{em}=440\text{ nm}$. -AMPGD (luminiscente).</p>			
<p>VENTAJAS Incrementa su tasa de reacción en presencia de alcoholes.</p>			
<p>DESVENTAJAS</p> <ul style="list-style-type: none"> -Sufre inhibición inducida por Abs. -Tetrámero de 300kDa. -Frecuentemente causa impedimento estérico. 			



Introducción

5.3.5. ANTICUERPOS Y ANTÍGENOS EMPLEADOS

En todo método ELISA deben ser empleados los Abs y Ags adecuados al objetivo perseguido, de forma que la calidad y pureza de los mismos esté asegurada. Si son adquiridos a través de casas comerciales, lo que es habitual, deben venir acompañados de su correspondiente certificado de análisis donde se faciliten todos los datos referentes al producto, así como debe de ser indicado el lote de fabricación.

5.3.6. DETECTORES

Los lectores ELISA son espectrofotómetros capaces de realizar lecturas en serie de cada uno de los pocillos de la placa ELISA. Además de los lectores similares a los espectrofotómetros convencionales, con capacidad de medir a todas las longitudes de onda en la zona ultravioleta y del visible, los lectores de ELISA más comúnmente utilizados y comercializados disponen de sistemas de filtros que sólo permiten la lectura de un conjunto de longitudes de onda. Son las que se corresponden con las necesarias para medir la absorbancia de los cromógenos más comúnmente utilizados [116]. Además existen sistemas de detección colorimétricos, fluorescentes y luminiscentes [115].

6. DESCRIPCIÓN DE LOS FBIOs ESTUDIADOS

6.1. INFLIXIMAB



Nombre genérico: INFLIXIMAB	Nombre comercial: REMICADE®
Laboratorio: Janssen Biologics B.V.	Grupo terapéutico: Inhibidores de TNF- α . Anticuerpo monoclonal
Código ATC: L04AB02	Vía de administración: perfusión intravenosa
Tipo de dispensación: uso hospitalario	Vía de registro: centralizada

Figura 21. Remicade®. Fuente: elaboración propia

En agosto de 1999, la EMEA emitió la autorización de comercialización válida en toda la UE para el medicamento Remicade[®], que contiene infliximab (IFX) como principio activo. Esta decisión se basó en el dictamen favorable emitido a partir del informe de evaluación realizado por el Comité de Especialidades Farmacéuticas (CPMP) a fecha 19 de mayo de 1999 [133] [134].

IFX es un chAb con regiones variables murinas y región constante humana (25 % murina, 75 % humana). Su estructura química se corresponde con la de una IgG1 humana formada por dos cadenas polipeptídicas ligeras K y dos cadenas pesadas γ unidas por puentes disulfuro, presentando una elevada especificidad y afinidad por el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) [135], principal mediador en procesos inflamatorios y autoinmunes, así como en el transcurso de distintas agresiones celulares como por ejemplo las infecciones [136] .

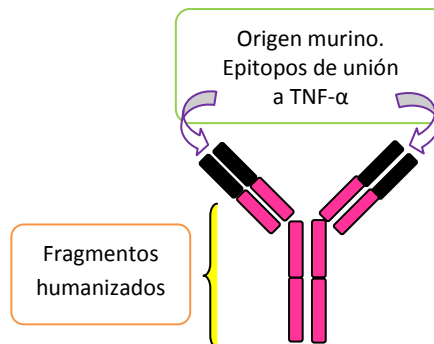


Figura 22. Estructura de infliximab. Fuente: elaboración propia.

6.1.1. *Forma farmacéutica, composición y excipientes*

La **forma farmacéutica** de IFX se corresponde con un polvo liofilizado para reconstituir, de gránulos blancos para solución para perfusión. La solución reconstituida presenta una coloración entre incolora y amarillo claro y opalescente. **Composición cualitativa y cuantitativa:** cada vial contiene 100 mg de IFX que deben ser reconstituidos en 10 ml de agua

Introducción

para preparaciones inyectables, siendo por tanto su concentración de 10 mg/ml. **Lista de excipientes:** sacarosa; polisorbato 80; fosfato sódico monobásico y fosfato sódico dibásico [136].

Es necesario remarcar la existencia en el mercado de varios biosimilares de IFX. Flixabi[®]* Inflectra[®] Remsima[®] son los biosimilares de IFX autorizados por la EMA y comercializados en España.

6.1.2. Procedimiento de obtención

IFX es un mAb IgG1 quimérico obtenido mediante tecnología de ADN recombinante a partir de células recombinantes cultivadas en perfusión continua. Mediante esta técnica se combina la región variable de un mAb de ratón con las regiones constantes de las cadenas H y L de la IgG1 humana, de forma que se consigue que el 75 % de la molécula sea humana y el 25 % conserve su origen murino.

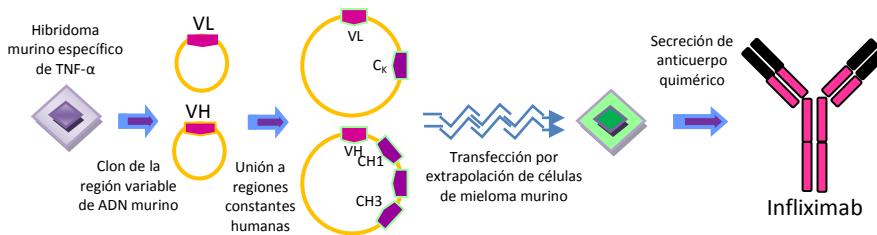


Figura 23. Procedimiento de obtención de infliximab. Fuente: elaboración propia.

Adaptado de Remicade (infliximab) www.astrobody.xyz.

6.1.3. Mecanismo de acción

El TNF- α es producido por una gran variedad de células inflamatorias, predominantemente macrófagos y linfocitos. Existen dos receptores para el TNF en la mayoría de las células y tejidos del organismo denominados TNF-RI y TNF-II, estando la mayoría de los efectos biológicos mediados por su unión al TNF-RI.

Se acepta que IFX actúa principalmente bloqueando los efectos y reduciendo la producción de TNF- α mediante la unión al mismo, tanto en su forma soluble como unido a los receptores de membrana, logrando interrumpir la cascada secuencial de activación de las vías inflamatorias mediadas por esta citoquina, pero no se une a la linfoxina (TNF- β).

Dicha unión se establece a través del componente murino (región variable Fab) mientras que el componente humano (región constante Fc) es usado para reducir la antigenicidad.

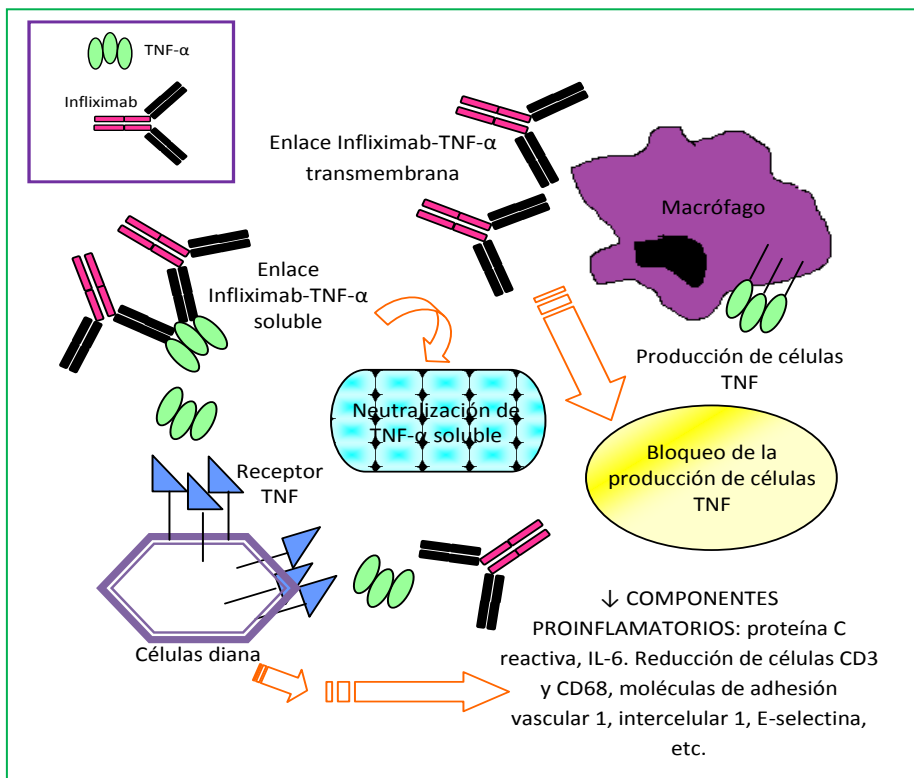


Figura 24. Mecanismo de acción de infliximab. Fuente: elaboración propia.

IFX forma complejos estables que no se disocian al unirse a TNF- α de forma específica [133-135] [137]. También actúa sobre la CDC y ADCC:

Introducción

linfocitos T y macrófagos. El tamaño (149 kDa) y estructura son similares a las de estos Abs naturales. Cada molécula de IFX es capaz de unirse a dos moléculas de TNF- α y hasta tres moléculas de IFX pueden unirse a cada homotrímero de TNF- α , así bloquean todos los receptores de unión de TNF- α [135].

Tras la administración de IFX, la formación de los complejos inmunes IFX-TNF- α hace que se disminuya la inflamación mediante la reducción de los niveles séricos de componentes proinflamatorios como la proteína C reactiva (pCr) y la IL-6. También hay una reducción de células CD3 y CD68, moléculas de adhesión vascular 1, intercelular 1 y la E-selectina.

6.1.4. Aplicaciones

Como se ha comentado anteriormente, TNF- α es el principal mediador en procesos inflamatorios y autoinmunes, así como en el transcurso de distintas agresiones celulares como por ejemplo las infecciones. Está implicado por tanto en el curso de un gran número de patologías como la enfermedad de Crohn (EC), artritis reumatoide (AR), artritis psoriásica (APs), espondilitis anquilosante (EA), etc.

Dado el mecanismo de acción de IFX, desde su autorización, las indicaciones del mismo han ido aumentando, de forma que actualmente es empleado en el tratamiento de patologías muy diversas en las que se encuentra implicado en mayor o en menor medida el TNF- α , tales como:

- **AR y otras enfermedades reumatológicas:** Pacientes con AR, APs y EA, entre otras, presentan elevados niveles en suero de TNF- α . IFX ha conseguido remitir los síntomas clínicos en casos que han sido refractarios a los tratamientos habituales, presentando además un bajo perfil inmunogénico.
- **Enfermedad inflamatoria intestinal (EII):** IFX ha demostrado ser efectivo en el tratamiento de pacientes que presentan EC y colitis ulcerosa (CU), cuyo tratamiento con medicamentos convencionales no ha sido exitoso. En la EC es capaz de mantener la remisión de los síntomas,

además de disminuir la incidencia de fístulas. En tanto que, en CU induce la remisión del proceso inflamatorio.

- IFX ha sido utilizado en otras patologías, como la *sarcoidosis sistémica complicada y la enfermedad de Still*, lográndose la remisión de síntomas y del proceso [138-141].
- En el *síndrome de Behçet*, en el cual existe una producción exagerada de TNF y en cuyo tratamiento los enfoques farmacológicos convencionales han mostrado no ser exitosos, la administración de IFX ha logrado la remisión de la enfermedad con buenos resultados, en períodos que fluctúan entre 10 semanas y 6 meses [142-145].
- En *lupus eritematoso sistémico* (LES) experimental, inducido por mAbs dirigidos contra ADN humano en ratones C3H.SW, el tratamiento con IFX y Pentoxifilina logró reestablecer los niveles de IL-1 y de TNF a aquellos obtenidos antes de la inducción del LES [146].
- **Enfermedades dermatológicas:** en muchos casos los tratamientos actuales para el manejo de la psoriasis están asociados a efectos adversos y tóxicos. Estudios preliminares con IFX han mostrado efectividad del tratamiento a la cuarta semana del inicio, lográndose 91 % de respuesta comparado contra placebo.
- **Enfermedades infecciosas:** El TNF es considerado el mediador clave en el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y fallo orgánico múltiple. Los escasos ensayos clínicos en pacientes con sepsis han mostrado que el uso de mAbs, combinado con tratamientos de soporte, presenta mayor eficacia que el de receptores solubles de TNF. En enfermedades virales, como influenza y virus sincitial respiratorio (RSV), se ha demostrado de forma experimental que la inhibición de TNF disminuye la severidad de las mismas. Por tanto, en estos casos puede estar indicado el uso de IFX.
- **Enfermedades neurológicas:** los avances dirigidos a intervenir la progresión de lumbociática, sugieren que el TNF juega un papel clave. En estudios realizados en cerdos, en presencia de aplicaciones de IFX, se

Introducción

consiguió prevenir la reducción de la velocidad de conducción, el edema intraneural y episodios de trombosis que cursan con esta patología. Esto constituye una aplicación inicial de la terapia anti-TNF en este tipo de patología.

La tabla 11 muestra las enfermedades en las que puede ser de utilidad el uso de IFX.

Tabla 11. Enfermedades en las que puede ser de utilidad infliximab.

Fuente: [147].

✦ Enfermedades reumatológicas	
Conectivopatías	Espondiloartropatías
Artritis Reumatoide	Vasculitis sistémicas
Síndrome de Sjögren	Síndrome de Behçet
Miopatías inflamatorias	Artritis crónica juvenil
Esclerodermia	Enfermedad de Still del adulto
✦ Enfermedad ocular inflamatoria	
Síndrome seco	
Uveítis	
Escleritis	
✦ Enfermedades dermatológicas	
Psoriasis	
Pioderma gangrenoso	
✦ Enfermedades digestivas	
Enfermedad de Crohn	
Colitis ulcerosa	
Cirrosis biliar primaria	
✦ Infliximab en otras enfermedades y nuevas perspectivas terapéuticas	
Sarcoidosis	
Enfermedad de injerto frente a huésped	
Lumbociática *	
Osteolisis periprotésica *	

* Sin efectividad clínica publicada

6.1.5. Consideraciones farmacológicas

IFX se administra *exclusivamente por vía i.v., en medio hospitalario*, oscilando la dosis eficaz entre 5 y 20 mg/kg. En algunos casos se administra en forma de dosis única, mientras que en otros, se emplean varias infusiones.

De forma general la pauta de administración suele ser la mostrada en la siguiente tabla 12:

Tabla 12. Pauta de administración de IFX

1 ^{er} tratamiento	0 semanas
2 ^o tratamiento	2 semanas después del 1 ^{er} tratamiento
3 ^{er} tratamiento	6 semanas después del 1 ^{er} tratamiento
Más tratamientos	Cada 6 a 8 semanas, según la enfermedad

Todos los pacientes que reciben Remicade[®] deben ser observados al menos durante una hora después de la infusión, para detectar la ocurrencia de efectos secundarios. Deben tenerse a mano medicamentos, equipos para abrir vías respiratorias artificialmente y otros materiales apropiados para el tratamiento de estos efectos [148].

IFX se distribuye predominantemente en el compartimento vascular. Los corticosteroides aumentan el volumen de distribución en un 17 % probablemente por sus efectos sobre los electrolitos y retención de fluidos. La semivida de eliminación es de unos 9,5 días, aunque las vías de eliminación del mismo no están bien caracterizadas. Tras la administración de la dosis no suelen darse efectos acumulativos. En la mayoría de los pacientes, IFX se puede detectar en el suero durante al menos 8 semanas después de la dosis única recomendada de 5 mg/kg para la EC y de 3 mg/kg cada 8 semanas para la AR como dosis de mantenimiento [136].

Introducción

6.1.6. *Efectos adversos*

Los efectos adversos producidos por el uso de IFX hasta el momento son [149-157]:

- Reacciones en el punto de inyección (más frecuentes): eritemas, urticaria, prurito, etc. [133] [158] [159].
 - Reacciones en la infusión: urticaria, prurito, rash, dolor de cabeza, fiebre, escalofríos, taquicardia o disnea, lo que obliga en estos casos a recibir pre-medicación como antihistamínicos, paracetamol, o corticosteroides [133] [159].
 - Infecciones respiratorias altas
 - Cefaleas
 - Sinusitis
 - Exantemas
- } → 53 % de pacientes
- Infecciones graves: neumonías, pielonefritis → % de pacientes
 - Tuberculosis → 28 casos en 2000, 7 en España. La mayoría de casos se han correlacionado con lugares en los que la tuberculosis es un problema de salud público endémico [133] [154] [158-160].
 - Neoplasias (tumores sólidos y linfomas)
 - Reacciones de hipersensibilidad aguda y retardada: fiebre, escalofríos, prurito, urticaria, disnea, hipo o hipertensión, etc. → 20 % de pacientes
 - Problemas cardiovasculares
 - Citopenias

En conclusión, el uso de IFX produce efectos adversos de leves a moderados, que a menudo se resuelven o son bien tolerados. Los efectos secundarios serios o importantes que condicionan un efecto adverso de por vida son poco frecuentes [133]. Entre las reacciones adversas más graves asociadas al uso de IFX se encuentran: reactivación del VHB, insuficiencia cardíaca congestiva, infecciones graves (como septicemia, infecciones oportunistas y tuberculosis), enfermedad del suero (reacciones de hipersensibilidad retardada), reacciones hematológicas, LES /síndrome

pseudolúpico, enfermedades desmielinizantes, melanoma, neoplasias pediátricas, acontecimientos hepatobiliares, linfomas, linfoma de células T hepatoesplénico, leucemia, carcinoma de células de Merkel, sarcoidosis/reacción similar a sarcoidosis, abscesos intestinales o perianales (en la EC), y reacciones graves a la perfusión.

6.2. BEVACIZUMAB

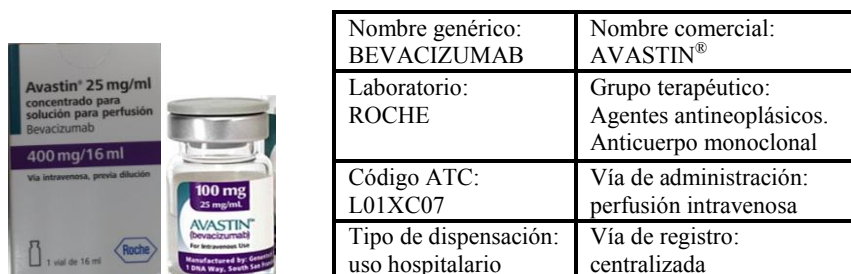


Figura 25. Avastin®. Fuente: elaboración propia.

6.2.1. Forma farmacéutica, composición y excipientes

Actualmente bevacizumab (BVZ) es el principio activo del medicamento comercial Avastin® (Genentech, Inc, San Francisco, CA, USA). A día de hoy no hay aprobado para su uso comercial ningún biosimilar de BVZ.

BVZ es un mAb IgG1 recombinante humanizado que reconoce y neutraliza la actividad biológica de todas las isoformas del factor de crecimiento epidérmico vascular (VEGF) humano (anti-VEGF), capaz de prevenir la angiogénesis mediante la unión a VEGF-A extracelular impidiendo su unión a los receptores en las superficies de células endoteliales e inhibiendo por tanto la vía de señalización celular mediada por VEGF-A.

Su estructura contiene regiones humanas y las regiones determinantes de complementariedad de un Ab murino que se une a VEGF-A.

Introducción

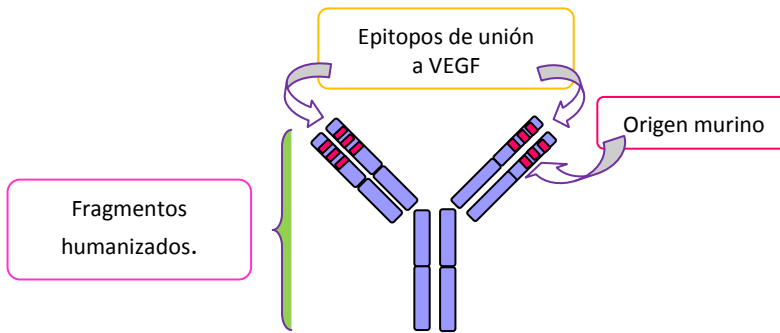


Figura 26. Estructura de bevacizumab. Fuente: elaboración propia.

La **forma farmacéutica** de BVZ se corresponde con un concentrado para solución para perfusión. Es un líquido de incoloro a marrón pálido y de transparente a ligeramente opalescente. **Composición cualitativa y cuantitativa:** cada ml contiene 25 mg de BVZ. Cada vial contiene bien 100 mg de BVZ en 4 ml o bien 400 mg en 16 ml, correspondiente a 1,4 o 16,5 mg/ml cuando se diluye según se recomienda. **Lista de excipientes:** trehalosa dihidrato; fosfato sódico; polisorbato 20 y agua para preparaciones inyectables [161-163].

6.2.2. Procedimiento de obtención

En 1997, a partir de un procedimiento de humanización del mAb murino anti-VEGF A.4.6.1 mediante mutagénesis dirigida, se obtuvo el mAb humanizado BVZ, que se une a VEGF con una afinidad muy similar a la del Ab original [164].

Así, BVZ se produce a través de biotecnología recombinante a partir de una línea celular de ovario de hámster chino y tiene un peso molecular de 149 kD. En este proceso, los aminoácidos que forman las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) del mAb A.4.6.1 y siete aminoácidos adicionales de sus regiones marco se introdujeron en la secuencia consenso de una IgG1 humana. Esta variante humanizada (93

% de su secuencia humana y 7 % de ratón) se une al VEGF con una *KD* de 1,8 nmol/l, similar a la de su Ab parental.

El epítipo reconocido por BVZ se definió a partir de la resolución de la estructura tridimensional del complejo entre su fragmento Fab y el VEGF, en combinación con un exhaustivo análisis de mutagénesis a ambas partes de la interfaz mediante sustituciones puntuales por alanina. Este estudio reveló que los aminoácidos M81, R82, I83, G88, Q89 y G92 localizados en el lazo β 5- β 6 del VEGF humano son esenciales para la unión de este Ab. El aminoácido G88 es el responsable de la especificidad del BVZ por el VEGF humano ya que en el VEGF de ratón en esta posición aparece un residuo de serina. Los mismos investigadores [165] habían establecido previamente que los efectos neutralizantes de BVZ se producen a través del impedimento estérico sobre la interacción del VEGF con ambos receptores [161].

6.2.3. Mecanismo de acción

BVZ mantiene la alta especificidad y afinidad del Ab parental (mAb murino A.4.6.1122 VEGFA) para VEGF-A, con reducida inmunogenicidad y una prolongada vida media biológica: 17-21 días. La región humana constituye el armazón o esqueleto del Ab, y la fracción murina constituye las regiones determinantes de complementariedad que se unen a VEGF.

BVZ neutraliza la capacidad de VEGF de unirse al receptor de VEGF (VEGFR), principalmente VEGF-1 (fit-1) y VEGF-2 (KDWflk-1), en la superficie de células endoteliales. Los estudios *in vitro* indican que la activación de VEGF-1 contribuye a la proliferación celular, la supervivencia y la permeabilidad; y la activación de VEGF-2 induce la migración celular y la producción de factor tisular. La interacción de BVZ inhibe la actividad mitogénica de las células endoteliales, mejora la actividad de permeabilidad vascular, y otras funciones biológicas promotoras de angiogénesis de VEGF [166].

Introducción

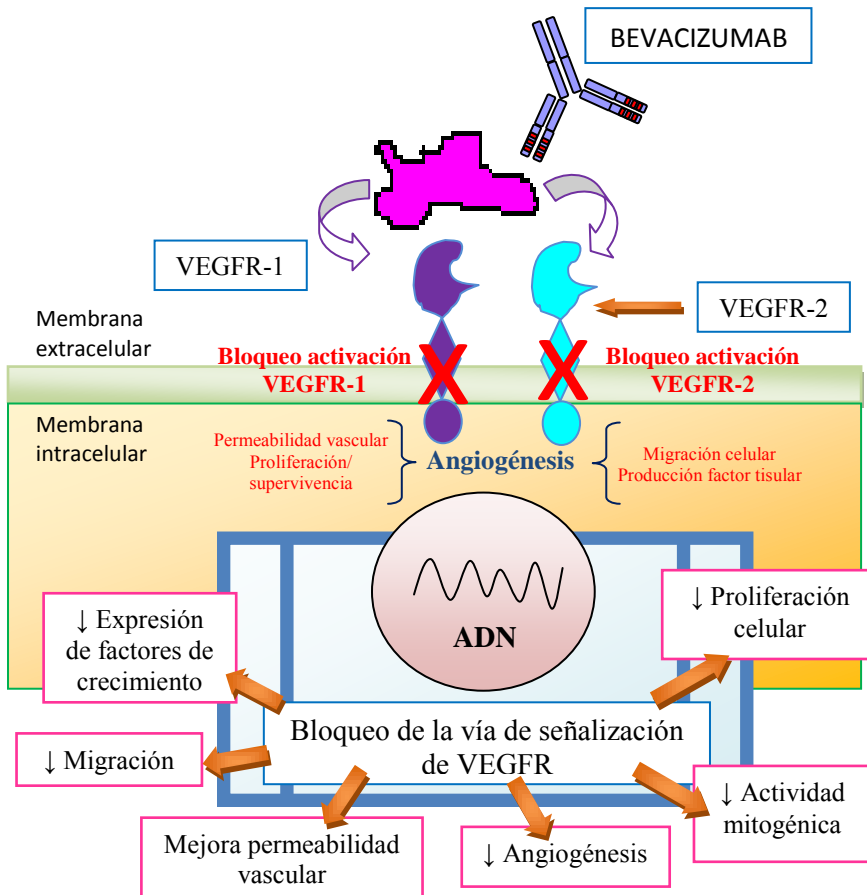


Figura 27. Mecanismo de acción de bevacizumab. Fuente: elaboración propia.

6.2.4. Aplicaciones

➤ De indicación autorizada

Después de una extensa caracterización preclínica y de la ejecución con éxito de varios ensayos clínicos, en el año 2004 la FDA de los EE.UU. aprobó el uso de BVZ para el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico (CCRM) como terapia de primera línea en combinación con quimioterapia i.v. basada en 5- fluorouracilo. El BVZ se convirtió así en el primer agente anti-angiogénico sistémico registrado con beneficio clínico demostrado como terapia de primera línea en CCRM. Actualmente

BVZ está aprobado también por la FDA para el tratamiento como terapia de primera línea del cáncer de mama metastásico (CMM) [167] avanzado no escamoso, cáncer de células no escamosas de pulmón (CCNEP), cáncer avanzado de ovario epitelial, trompa de Falopio o peritoneal primario y carcinoma de células renales avanzado o metastásico (CCReM) y como terapia de segunda línea para el glioblastoma multiforme en grandes ensayos clínicos aleatorios (2004; 2006; 2007; 2009 y 2011) y glioblastoma recurrente (2009).

➤ Fuera de indicación autorizada

A través de la bibliografía se puede ver que está bien definido que la sobreexpresión de VEGF está implicada en la patogénesis de enfermedades neovasculares del ojo como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), retinopatía diabética proliferativa, edema macular diabético y oclusión venosa retiniana. Así, se creyó que el uso de inhibidores VEGF podría ser efectivo en la reducción de la neovascularización corneal, y por ello, BVZ se usa también, fuera de su indicación autorizada, como tratamiento intravítreo para las enfermedades neovasculares oculares como la DMAE y otras patologías relacionadas, ya que este fármaco tiene una diana específica similar a la de ranibizumab (mAb específico para el tratamiento de estas patologías), pero a un coste menor. El primer trabajo en relación con el uso intravítreo de BVZ fue publicado en 2005 [168] y desde entonces, varios informes han apoyado el uso intravítreo del mismo, aunque es esencial continuar investigando su seguridad [161] [169].

Actualmente, BVZ está siendo usado en casi 1.000 ensayos clínicos, y, a pesar de los resultados prometedores, sus efectos en ciertos tipos de cáncer son modestos o incluso irrelevantes, con un perfil de toxicidad diferente. Así, a finales de 2010, la FDA fue aconsejada por su panel de expertos en oncología de no aprobar el CMM como indicación para el tratamiento con BVZ, desafiando a Genentech a llevar a cabo un nuevo ensayo confirmatorio [170]. Además, estudios recientes han asociado glioblastomas tratados con BVZ con un fenotipo de tumor invasivo más agresivo [171]. Por otro lado, la incorporación de BVZ como adyuvante quimioterapéutico en regímenes para la prevención de la recaída en

Introducción

estadío temprano de cáncer colorrectal (CCR) o el triple cáncer de mama negativo (3CM-), ha dado lugar a resultados bastante decepcionantes hasta ahora [172]. Curiosamente, el hecho de que BVZ ha demostrado efectos beneficiosos en el CCRm, pero no en la etapa 2 y 3 de tumores, claramente sugiere que la angiogénesis en el tumor primario y en lesiones metastásicas implica diferentes mecanismos [173] que tienen que ser tratados de diferente forma [174].

Aunque el impacto clínico de estos resultados aún no está claro, es obvio que la terapia anti-angiogénica tendrá que ser perfeccionada.

El debate ha sido impulsado aún más por los altos costes en medicamentos, sus efectos adversos y el conflicto de evidencia preclínica en cuanto a su papel biológico en el papel de la micrometástasis. Con más de 20.000 pacientes que ya están inscritos o que se espera que se inscriban en uno de los ensayos con BVZ adyuvantes en los próximos cinco años, el desarrollo de modelos preclínicos válidos para dilucidar los mecanismos moleculares de BVZ en el tratamiento adyuvante se ha convertido en una prioridad.

La posibilidad de inhibir de manera diferente la compleja red de interacciones establecidas por el VEGF en el organismo, y modular así distintos efectos biológicos, ha hecho que la búsqueda de nuevos Abs anti-VEGF se mantenga como un área activa de investigación en múltiples laboratorios, paralelamente a la aplicación de BVZ. Dentro de esta área de investigación, tiene un papel fundamental la tecnología de bibliotecas de fragmentos de Ab sobre fagos filamentosos que se ha convertido en la plataforma de selección *in vitro* más exitosa para la obtención de Abs humanos debido a que es robusta, de bajo coste, y ofrece un gran potencial para su automatización.

6.2.5. Consideraciones farmacológicas

El metabolismo y la eliminación de BVZ son similares a los de la IgG endógena, es decir, el catabolismo se produce principalmente por vía proteolítica en todo el organismo, incluyendo las células endoteliales, y no

depende principalmente de la eliminación hepática y renal [163]. Las propiedades farmacocinéticas de BVZ se caracterizan por un modelo de dos compartimentos. BVZ tiene una baja tasa de aclaramiento (media: 9,2 ml/h), un volumen limitado del compartimento central (media $V_c = 3280$ ml) y una larga vida media de eliminación de aproximadamente 20 días. Estas propiedades ofrecen clínicamente la oportunidad de mantener los niveles plasmáticos eficaces de BVZ al administrar el fármaco cada dos o tres semanas, y permitir la coordinación programada de BVZ con la combinación de agentes citotóxicos.

Sin embargo, el análisis de grandes cohortes de población ha demostrado que la variabilidad interindividual de los niveles plasmáticos de BVZ y otros parámetros farmacocinéticos van desde 15 a 43 %, siendo influenciado por el peso corporal de línea base, la albúmina sérica y la carga tumoral. La respuesta a la terapia no sólo depende de la dosis y la duración de un tratamiento farmacológico, también depende del estadio del tumor y el tipo de tumor, es decir, el microambiente del órgano hospedador. Por lo tanto, diferentes fármacos pueden ser eficaces en diferentes etapas de la progresión del tumor [174]. Esta amplia variación puede explicar, al menos en parte, las diferencias entre los sujetos de la actividad biológica de BVZ y lleva implicaciones significativas para la intensidad de la dosis del medicamento, mantener niveles estables y ajuste de la duración de la administración tanto en macro como en micrometástasis [162].

La duración del tratamiento con BVZ también se ha discutido ampliamente. Un estudio del Grupo de Oncología Ginecológica constituido por profesionales de diferentes estados de los EE.UU. reveló que un tratamiento más prolongado con BVZ da lugar a una mejora en los beneficios clínicos [175]. Ahora bien, una administración más prolongada de este fármaco se asocia inevitablemente con más efectos secundarios debido a la toxicidad [176] y con unos costes enormes.

Introducción

6.2.6. Efectos adversos

Los efectos secundarios clínicamente relevantes más comunes de BVZ y otros fármacos anti-angiogénicos, incluyen la toxicidad renal. Entre las reacciones adversas más graves se encuentran las perforaciones gastrointestinales (frecuencia de menos de 2 %) [174] así como regresión vasal en el páncreas, la tráquea, el tiroides, y el intestino delgado; hemorragia, incluyendo hemorragia pulmonar / hemoptisis, más frecuente en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico y tromboembolismo arterial, microangiopatía trombótica y toxicidad hematológica resultante en trombopenia y leucopenia [177]. Las reacciones adversas observadas globalmente con mayor frecuencia en pacientes tratados con Avastin® son hipertensión, proteinuria, fatiga o astenia, diarrea y dolor abdominal. Los análisis de los datos de seguridad clínica sugieren que la incidencia de hipertensión y proteinuria durante la terapia con Avastin® probablemente sea dosis dependiente [163].

6.3. CETUXIMAB



Nombre genérico: CETUXIMAB	Nombre comercial: ERBITUX®
Laboratorio: MERCK KGaA	Grupo terapéutico: Agentes antineoplásicos. Anticuerpo monoclonal
Código ATC: L01XC06	Vía de administración: perfusión intravenosa
Tipo de dispensación: uso hospitalario	Vía de registro: centralizada

Figura 28. Erbitux®. Fuente: elaboración propia.

6.3.1. Forma farmacéutica, composición y excipientes

El MB Erbitux® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) es un mAb IgG1_K quimérico de 152 KDa producido en una línea de células de mamíferos (Sp2/0) mediante tecnología de ADN recombinante, cuya diana específica

es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), implicado en el control de la supervivencia celular, la progresión del ciclo celular, la angiogénesis, la migración celular y la invasión celular/metástasis [178].

Consta de 4 cadenas polipeptídicas, 2 cadenas H idénticas de 449 aminoácidos cada una y 2 cadenas L idénticas de 214 aminoácidos cada una, unidas a través de una combinación de enlaces covalentes y no covalentes. Las cadenas de Abs contienen el dominio de unión funcional entre el Ab murino y el EGFR humano [179] [180].

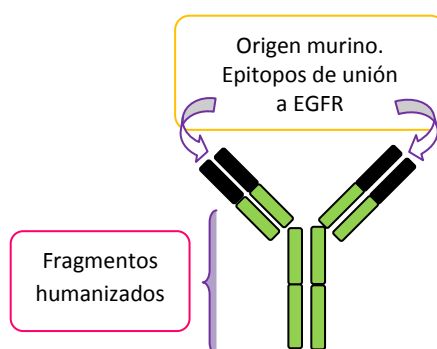


Figura 29. Estructura de cetuximab. Fuente: elaboración propia

La **forma farmacéutica** de CTX se corresponde con un concentrado incoloro para solución para perfusión. **Composición cualitativa y cuantitativa:** cada ml de solución para perfusión contiene 5 mg de CTX. Cada vial de 20 ml y 100 ml contienen 100 mg y 500 mg de CTX respectivamente. **Lista de excipientes:** cloruro de sodio; glicina polisorbato 80; ácido cítrico monohidrato; hidróxido de sodio y agua para preparaciones inyectables [178].

6.3.2. Procedimiento de obtención

La Comisión Europea emitió una autorización de comercialización válida en toda la UE para CTX el 29 de junio de 2004 [181].

Introducción

La proteína recombinante se produce en una línea celular de mieloma murino transfectada establemente.

CTX se produce por cultivo celular en biorreactores de tanque con capacidad para 10.000 o 12.000 litros que lo agitan continuamente, utilizando el modo por lotes. Todas las etapas del cultivo celular tras la descongelación del banco de células de trabajo se realizan en medios libres de suero. Durante la fabricación del principio activo (CTX) se incluye una etapa de mantenimiento, para obtener una mayor concentración del mismo. A continuación, tras el cultivo se procede a la etapa de purificación, donde los medios con células libres se concentran y se clasifican por diafiltración a 0,2 μm . Cada lote de la fermentación se corresponde con un lote de concentrado a granel. La etapa de purificación final es la diafiltración en el tampón de formulación. Esta solución se filtra estéril y se pueden almacenar 1 año entre 2-8°C. La preparación final del fármaco se lleva a cabo por dilución del concentrado a granel a 2 mg/ml en el tampón de formulación.

Construcción génica: el Ab quimérico es codificado a partir de los ADNc de la región variable del mAb murino M225 y los ADNc para las regiones constantes k humana y γ 1. Los ADNc se insertan en un vector de expresión que contiene cassettes de expresión separadas para la cadena L y la cadena H, respectivamente.

En los bancos de células se realiza una minuciosa caracterización genética que incluye pruebas separadas de las unidades de transcripción de la cadena H, así como de la cadena L, siendo considerada adecuada la medida del control para la fabricación de este producto recombinante dentro de las directrices dadas por la UE. Durante el proceso de producción son realizados tres ensayos de control: uno durante el proceso de monitoreo, otro durante el proceso de control de los parámetros y un último ensayo durante el proceso de especificaciones. El control durante la etapa de cultivo celular está relacionado con la viabilidad y la pureza obtenidas a partir de microorganismos [182].

6.3.3. *Mecanismo de acción*

EGFR (erbB1, HER1), uno de los cuatro miembros de la familia ErbB, es una glicoproteína transmembrana de 170 kDa que comprende un dominio extracelular de unión a ligando, un dominio transmembrana y un dominio intracelular de proteínas citoplasmáticas con actividad tirosina kinasa (TK). La unión a EGFR por sus ligandos naturales, principalmente factor de crecimiento epidérmico (EGF) y de crecimiento transformante (TGF- α), provoca la dimerización del receptor (ya sea con otro monómero EGFR o con otro miembro de la familia erbB), dando lugar a la activación de la TK intracelular [183] y provocando la fosforilación de la misma, lo cual pone en marcha una cascada de señales de transducción que afectan a la síntesis de ADN, al crecimiento celular y a mecanismos de apoptosis.

Las vías de señalización del EGFR están implicadas en el control de la supervivencia celular, la progresión del ciclo celular, la angiogénesis, la migración, la invasión o metástasis celular y la reducción de la capacidad de apoptosis. La desregulación de la vía del EGFR se produce en una gran variedad de formas, incluyendo la mutación genética, amplificación de genes, sobreexpresión de la proteína, reorganización estructural y la producción de ligando autocrino, y se ha implicado en la mayoría de los tumores epiteliales sólidos, incluyendo cáncer de pulmón, colon, mama, próstata, cerebro, cabeza y cuello, ovario y carcinoma renal.

Se han investigado diversas estrategias para la inhibición del EGFR, que se dividen en dos categorías principales:

- mAbs que interactúan con el dominio extracelular del receptor, como CTX.
- Pequeñas moléculas inhibitoras de la TK asociada al EGFR, como gefitinib [179] [184].

CTX se une al EGFR con una afinidad aproximadamente 5 a 10 veces superior a la de los ligandos endógenos, bloqueando la unión de estos al EGFR, lo que provoca la inhibición de la función del receptor. Sin embargo, CTX no se une a otros receptores de la familia HER [178].

Introducción

La unión CTX-EGFR provoca una activación reducida de la TK, de modo que se produce el bloqueo de una variedad de procesos regulados por las vías de señalización de EGFR en las células tumorales o del estroma, como las funciones celulares implicadas en el crecimiento y la metástasis tumoral, la proliferación celular, la supervivencia celular, la reparación del ADN, la angiogénesis tumoral, la motilidad celular y la invasión celular [178] [179] [182].

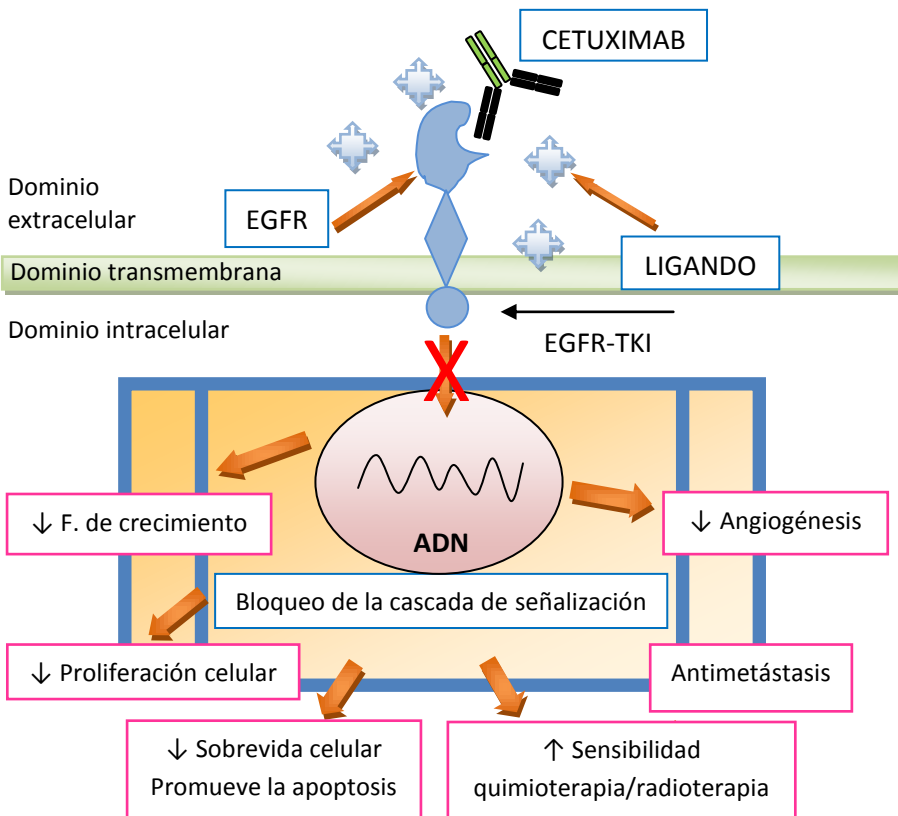


Figura 30. Mecanismo de acción de CTX. Fuente: elaboración propia. (Adaptada de cetuximab www.elsevier.es y quimioterapia en cáncer de esófago es.slideshare.net).

La actividad antitumoral de CTX ha sido atribuida a varios mecanismos distintos. Tanto CTX como M225, su progenitor murino, inhiben la progresión del ciclo celular en muchas líneas celulares, causando la

detención de las células en la fase G1 que se produce antes de la síntesis de ADN. Varios experimentos han demostrado que el tratamiento con Abs anti-EGFR provoca un aumento de la expresión del inhibidor del ciclo celular p27_{kip1}. Esto a su vez resulta en un aumento en la formación de complejos de inhibición p27_{kip1}-Cdk2 que impiden a las células salir de la fase G1 del ciclo celular. Efectos antiproliferativos similares se han observado *in vivo*, con el tratamiento con CTX [185]. Por otro mecanismo de acción, CTX induce la internalización del receptor dando lugar a un efecto de down-regulation que permite reducir el número de receptores disponibles y dirige a las células efectoras inmunitarias citotóxicas hacia las células tumorales que expresan EGFR (ADCC), limitando el progreso de la enfermedad [186].

6.3.4. Aplicaciones

El diseño de una terapia contra el cáncer empleando un inhibidor de la función de EGFR fue impulsado por hipótesis basadas en los conocimientos disponibles en la década de 1980. Estudios posteriores demostraron que el EGFR es un oncogén celular y que los niveles altos de éste están correlacionados con un peor pronóstico en tumores sólidos. Estudios preclínicos plantearon la hipótesis de que el bloqueo del EGFR en los sitios de unión con un mAb “antirreceptor” daría lugar a la inhibición del crecimiento celular, siendo por tanto, una terapia eficaz contra el cáncer [187] [188]. Así, y dado que la sobreexpresión o hiperactivación de EGFR da lugar a diferentes tipos de cánceres, CTX, debido a su mecanismo de acción es usado en el tratamiento de los mismos.

Se dispone de un gran volumen de datos preclínicos relativos a CTX en diversas líneas celulares y modelos tumorales *in vivo* que muestran los efectos antitumorales del fármaco administrado en monoterapia y sus efectos sinérgicos con quimioterapia y radioterapia sobre el crecimiento tumoral. Se ha demostrado que CTX inhibe el crecimiento de diversas líneas celulares cancerígenas humanas, incluidos colon, cabeza y cuello, vejiga, mama y riñón.

Introducción

La actividad *in vivo* es considerablemente superior a los efectos *in vitro*, lo que indica unos mecanismos antitumorales que no se limitan a la inhibición de la proliferación celular y la estimulación de la apoptosis. La marcada actividad de CTX en diversos modelos tumorales, especialmente en asociación con quimioterapia citotóxica o radioterapia, varía significativamente con el tiempo y con la administración simultánea de diversos agentes quimioterápicos comunes contra el cáncer [179]. De hecho, la actividad *in vitro* de varios agentes anticancerosos (p.ej: doxorrubicina, cisplatino, paclitaxel, docetaxel, gemcitabina) y la radioterapia se ha mejorado en una variedad de líneas celulares de cáncer humano cuando se combinan con CTX, potenciando este último los efectos citotóxicos de los agentes quimioterapéuticos y la radioterapia.

❖ *Indicaciones autorizadas*

1. Dadas sus propiedades, Erbitux[®] está indicado para el tratamiento de pacientes con **CCRm**, con expresión del EGFR, con gen RAS de tipo nativo (60 % de pacientes con CCRm aproximadamente).

- En combinación con quimioterapia basada en irinotecán.
- En primera línea en combinación con FOLFOX.
- En monoterapia en aquellos pacientes en los que haya fracasado el tratamiento con oxaliplatino e irinotecán y que no toleren irinotecán.

Actualmente en Europa la tasa de supervivencia global a los 5 años de pacientes con CCR para ambos sexos se sitúa en el 56,8 % [189]. El CCR es una de las causas más comunes de muerte por cáncer en el mundo occidental, ocupando el segundo lugar en Europa y tercero en los EE.UU. En España se diagnostican anualmente 19.000 nuevos casos de CCR y, si se consideran ambos sexos, ocupa el primer lugar en incidencia, representando la segunda causa de muerte por cáncer, con más de 9.000 muertes durante el año 2002 [186]. La supervivencia en nuestro país es ligeramente superior a la media europea y próxima o superior a la de los países más desarrollados, como Suiza, Francia o Alemania. En términos generales, la cirugía con o sin tratamiento adyuvante consigue curar a la

mitad de los pacientes afectados de CCR, desarrollando la otra mitad una recurrencia de la enfermedad, siendo necesario tratamiento paliativo [186]. Aproximadamente el 20 % de los casos son diagnosticados con enfermedad metastásica (estadio IV) siendo la esperanza de vida en esta fase de la enfermedad de 6 a 9 meses. La media global de supervivencia de pacientes con CCR avanzado ha aumentado de 12 meses a 18-21 meses desde la pasada década. Este incremento se ha basado fundamentalmente en la aparición de nuevos fármacos como irinotecán, oxaliplatino y fluoropirimidinas orales. Pero aún existen limitaciones con estos tratamientos [190] que son paliadas en cierto modo mediante el uso de agentes anti-EGFR como CTX, que ha demostrado beneficios clínicos en el tratamiento paliativo de CCRm resistente a la quimioterapia [191-193], aunque recientemente los datos de un creciente número de estudios sugieren que la respuesta a CTX parece limitarse a pacientes con CCRm portadores de tumores con KRAS no mutado, pero los resultados aun no son concluyentes [194-197]. Incluso en pacientes con tumores KRAS de tipo salvaje se observa variabilidad en la respuesta a CTX [198].

Son muchos los estudios que demuestran la eficacia de CTX en el tratamiento de CCR. Así, por ejemplo, M. J. Huertas Fernández *et al.* realizaron un estudio en España con objeto de evaluar la respuesta de 9 pacientes (22 % hombres con una media de edad de 48 años) a CTX en términos de tiempo hasta progresión y supervivencia global en pacientes con CCR que habían fracasado a un tratamiento anterior que incluyó irinotecán (77,77 % de los pacientes estudiados) y también a uno con oxaliplatino. La media de ciclos con CTX fue de 14 (rango 6-32). El principal efecto adverso fue la aparición de una erupción cutánea acneiforme presente en el 100 % de los casos. La media de tiempo hasta progresión fue 7 (rango 3-16) meses frente a los 4,1 meses estimados anteriormente con otros tratamientos y la supervivencia global 10,2 meses (rango 4-24) frente a los 8,6 meses anteriores. Con lo cual quedó demostrado el beneficio clínico que supone la inclusión de CTX en el tratamiento de CCR [199]. Existen múltiples autores que así lo demuestran como Siu-Fun Wong *et al.* (2005) [200]; Efat Azizi *et al* (2012) [188]; J.F. Marín Pozo *et al.* (2009) [201]; V.T. Grigorean *et al.* [202] entre otros.

Introducción

2. El *cáncer de células escamosas de cabeza y cuello* (CCECC) es el sexto cáncer más común en todo el mundo, y la incidencia mundial de este tipo de cáncer ha aumentado significativamente durante la última década. Más de 650.000 nuevos casos de cáncer de cabeza y cuello fueron diagnosticados durante el año 2012. Los principales factores de riesgo para esta enfermedad incluyen el tabaco y el uso y consumo de alcohol. Sin embargo, muchos pacientes con CCECC no tienen más factores de riesgo identificables que no sea una infección subclínica con el virus del papiloma humano (HPV-16). CCECC es dos veces más común en los hombres que en las mujeres, y aproximadamente un tercio de estos cánceres ocurren en pacientes menores de 55 años de edad. La modalidad de terapia combinada es generalmente recomendada para el 60 % de los pacientes que presentan esta enfermedad localmente avanzada. El tratamiento estándar es la quimiorradiación basada en cisplatino pero la mayoría de estos pacientes desarrollan recurrencias locales y/o regionales y el 20-30 % desarrolla metástasis. Por lo tanto, existe una necesidad real de nuevos agentes terapéuticos, altamente activos que se puedan administrar en combinación con modalidades de tratamiento existentes. Dentro de estos agentes terapéuticos se incluye CTX, indicado para el tratamiento de pacientes con CCECC:

- en combinación con radioterapia para la enfermedad localmente avanzada.
- en combinación con quimioterapia basada en platino, para la enfermedad recurrente y/o metastásica.

En pacientes con CCECC localmente avanzado, CTX se utiliza de forma concomitante con radioterapia. Se recomienda iniciar el tratamiento con CTX una semana antes de la radioterapia y continuar el tratamiento con CTX hasta el final del periodo de radioterapia. En pacientes con CCECC recurrente y/o metastásico, CTX se utiliza en combinación con quimioterapia basada en platino, seguido de CTX como tratamiento de mantenimiento, hasta la progresión de la enfermedad. La quimioterapia no debe administrarse hasta una hora después de la finalización de la perfusión de CTX [178].

Tal y como indican Eric Luedke *et al.*, la adición de CTX a la quimioterapia basada en platino en pacientes con CCECC recurrente no tratado o metastásico conduce a una mejora significativa en la supervivencia global (de 7,4 a 10,1 meses) y al aumento de la tasa de respuesta del 20 % al 36 % ($P < 0.001$). Además, la supervivencia global de los pacientes con CCECC regionalmente avanzado mejora de 29,3 a 49,0 meses con la adición de CTX a la radioterapia [203].

3. Se ha sugerido que el tratamiento con CTX podría inhibir el crecimiento de la línea celular de *adenocarcinoma de pulmón humano* y reducir la expresión de VEGF y de IL-8, que son los biomarcadores de la angiogénesis. Resultados con la combinación de CTX + endostatina sugieren que la endostatina puede aumentar la actividad antiangiogénica y antitumoral de CTX a través de un efecto aparente sobre la expresión de VEGF y, en menor grado, en la expresión de IL-8 [204]. En 2014 un grupo de investigadores halló que el agregado de CTX (un agente recién desarrollado) junto con el tratamiento estándar, prolongó el tiempo de supervivencia de los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) avanzado en alrededor de 1,5 meses y postergó la progresión del cáncer en alrededor de 0,5 meses. Un año después del tratamiento, el 45 % de los pacientes que recibieron tratamiento estándar más CTX y el 40 % de los pacientes que recibieron tratamiento estándar solo, todavía estaban vivos [205].

6.3.5. Consideraciones farmacológicas

Erbitux[®] debe administrarse bajo la supervisión de un médico con experiencia en el uso de medicamentos antineoplásicos. Se precisa monitorización estrecha durante la perfusión y durante 1 hora como mínimo después del final de la misma. Debe garantizarse la disponibilidad de equipos de reanimación. Antes de la primera perfusión se debe administrar al paciente un antihistamínico y un corticosteroide al menos 1 hora antes de la administración de CTX. Se recomienda esta medicación previa en todas las perfusiones posteriores. En todas las indicaciones, Erbitux[®] se administra una vez a la semana. La primera dosis es de 400 mg de CTX por m² de superficie corporal. Todas las dosis semanales

Introducción

posteriores son de 250 mg de CTX por m² cada una. Las perfusiones intravenosas de CTX administrado en monoterapia o en combinación con quimioterapia o radioterapia concomitante presentan una farmacocinética dosis-dependiente a dosis semanales de 5 a 500 mg/m² de superficie corporal. Cuando se administra CTX a una dosis inicial de 400 mg/m² de superficie corporal, el volumen de distribución medio es equivalente aproximadamente al espacio vascular (2,9 l/m² con un rango de 1,5 a 6,2 l/m²). El aclaramiento medio es de 0,022 l/h por m² de superficie corporal. La semivida de eliminación de CTX es prolongada, con unos valores que oscilan entre 70 y 100 horas a la dosis establecida, lo que permite administrar el fármaco de forma cómoda a pacientes ambulatorios una vez por semana. Las concentraciones séricas de CTX alcanzan niveles estables al cabo de tres semanas de monoterapia con CTX.

CTX no debe usarse para el tratamiento de pacientes con CCR cuyos tumores presenten mutaciones del gen RAS o en los que se desconozca el estado tumoral con respecto a dicho gen. Los resultados de los estudios clínicos muestran un equilibrio riesgo-beneficio negativo en los tumores con mutaciones del gen RAS. En particular, se observan efectos negativos sobre el tiempo de supervivencia libre de progresión (PFS) y el tiempo de supervivencia global (OS) en estos pacientes cuando CTX se administra concomitantemente con FOLFOX 4. También se notificaron hallazgos similares cuando CTX se administró junto a XELOX en combinación con BVZ (CAIRO2) [178] [206]. Por ello, antes de iniciar el tratamiento con Erbitux[®] es necesario comprobar que el gen RAS es de tipo nativo (KRAS y NRAS).

6.3.6. *Efectos adversos*

Entre los efectos secundarios clínicamente relevantes más comunes de CTX se encuentran:

- *Reacciones relacionadas con la perfusión*, incluyendo reacciones anafilácticas, con resultado de muerte en algunos casos. Algunas de estas reacciones pueden corresponder a un síndrome de liberación de citoquinas (CRS). Los síntomas como broncoespasmo, urticaria, aumento o

disminución de la tensión arterial, pérdida del conocimiento o shock pueden aparecer durante la primera perfusión y hasta varias horas después o en perfusiones posteriores. Las reacciones leves o moderadas relacionadas con la perfusión son muy frecuentes, incluyendo síntomas como fiebre, escalofríos, mareo o disnea, y presentan una relación temporal próxima sobre todo con la primera perfusión de CTX.

- *Trastornos respiratorios* Se han notificado casos de enfermedad intersticial pulmonar, siendo la mayoría de los pacientes de población japonesa.

- *Trastornos hepatobiliares*: aumento leve a moderado en los niveles de enzimas hepáticas (ASAT, ALAT, fosfatasa alcalina) [181].

- *Reacciones cutáneas*. Las principales reacciones adversas de CTX son reacciones cutáneas que afectan a un 80 % de los pacientes aproximadamente [181] y que pueden volverse graves, especialmente en combinación con quimioterapia. Aumenta el riesgo de infecciones secundarias (principalmente bacterianas) y se han notificado casos del síndrome de la piel escaldada por estafilococos, fascitis necrotizante y sepsis, que en algunos casos pueden producir la muerte.

- *Mucositis leve a moderada* (93 % de pacientes) [181].

- *Alteraciones electrolíticas*: hipomagnesemia grave (reversible después de interrumpir el tratamiento con CTX); hipopotasemia a consecuencia de la diarrea; hipocalcemia (aumentada cuando se utiliza en combinación con quimioterapia basada en platino).

- *Neutropenia y complicaciones infecciosas relacionadas* como neutropenia febril, neumonía o sepsis.

- *Trastornos cardiovasculares*: frecuencia aumentada de acontecimientos cardiovasculares graves y a veces mortales y de muertes surgidas a raíz del tratamiento en la terapia para el cáncer de pulmón no microcítico, el CCECC y el CCR.

Introducción

- *Trastornos oculares:* queratitis, inflamación ocular, lagrimeo, sensibilidad a la luz, visión borrosa, dolor ocular y/o enrojecimiento ocular.

6.4. TRASTUZUMAB



Nombre genérico: TRASTUZUMAB	Nombre comercial: HERCEPTIN®
Laboratorio: ROCHE	Grupo terapéutico: Agentes antineoplásicos. Anticuerpo monoclonal
Código ATC: L01XC03	Vía de administración: perfusión intravenosa
Tipo de dispensación: uso hospitalario	Vía de registro: centralizada

Figura 31. Herceptin®. Fuente: elaboración propia.

6.4.1. *Forma farmacéutica, composición y excipientes*

Trastuzumab (TTZ) (Herceptin®) es un mAb IgG1 *k* humanizado recombinante que actúa contra el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2), presente en grandes cantidades en la superficie de algunas células cancerosas de las cuales estimula su crecimiento y cuya sobre-expresión es observada en el 20-30 % de los cánceres de mama primarios [207].

Su peso molecular aproximado es de 148 kDa y contiene regiones estructurales humanas junto con las regiones determinantes de complementariedad de un Ab murino [208].

Dada la existencia de Herceptin® 150 mg polvo para concentrado para solución para perfusión intravenosa, Herceptin® 600 mg solución inyectable en vial y Herceptin® 600 mg solución inyectable en sistema de administración, en el presente trabajo de investigación siempre se hace referencia a la primera de las tres formulaciones nombradas.

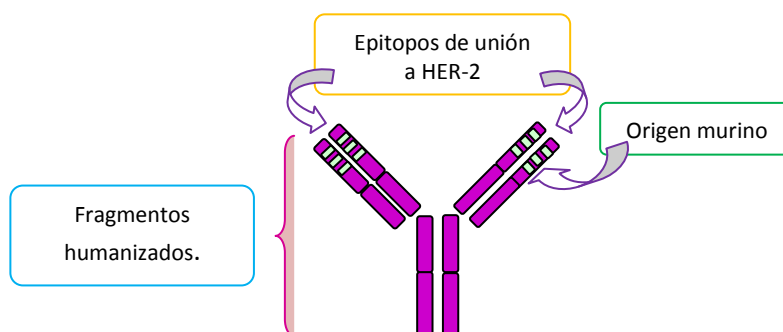


Figura 32. Estructura de trastuzumab. Fuente: elaboración propia.

La **forma farmacéutica** de TTZ se corresponde con un polvo liofilizado de color blanco a amarillo pálido para reconstituir con agua estéril. **Composición cualitativa y cuantitativa:** cada ml de solución para perfusión contiene 10 mg de TTZ. Cada vial de 15 ml contienen 150 mg de TTZ. La solución reconstituida de Herceptin® contiene 21 mg/ml de TTZ. Cada envase contiene un vial. **Lista de excipientes:** L-histidina hidrocloreuro; L-histidina; α,α -trehalosa dihidrato y polisorbato 20.

6.4.2. *Procedimiento de obtención*

TTZ es la variante humanizada del mAb murino 4D5 anti-HER-2 aislado por primera vez por Ullrich y sus colaboradores [209] que bloquea la activación de HER-2. Es diseñado mediante la inserción de la regiones determinantes de complemento del mAb murino en la estructura consenso de una IgG1 humana, es decir, la sustitución de todos los componentes murinos del Ab Mab4D5 excepto la región de unión del Ag [210].

Está producido por células de mamífero (ovario de hámster chino) (CHO) obtenidas mediante ingeniería genética. Para insertar la secuencia codificadora del ADN de TTZ en células CHO se utilizan técnicas recombinantes estandarizadas. Las células son cultivadas en suspensión en un medio nutriente que contiene el antibiótico gentamicina y secretan TTZ en el medio de cultivo. Se producen a gran escala para uso comercial

Introducción

y el Ab es sometido a un proceso de purificación extensiva del medio de cultivo de células CHO utilizando métodos cromatográficos (cromatografía de afinidad e intercambio iónico) incluyendo inactivación viral específica y procedimientos de filtración y eliminación. El antibiótico no es detectable en el producto final [208].

6.4.3. *Mecanismo de acción*

HER-2 también conocido como c-erbB-2 o p185 Her-2/neu, es una glicoproteína transmembrana de 185 kDa con actividad TK y producida por un gen específico con potencial cancerígeno cuando su expresión es demasiado alta. Así, la sobre-expresión de HER-2 está relacionada con distintos tipos de cáncer: mama, ovario, gástrico y de las glándulas salivares.

Herceptin[®] posee un mecanismo de acción único, ya que activa el sistema inmunitario del organismo y bloquea la vía de señalización de HER-2 para destruir de forma selectiva las células cancerosas [211].

Sin embargo, el mecanismo de acción de TTZ no está totalmente claro, apareciendo diferencias entre estudios *in vivo* en comparación con estudios *in vitro* [212].

Lo que sí se sabe con seguridad es que TTZ se une con una alta afinidad y especificidad al subdominio IV, una región yuxtamembrana del dominio extracelular de HER-2. La unión de TTZ a HER-2 inhibe la vía de señalización de HER-2 independiente del ligando y previene la división proteolítica de su dominio extracelular, un mecanismo de activación de HER-2.

Como resultado TTZ ha demostrado, tanto en ensayos *in vitro* como en animales, que inhibe la proliferación de células humanas tumorales que sobre-expresan HER-2, ya que la acción del fármaco sobre los tejidos sanos es mínima. Produce una interrupción del ciclo celular, incrementándose el número de células que se encuentran en la fase G₁ (fase postmitótica o presíntesis de DNA). *In vitro* se han observado

otra serie de cambios como disminución en la modulación del receptor HER-2, inhibición del crecimiento de células tumorales, reversión de la actividad TK y reducción de la expresión de los factores de crecimiento [213]. Además, TTZ es un potente mediador de la ADCC, en la que intervienen células NK, macrófagos y neutrófilos. Se ha demostrado *in vitro*, que la ADCC mediada por TTZ se ejerce preferentemente sobre células que sobre-expresan HER-2 si se compara con células cancerosas que no sobre-expresan HER-2 [207] [214-216].

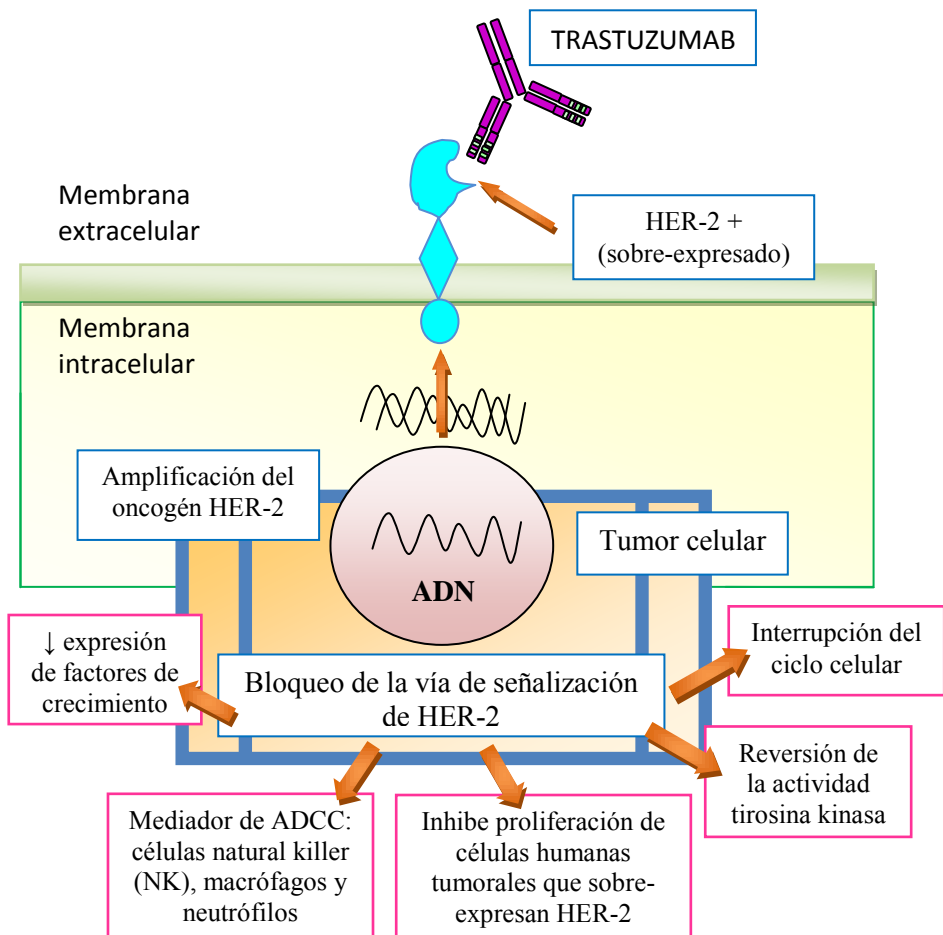


Figura 33. Mecanismo de acción de trastuzumab. Fuente: elaboración propia.

Introducción

6.4.4. Aplicaciones

El cáncer de mama es la neoplasia maligna más frecuente entre las mujeres en todo el mundo. Cada año se diagnostican aproximadamente 1,4 millones de nuevos casos de cáncer de mama y mueren más de 450.000 mujeres de esta enfermedad. Se estima que una de cada ocho a quince mujeres (según el área geográfica) podrá desarrollar la enfermedad a lo largo de su vida. En España se diagnostican cada año entre 15.000 a 20.000 nuevos casos y fallecen anualmente unas 7.000 mujeres por esta causa. Este tipo de cáncer se caracteriza por la presencia de cantidades elevadas de HER-2 en la superficie de las células tumorales. Se habla entonces de «positividad para HER-2», la cual se detecta en el 15-20 % de las mujeres con cáncer de mama. El cáncer HER-2-positivo (HER-2+) es una forma particularmente agresiva de cáncer de mama [213].

1. Dado su mecanismo de acción, en 1998 la FDA aprobó el uso de Herceptin[®] para el tratamiento de **cáncer de mama metastásico (CMM) con sobreexpresión de HER-2** ya que diversos ensayos preclínicos han demostrado que este mAb tiene actividad antitumoral solo en las células de cáncer de mama con sobreexpresión HER-2, pero no en aquellas células con bajos niveles del receptor [217].

Para dicho tratamiento de pacientes adultos, Herceptin[®] puede ser administrado:

- en monoterapia para el tratamiento de aquellos pacientes que hayan recibido al menos dos regímenes quimioterápicos para su enfermedad metastásica. La quimioterapia previa debe haber incluido al menos una antraciclina y un taxano a menos que estos tratamientos no estén indicados en los pacientes. Los pacientes con receptores hormonales positivos también deben haber fracasado al tratamiento hormonal a menos que éste no esté indicado.

- en combinación con paclitaxel para el tratamiento de aquellos pacientes que no hayan recibido quimioterapia para su enfermedad metastásica y en los cuales no esté indicado un tratamiento con antraciclinas.

- en combinación con docetaxel para el tratamiento de aquellos pacientes que no hayan recibido quimioterapia para su enfermedad metastásica.

- en combinación con un inhibidor de la aromatasa para el tratamiento de pacientes posmenopáusicas con CMM y receptor hormonal positivo, que no hayan sido previamente tratadas con TTZ [207].

2. Herceptin[®] también está indicado para el tratamiento de pacientes adultos con **cáncer de mama precoz (CMP) HER-2+**:

- después de cirugía, quimioterapia (adyuvante o neoadyuvante) y radioterapia (si procede).

- después de quimioterapia adyuvante con doxorubicina y ciclofosfamida, en combinación con paclitaxel o docetaxel.

- en combinación con quimioterapia adyuvante consistente en docetaxel y carboplatino.

- en combinación con quimioterapia neoadyuvante seguido de tratamiento en adyuvancia con Herceptin[®] para enfermedad localmente avanzada (incluyendo enfermedad inflamatoria) o tumores > 2 cm de diámetro.

Su eficacia en el tratamiento del cáncer de mama HER-2+ tanto precoz (temprano) como avanzado (metastásico) ha sido demostrada por múltiples ensayos. Administrado en monoterapia, en combinación con la quimioterapia habitual o después de ésta, Herceptin[®] mejora la supervivencia global, la tasa de respuesta y la supervivencia sin enfermedad, manteniendo a la vez la calidad de vida de las mujeres con cáncer de mama HER-2+ [211] [217] [218].

Recientemente se está empleando un conjugado de TTZ como tratamiento del cáncer de mama con sobreexpresión HER-2+, denominado TTZ Emtansina (TDM1) (Kadcyla[®], Genentech, Estados Unidos / Hoffman-Roche, Suiza). Se trata de un Ab conjugado entre TTZ y quimioterapia (DM1), es decir, la unión covalente entre TTZ y DM1, un citotóxico inhibidor de microtúbulo derivado de la maytansina, un macrólido que

Introducción

puede aislarse de las plantas del género *Maytenus*. Las propiedades farmacodinámicas del conjugado TDM1 se han comparado con TTZ no conjugado, encontrándose una afinidad por su ligando (HER-2) similar entre ambos. Por el contrario, se han descrito algunas diferencias en modelos *in vitro*, como son: una mayor ADCC y una mayor actividad antiproliferativa y citotóxica para el conjugado. En líneas celulares resistentes a tratamiento con TTZ (KPL-4, HCC1954, BT-474EEI), TDM1 también ha demostrado capacidad antiproliferativa.

Está indicado en monoterapia para el tratamiento de pacientes adultos con cáncer de mama HER-2+ localmente avanzado irresecable o metastásico, que han recibido previamente TTZ y un taxano por separado o en combinación. Los pacientes deben reunir los requisitos siguientes: (1) haber recibido tratamiento previo para la enfermedad localmente avanzada o metastásica, o (2) haber manifestado recurrencia de la enfermedad durante el tratamiento adyuvante o en los seis meses siguientes a su terminación.

La dosis recomendada de TDM1 es 3,6 mg/kg de peso corporal, administrada en perfusión i.v. cada tres semanas (ciclos de 21 días), manteniendo el tratamiento hasta progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable [219-221].

6.4.5. Consideraciones farmacológicas

Herceptin[®] debe manejarse cuidadosamente durante la reconstitución. Si se produce espuma excesiva durante la misma o se agita la solución reconstituida puede causar problemas con la cantidad de Herceptin[®] que se pueda extraer del vial. Se deben emplear métodos asépticos adecuados. Cada vial de Herceptin[®] se reconstituye con 7,2 ml de agua estéril para preparación inyectable. Esto produce una solución de 7,4 ml para dosis única que contiene 21 mg/ml de TTZ, a un pH de aproximadamente 6,0 [207].

Herceptin[®] responde a una cinética dosis dependiente, de forma que al aumentar la dosis se incrementaba el tiempo de vida media debido a una

disminución del aclaramiento. La vida media de eliminación oscila entre 1,7 y 12 días [213]. Los estudios farmacocinéticos preclínicos de TTZ han revelado una eliminación sérica lenta: $< 0,7$ ml/kg/hora. El tiempo de administración intravenosa oscila entre 30-90 minutos [211]. Se recomienda que el tratamiento con TTZ adyuvante tenga una duración de 1 año [222]. El metabolismo de TTZ es desconocido, posiblemente se dé en el sistema retículo-endotelial.

Una de las consideraciones farmacológicas a tener en cuenta es que uno de los principales problemas del tratamiento con Herceptin[®] es el alto índice de resistencia observado. Aproximadamente un 70 % de los pacientes tratados con Herceptin[®] son o se vuelven resistentes a este fármaco. Se están llevando a cabo múltiples estudios para averiguar cuál es el mecanismo implicado en la aparición de esta resistencia, pero aun no se conoce la causa exacta que lo produce [223]. Se han propuesto varios mecanismos de resistencia incluyendo (1) alteraciones en la interacción receptor-Ab, (2) activación de las vías down-stream por el aumento de la señalización de cualquier otro miembro de la familia HER u otros receptores, (3) activación de elementos down-stream, (4) mutaciones genéticas o (5) proteínas HER-2 truncadas. Por ello, y con objeto de eliminar o disminuir la resistencia, en los últimos años han sido desarrollados agentes terapéuticos que potencian los efectos de TTZ o de las células diana que se han hecho resistentes a TTZ, como la terapia basada en TTZ en combinación con otros agentes terapéuticos como lapatinib o neratinib que inhiben la actividad TK de HER-2; o pertuzumab que es un mAb que va dirigido contra otro epítipo diferente del dominio extracelular de HER-2; Ab conjugados como TDM1 o antibióticos antineoplásicos como los inhibidores de la proteína 90 de choque térmico (HSP90) como tanespimycin [224-226].

También ha de ser considerada la reciente identificación de 13 mutaciones somáticas HER-2 en los cánceres de mama que carecen de la amplificación de HER-2, de las cuales siete fueron mutaciones activas. En estudios *in vitro* de estas mutaciones, se descubrió la existencia de un mutante insensible a TTZ. El impacto de estas mutaciones sobre la eficacia clínica de antiterapias HER-2 aun no es muy bien conocido, por

Introducción

lo que se requieren más estudios para determinar la importancia de estas mutaciones en la progresión durante la terapia de TTZ [227].

6.4.6. *Efectos adversos*

Al igual que todos los medicamentos, TTZ puede tener efectos adversos, aunque no todas las personas los sufran. TTZ es generalmente bien tolerado por la mayoría de los pacientes aunque algunos de estos efectos adversos pueden ser graves y requerir hospitalización.

Durante la administración de una perfusión de TTZ pueden darse escalofríos, fiebre y otros síntomas similares a la gripe. Esto es muy frecuente (más de 10 pacientes de cada 100) y aparece principalmente en la primera perfusión y son transitorios. Otros síntomas relacionados con la perfusión son: sensación de malestar (náuseas), vómitos, dolor, aumento de la tensión muscular y agitación, dolor de cabeza, mareos, dificultad respiratoria, respiración sibilante (pitos), disminución o aumento de la tensión sanguínea, alteraciones del ritmo cardíaco (palpitaciones, arritmias o latido cardíaco irregular), anafilaxia, hinchazón de la cara y labios, enrojecimiento y sensación de cansancio. Estos síntomas pueden ser graves y algunos pacientes han fallecido (0,25 % de los pacientes) [208] [218].

Otros efectos adversos pueden presentarse en cualquier momento durante el tratamiento con TTZ y no sólo relacionados con la perfusión. A veces se pueden dar problemas cardíacos que pueden ser graves. Estos efectos incluyen debilitamiento del músculo cardíaco que posiblemente pueda provocar insuficiencia cardíaca: disfunción cardíaca sintomática o asintomática en el 27 % de los pacientes que reciben una antraciclina y ciclofosfamida en combinación con TTZ, por lo que no se recomienda la terapia de combinación con antraciclinas; disfunción cardíaca sintomática o asintomática en el 13 % de los pacientes que reciben TTZ más paclitaxel y en el 4,7 % de los pacientes que reciben TTZ solo, así como pericarditis y alteración del ritmo cardíaco.

Otros efectos adversos muy frecuentes de TTZ (más del 10 % de pacientes) son: diarrea, debilidad, enrojecimiento de la piel, dolor torácico, dolor abdominal, dolor de articulaciones y dolor muscular.

Otros efectos adversos frecuentes (menos del 10 % de los pacientes) son: reacciones alérgicas, número anormal de células sanguíneas (anemia, disminución de plaquetas y disminución de glóbulos blancos), hematotoxicidad (en particular neutropenia), estreñimiento, molestias gástricas (dispepsia), infecciones, incluyendo infecciones de vejiga y en la piel, herpes, inflamación del pecho, acontecimientos adversos pulmonares, inflamación del páncreas o del hígado, alteración del riñón, aumento del tono/tensión muscular (hipertonía), temblores, entumecimiento u hormigueo en los dedos de la mano y pies, alteración de las uñas, pérdida de pelo, dificultad para conciliar el sueño (insomnio), sensación de sueño (somnia), hemorragias nasales, acné, picores, sequedad de boca y de la piel, sequedad de ojos o lagrimeo, sudor, sentimiento de debilidad y molestias, ansiedad, depresión, alteraciones del pensamiento, mareos, pérdida de apetito, pérdida de peso, alteración del gusto, asma, alteración pulmonar, dolor de espalda, dolor de cuello, dolor de huesos, calambres en las piernas, hemorroides, hematomas y artritis [207] [208].

Introducción

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Iáñez Pareja E. Biotecnología. Instituto de Biotecnología Universidad de Granada. <http://www.ugr.es>
- [2] <http://www.shireargentina.com.ar/shire-argentina/biotecnologia.aspx>.
- [3] Torres H. Biotecnología. Producción editorial a cargo de la Dirección General de Investigación y Desarrollo.
- [4] Tejerina T. y Medina, U. Actualidad en torno al medicamento. Fármacos Biotecnológicos, Biosimilares, Bioequivalentes. *Actualidad en Farmacología y Terapéutica. Diciembre 2012 | volumen 10 nº4 | 233 -238.*
- [5] Dra. Franco Fraguas, M.L. y Prof. Dr. Savio Quevedo E. Medicamentos biotecnológicos. Conceptos básicos y relevancia en el contexto clínico. *Tendencias en Medicina. Octubre 2008 • pág. 5-12.*
- [6] Biotecnológicos y biosimilares en farmacia hospitalaria. Facultad Farmacia, Universidad de Sevilla. Prácticas tuteladas.
- [7] Real Decreto 1345/2007 Jefatura de Estado BOE nº 275 de 7/11/2007
- [8] Iglesias-Osma M.C. *et al.* Desarrollo y Regulación de Medicamentos Biotecnológicos. Actualidad en torno al Medicamento. *Actualidad en Farmacología y Terapéutica. Diciembre 2013| volumen 11 nº4 | 223 -228.*
- [9] Informe INESME (Instituto de Estudios Médico Científicos). Equivalencias terapéuticas de los medicamentos biotecnológicos. Madrid, enero 2009. ISSN: 1889-0512.
- [10] Biofármacos: Biotecnología al servicio de la salud <http://www.explora.cl/descubre/articulos-de-ciencia/tecnologia-articulos/biotecnologia-articulos/1704-biofarmacos-biotecnologia-al-servicio-de-la-salud>.
- [11] Asociación Española de Bioempresas (ASEBIO). Medicamentos biológicos. www.asebio.com
- [12] Portalfarma2015.5.5.84283.pdf. Medicamentos biológicos y biosimilares. 2015.

- [13] Guideline on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins.
- [14] Boven K. *et al.* The increased incidence of pure red cell aplasia with an Eprex formulation in uncoated rubber stopper syringes. *Kidney Int* 2005; 67: 2346-53.
- [15] International Federation of Pharmaceutical Manufacturers & Associations (IFPMA). Medicamentos bioterapéuticos. Comprendiendo la nueva generación de tratamientos. 2012.
- [16] Wendy S. Putnam *et al.* Review: Pharmacokinetic, pharmacodynamic and immunogenicity comparability assessment strategies for monoclonal antibodies. *Trends in Biotechnology*. 2010 No.10 (28) 509–516.
- [17] La Medicina de hoy, los Anticuerpos Monoclonales. 19 marzo 2014 <http://www.regiondigital.com/blogs/40-el-blog-de-angel-chimenea/802-la-medicina-de-hoy-los-anticuerpos-monoclonales.html>.
- [18] European Medicines Agency.Guideline on Similar Biological Medicinal Products.Ref. CHMP/437/04. London, 30 October 2005.
- [19] Giezen T.J. *et al.* Safety-related regulatory actions for biologicals approved in the United States and the European Union. *JAMA* 2008; 300 (16): 1887-96.
- [20] Timón M. y Ruiz S., Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Medicamentos biotecnológicos. Bases regulatorias de los medicamentos de origen biotecnológico. *Economía de la Salud, Volumen 6 I Número 6*.
- [21] Ruiz S., Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Evaluación de medicamentos biotecnológicos en la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), BWP (Grupo de Biológicos) y CHMP (Comité de Medicamentos de Uso Humano). 9ª edición del curso de Biotecnología Aplicada a la Salud Humana.
- [22] EMA. Reglamento (CE) nº 726/2004: procedimientos de la UE para la autorización y el control de los medicamentos de uso humano y veterinario y por el que se crea la Agencia Europea de Medicamentos.
- [23] Farmaindustria. Análisis de la Evolución del Gasto Farmacéutico Público en España (2014).
- [24] Dimasi J.A., Grabowski, HG. “The cost of biopharmaceuticak R&D: Is biotech different? “. *Managerial and session economics* 28 (2007) 469-479.

Introducción

[25] DiMasi. Paquette, *Pharmacoeconomics* 2004; 22 (Suppl 2):1-14.

[26] Asociación Española de Bioempresas (ASEBIO) Informe Anual ASEBIO 2014. El 9% del PIB español depende ya de la biotecnología.16.07.2015. <http://www.quimica.es/noticias/153688/> © CHEMIE.DE Information Service GmbH.

[27] Farmaindustria. Presidenta de Farmaindustria. XIV Encuentro de la industria farmacéutica española UIMP “Los nuevos medicamentos biológicos: revolución terapéutica y económica” Santander, y 5 de septiembre 201 .

[28] Cantarero-Prieto D. Los medicamentos biológicos en la investigación económica. Encuentro: “Los nuevos medicamentos biológicos: revolución terapéutica y económica”. Universidad Internacional Menéndez Pelayo. Santander 4 y 5 septiembre 2014.

[29] D. Toledo A., Presidente de la Alianza General de Pacientes (AGP). Asociación Española de Bioempresas (ASEBIO). Medicamentos biológicos.

[30] Betolaza San Miguel, J.I. Fundació Ernest Lluch. Alternativas para abordar de forma racional la financiación de tratamientos oncológicos y hepatitis c. Universidad Internacional Menéndez Pelayo. Santander, 3 de julio de 2015.

[31] P.P.G. Zaragoza. Los medicamentos biológicos, obras de ingeniería genética de precios desorbitados. 07.04.2014.

http://www.heraldo.es/noticias/suplementos/salud/2014/04/07/los_medicamentos_biológicos_obras_ingeniería_genética_precios_desorbitados_280406_1381024.html.

[32] Moreno-Ramírez. Uso racional (eficiente) de biológicos y terapia intermitente en psoriasis. *Actas Dermosifiliogr.* 2011; 102(4):241-243.

[33] MSD. Expertos abogan por implementar medidas orientadas a garantizar el proceso de farmacovigilancia en los tratamientos biológicos. 28.03.2015. <http://sanidad.puntex.es/2015/03/expertos-abogan-por-implementar-medidas-orientadas-a-garantizar-el-proceso-de-farmacovigilancia-en-los-tratamientos-biologicos/>

[34] Salvador Algarra E. Tesis Doctoral: Repercusión, en el ámbito de la Comunidad Valenciana, de los medicamentos biológicos y biosimilares. Universitat de València. Facultat de Medicina i Odontologia. Departament Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal. Valencia. Abril 2015.

[35] Genoma Humano España. Informe 2011 sobre relevancia biotecnología en España.

[36] Emilio de Benito. Los fármacos biológicos son más del 40% de la factura hospitalaria. 28.01.2015.

http://politica.elpais.com/politica/2015/01/28/actualidad/1422469374_438958.html

[37] Ali ElBakri *et al.* TFM: The state of antibody therapy September 2010 *Human Immunology* 71 (2010) 1243–1250.

[38] Genoma España y Fundación General de la Universidad Autónoma de Madrid (FUAM). Anticuerpos monoclonales terapéuticos. Informe de Vigilancia Tecnológica. Diciembre 2007.

[39] Patricia Machado N. *et al.* Artículo de revisión. Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas. *Infectio* 2006; 10(3): 186-197.

[40] Weiner L.M. *et al.* Monoclonal antibodies: Versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 2010, 10, 317–327.

[41] Boticario Boticario C. y Cascales Angosto M. Sistema inmune: su importancia en el desarrollo y terapia del cáncer. UNED. Centro de Plasencia 2013.

[42] “International Nonproprietary Names (INN) for biological and biotechnological substances (a review)”.

<http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>

[43] Iñesta A. Anticuerpos Monoclonales, una aproximación. 2 Blog Web2.0 y Salud. 24.06.2015. <http://fecoainesta.blogspot.com.es/>

[44] Tema 19. Anticuerpos Monoclonales y Policlonales. Producción y Purificación. Aplicaciones.

[45] Juan C., Aguillón G. *et al.* Artículo de Revisión. Nuevas armas inmunológicas para la medicina del siglo XXI: Terapia biológica basada en el uso de anticuerpos monoclonales de última generación. *Rev. méd. Chile v.131 n.12 Santiago dic. 2003.*

[46] Jones P.T. *et al.* Replacing the complementarity determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 1986; 321:522–5.

[47] Riechmann L. *et al.* Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 1988; 332:323–7.

Introducción

[48] Siegel D.L. Recombinant monoclonal antibody technology. *Transfus Clin Biol* 2002; 9:15–22.

[49] Clackson T. *et al.* Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 1991; 352:624–8.

[50] Green L.L. Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: Xeno-Mouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 1999; 231:11–23.

[51] Lonberg N. Human monoclonal antibodies from transgenic mice. *Handb Exp Pharmacol* 2008:69–97.

[52] Kellermann S.A., Green LL. Antibody discovery: The use of transgenic mice to generate human monoclonal antibodies for therapeutics. *Curr Opin Biotechnol* 2002; 13:593–7.

[53] Albrecht H. *et al.* Fundamentals of antibody-related therapy and diagnostics. *Drugs Today (Barc)* 2009; 45:199–211.

[54] Bielekova B., Becker B.L. Monoclonal antibodies in MS: Mechanisms of action. *Neurology* 2010; 74(Suppl 1):S31–40.

[55] Dra. Paola Toche P. Bases de la medicina clínica. Unidad 9: inmunología. Tema 9.6: terapia en inmunología. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

[56] Grattendick K.J. *et al.* Effects of three anti-TNF- α drugs: Etanercept, infliximab and pirfenidone on release of TNF- α in medium and TNF- α associated with the cell *in vitro*. *International Immunopharmacology* (2008) 8, 679–687. 2008.

[57] Genoma España. Anticuerpos monoclonales bterapeuticos. Informe de vigilancia tecnológica.

[58] BiotechSpain. El mercado de los anticuerpos terapéuticos URL: https://biotechspain.com/es/tema.cfm?iid=market_therapeutic_antibodies 11/07/2013.

[59] ICH official website.

[60] Diseño de estudios de estabilidad.

file:///C:/Users/usuario/Downloads/ESTABILIDAD%20%20PR%C3%81CTICA.pdf

- [61] Dr. Drury Atencio. Estabilidad de los medicamentos. Radio Universidad: la salud y los medicamentos. 24 octubre de 2013.
- [62] ICH Q5C Quality of Biotechnological Products: Stability testing of Biotechnological/Biological products
- [63] ICH Q1E. Evaluation for stability data.
- [64] ICH Q1B Stability testing: photostability testing of new drug substances and products.
- [65] Química Analítica Instrumental II. Técnicas Cromatográficas. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Diciembre de 2007.
- [66] Wang J. *et al.* Investigation of multivalent interactions between conjugate of quantum dots with c-Myc peptide tag and the anti-c-Myc antibody by capillary electrophoresis with fluorescence detection. *J Sep Sci.* 39 (23), 4653-4659. 2016 Oct 31.
- [67] Suba D. *et al.* Method development and qualification of capillary zone electrophoresis for investigation of therapeutic monoclonal antibody quality. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2016 Oct 1; 1032: 224-9.
- [68] Gerster A. *et al.* A simple method to determine IgG light chain to heavy chain polypeptide ratios expressed by CHO cells. *Biotechnol Lett.* 2016 Dec; 38(12):2043-2049. Epub 2016 Sep 9.
- [69] Wang X. *et al.* Data on the inhibition of RNase inhibitor activity by a monoclonal antibody as assessed by microfluidics-based RNA electrophoresis. *Data Brief.* 2016 Sep 15; 9: 417-421.
- [70] Váradi C. *et al.* Quantitative twoplex glycan analysis using 12C6 and 13C6 stable isotope 2-aminobenzoic acid labelling and capillary electrophoresis mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2016 Dec.; 408 (30): 8691-8700.
- [71] Rustandi R.R. *et al.* Applications of an Automated and Quantitative CE-Based Size and Charge Western Blot for Therapeutic Proteins and Vaccines. *Methods Mol Biol.* 2016;1466:197-217.
- [72] Biacchi M. *et al.* Glycoform Separation and Characterization of Cetuximab Variants by Middle-up Off-Line Capillary Zone Electrophoresis-UV/Electrospray Ionization-MS. *Anal Chem.* 2015 Jun 16;87(12):6240-50.

Introducción

[73] Jayo R.G. *et al.* Simple capillary electrophoresis-mass spectrometry method for complex glycan analysis using a flow-through microvial interface. *Anal Chem.* 2014 Jul 1;86(13):6479-86.

[74] Zhao S.S. and Chen DD. Applications of capillary electrophoresis in characterizing recombinant protein therapeutics. *Electrophoresis.* 2014 Jan; 35(1):96-108.

[75] Mayolo-Deloisa K. *et al.* Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química. Vol. 11, No.3 (2012) 415-429.*

[76] SKOOG/LEARY. *Análisis Instrumental.* 4ª Edición. McGraw-Hill.

[77] SKOOG/WEST/HOLLER. *Química Analítica.* 6ª Edición. McGraw-Hill.

[78] Durán Verdasco E. Métodos Analíticos para la monitorización terapéutica de fármacos. IX Congreso Nacional del Laboratorio Clínico. Madrid 7-9 octubre 2015.

[79] Yuan X. *et al.* Biochemical Characteristics of Three Laccase Isoforms from the Basidiomycete *Pleurotus nebrodensis*. *Molecules.* 2016 Feb 6; 21(2).

[80] Isakari Y. *et al.* Monolith disk chromatography separates PEGylated protein positional isoforms within minutes at low pressure. *Biotechnol J.* 2016 Jan; 11(1):100-6.

[81] Fekete S. *et al.* Characterization of cation exchanger stationary phases applied for the separations of therapeutic monoclonal antibodies. *J Pharm Biomed Anal.* 2015; 111:169-76.

[82] Viski K. *et al.* Parallel development of chromatographic and mass-spectrometric methods for quantitative analysis of glycation on an IgG1 monoclonal antibody. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2016 Oct 1; 1032:198-204.

[83] <http://documents.mx/documents/tecnicas-analiticas-proteinas.html>

[84] Zhang Q. *et al.* Recent applications of hydrophilic interaction liquid chromatography in pharmaceutical analysis. *J Sep Sci.* 2017 Jan; 40 (1): 49-80.

[85] Rainville P.D. *et al.* A method for the direct injection and analysis of small volume human blood spots and plasma extracts containing high concentrations of organic solvents using reversed-phase 2D UPLC/MS. *Analyst.* 2015 Mar 21; 140(6):1921-31.

[86] Todoroki K. Development of HPLC analysis methods for therapeutic monoclonal antibodies. *Yakugaku Zasshi*. 2015; 135(2):213-8.

[87] Fekete S. *et al.* Evaluation of a new wide-pore superficially porous material with carbon core and nanodiamond-polymer shell for the separation of proteins. *J Chromatogr A*. 2015 Oct 2; 1414:51-9.

[88] Martínez-Ortega A. *et al.* Study and ICH validation of a reverse-phase liquid chromatographic method for the quantification of the intact monoclonal antibody cetuximab. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. Volume 6, Issue 2, April 2016, Pages 117–124.

[89] Navas N. *et al.* Quantification of an intact monoclonal antibody, rituximab, by (RP)HPLC/DAD in compliance with ICH guidelines. *Anal Bioanal Chem*. 2013 Nov;405(29):9351-63.

[90] Chelius D. *et al.* Identification and characterization of deamidation sites in the conserved regions of human immunoglobulin gamma antibodies. *Anal Chem* (2005) 77:6004–6011.

[91] Yang J. *et al.* Determination of tryptophan oxidation of monoclonal antibody by reversed phase high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* (2007) 1156:174–182.

[92] Tsybin Y.O. *et al.* Structural analysis of intact monoclonal antibodies by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Anal Chem* (2011) 83:8919-8927.

[93] Ishii Y. *et al.* A rapid method for simultaneous evaluation of free light chain content and aggregate content in culture media of Chinese hamster ovary cells expressing monoclonal antibodies for cell line screening. *J Biosci Bioeng*. 2016 Apr; 121(4):464-70.

[94] Huang J.Z. *et al.* Exploitation of the size-exclusion effect of reversed-phase high performance liquid chromatography for the direct analysis of diethylene triamine pentaacetic acid in therapeutic monoclonal antibody formulations. *J Chromatogr A*. 2016 Jul 15; 1455:140-6.

[95] Oliva A. *et al.* Pre-study and in-study validation of a size-exclusion chromatography method with different detection modes for the analysis of monoclonal antibody aggregates. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2016 Jun 1; 1022:206-12.

Introducción

[96] Li Y. *et al.* A size exclusion-reversed phase two dimensional-liquid chromatography methodology for stability and small molecule related species in antibody drug conjugates. *J Chromatogr A*. 2015 May 8; 1393:81-8.

[97] Hernández-Jiménez J. *et al.* The Effects of Light-Accelerated Degradation on the Aggregation of Marketed Therapeutic Monoclonal Antibodies Evaluated by Size-Exclusion Chromatography With Diode Array Detection. *J Pharm Sci*. 2016 Apr;105(4):1405-18.

[98] Millán Martín S. *et al.* Comparative analysis of monoclonal antibody N-glycosylation using stable isotope labelling and UPLC-fluorescence-MS. *Analyst*. 2015 Mar 7;140(5):1442-7.

[99] Hongwei Xie *et al.* Rapid comparison of a candidate biosimilar to an innovator monoclonal antibody with advanced liquid chromatography and mass spectrometry technologies. *mAbs* 2:4, 379-394; July/August 2010.

[100] Alain Beck *et al.* Review: Characterization of Therapeutic Antibodies and Related Products. *Anal. Chem.*, 2013, 85 (2), pp 715–736.

[101] Alain Beck *et al.* Analytical characterization of biosimilar antibodies and Fc-fusion proteins. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 48, 2013.

[102] Houde D. *et al.* Rapid characterization of IgG1 conformation and conformational dynamics by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Anal Chem*. 2009 Apr 1; 81(7): 2644–2651.

[103] Zhang A. *et al.* Understanding the Conformational Impact of Chemical Modifications on Monoclonal Antibodies with Diverse Sequence Variation Using Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry and Structural Modeling. *Anal. Chem.*, 2014, 86 (7), pp 3468–3475.

[104] The Immunoassay Handbook. Second Edition. Edited by David Wild.

[105] Wikipedia: <https://es.wikipedia.org/wiki/inmunoensayo>.

[106] Hernández Calleja A.. NTP 611: Agentes biológicos: análisis de las muestras. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, España. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.

[107] Wang Y. *et al.* Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody *in vitro*. *Angiogenesis* 7 (2004) 335-345.

[108] Wentink M.Q. *et al.* Targeted vaccination against the bevacizumab binding site on VEGF using 3D-structured peptides elicits efficient antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Nov 1; 113(44):12532-12537.

[109] Heo S.M. *et al.* Levels of common salivary protein 1 in healthy subjects and periodontal patients. *J Periodontal Implant Sci.* 2016 Oct; 46(5):320-328.

[110] Yung S. *et al.* Binding of Anti-dsDNA Antibodies to Proximal Tubular Epithelial Cells Contribute s to Renal Tubulo-interstitial Inflammation. *Clin Sci (Lond).* 2017 Jan 1; 131 (1): 49-67.

[111] Li Y. *et al.* Biological function analysis of monoclonal antibodies against human granulins *in vitro* using U251 cells as a model. *Protein Expr Purif.* 2017 Feb;130:55-62.

[112] Yamashita J. *et al.* Sandwich ELISA Using a Mouse/Human Chimeric CSLEX-1 Antibody. *Clin Chem.* 2016 Nov;62(11):1516-1523. *Epub* 2016 Sep 2.

[113] Wehling C. *et al.* Monitoring of complement activation biomarkers and eculizumab in complement-mediated renal disorders. *Clin Exp Immunol.* 2017 Feb; 187 (2):304-315.

[114] Jutathis K. *et al.* An Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Genistein 7-O- $[\alpha$ -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -glucopyranoside Determination in *Derris scandens* using a Polyclonal Antibody. *Phytochem Anal.* 2016 Nov;27(6):336-342.

[115] Cultek. Soluciones ELISA Protocolo y Técnicas. *www.cultek.com.* 02.2006.

[116] Coello D. *et al.* Técnica ELISA (Enzyme Linked inmunoabsorvent assay) Método de Elisa y Microelisa. Escuela Superior Politecnica del Litoral Definiciones Médicas.com. <http://www.slideshare.net/dicoello/metodo-de-elisa-y-microelisa>.

[117] Regueiro González J.R. *et al.* Inmunología. Biología y patología del sistema inmune. 3ª Edición Revisada. Editorial médica panamericana. ISBN: 84-7903-707-5. Octubre 2002.

[118] Lansing M. Prescott *et al.* Microbiología. 4ª Edición. McGraw-Hill-Interamericana. ISBN: 0-697-35439-3 (Edición original).

[119] García-Campaña A.M. *et al.* Unfamiliar though exciting analytical detection in flowing streams: chemiluminescence. *Ars Pharmaceutica; Vol 42, N° 1-2 (2001).*

Introducción

[120] Menéndez Alonso E. Estado del arte en la monitorización de fármacos. Hospital Universitario 12 de Octubre. Salud, Madrid. 17.03.2010. Comunidad de Madrid, España.

[121] Barrera Ramírez L.M. *et al.* Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. Vol. 17(1):42-55 México mar. 2004.

[122] Hans-Peter Brezinschek *et al.* B lymphocyte-typing for prediction of clinical response to rituximab. *Arthritis Res Ther*. 2012; 14(4): R161.

[123] Unidad de Citometría. Instituto d Investigación en Ciencias de la Salud Germans Trias i Pujol. Fundamentos. Citometria.Germanstrias.org

[124] Abbott División Diagnóstico. Global Marketing: Inmunoquímica. Introducción a los inmunoensayos. Immunochemistry Diagnostics.

[125] Mayela López M. *et al.* ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) Prueba Inmunoadsorbente Ligada a Enzimas. *hsjd08.files.wordpress.com/2008/05/elisa.ppt*.

[126] Calderón Pascacio R.V. Curso de Métodos Fisicoquímicos en Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biotecnología. Cuernavaca, Morelos, Junio 2007.

[127] Medicina molecular de FIBAO. Tecnicas ELISA. Portal Medicina molecular (medmol.es) de FIBAO. 5.10.2007.

[128] Prof. Dr. Rolando Felipe Ochoa Azze C. Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos. 1ª Edición. *Finlay ediciones*. La Habana, 2012. ISBN: 978-959-7076-47-6.

[129] Lardoeyt Ferrer R. Aplicación y fundamentación de los inmunoensayos enzimáticos en las ciencias biomédicas. *Indexmedico Journal-9ª edición*.

[130] Hsu SM. *et al.* Use of Avidin- Biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and labeled antibody (PAP) procedures. *Journal Histochem Cytochem* 1981; 29:577-80.

[131] Mason D.Y. Immunocytochemical labeling of monoclonal antibodies by the APAAP immunoalkaline phosphatase techniques in Immunocytochemistry. *London: Academic Press, 1985:25-40*.

[132] Pérez Pérez J.M. *et al.* Técnica de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). www.scribd.com/.../15834994-Tecnica-de-ELISA-Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay. 2009.

[133] Soria Aledo A. Tesis doctoral: Estudios de polimorfismos genéticos tnfr-alfa (238 y 308), il-10 (1082) mthfr (677) y del das-28, como predictores de la respuesta al tratamiento con infliximab, en la artritis reumática. Departament de Farmàcia i Tecnologia farmacèutica. Universitat de València. Servei de Publicacions 2009.

[134] Lard L.R. *et al.* Early versus delayed treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis: comparison of two cohorts who received different treatment strategies. *Am J Med* 2001; 111(6):446-51.

[135] Bernie Scallon *et al.* Binding and Functional Comparisons of Two Types of Tumor Necrosis Factor Antagonists January 9, 2002. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* Vol. 301, No. 2.

[136] Agencia Europea de Medicamentos (EMA). Ficha técnica de Remicade® (Infliximab). <http://www.ema.europa.eu>

[137] Knight D.M. *et al.* Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Mol Immunol.* 1993; 30:1443-1453.

[138] Doty J.D. *et al.* Treatment of sarcoidosis with infliximab. *Chest.* 2005 Mar; 127(3):1064-71.

[139] Hostettler K.E. *et al.* Long-term treatment with infliximab in patients with sarcoidosis. *Respiration.* 2012; 83(3):218-24.

[140] Lorentzen A.O. *et al.* Overnight response to infliximab in neurosarcoidosis: a case report and review of infliximab treatment practice. *Clin Neuropharmacol.* 2014 Sep-Oct; 37(5):142-8.

[141] Vorselaars A.D. *et al.* Effectiveness of Infliximab in Refractory FDG PET-Positive Sarcoidosis. *Eur Respir J.* 2015; 46: 175-185.

[142] Guillermo Merino *et al.* Eficacia del infliximab en pacientes con síndrome de Behçet portadores de úveo-retinitis grave. *Rev Méd Chile* 2006; 134: 875-882.

[143] Okada A.A. *et al.* Multicenter study of infliximab for refractory uveoretinitis in Behçet disease. *Arch Ophthalmol.* 2012 May; 130(5):592-8.

Introducción

[144] Adler S. *et al.* Behçet's disease: successful treatment with infliximab in 7 patients with severe vascular manifestations. A retrospective analysis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2012 Apr; 64(4):607-11.

[145] Nakamura A. *et al.* Successful Discontinuation of Infliximab in a Refractory Case of Vasculo-Behçet Disease. *Case Reports in Rheumatology*. 2016; Volume 2016 Article ID 1467583.

[146] Aringer M. *et al.* Effects of short-term infliximab therapy on autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2007; 56:274–279.

[147] Blanco R. *et al.* Monografía Infliximab. *Rev Esp Reumatol* 2002.

[148] Schering-Plough Div. ONCOLOGÍA REMICADE* Infliximab Liofilizado para Solución Inyectable 100 mg. Para administración intravenosa. *Folleto de informacion al profesional*. Marzo 25, 2004, Revisión Oct. 1 – Nov. 3.

[149] Miehsler W. *et al.* Review article. A decade of infliximab: The Austrian evidence based consensus on the safe use of infliximab in inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis* (2010) 4, 221–256 (2009).

[150] Escuela Andaluza de Salud Publica Anticuerpos monoclonales en el tratamiento de la enfermedad de Crohn: Infliximab. *Boletín Terapéutico Andaluz (BTA) Redacción: CADIME*. Año 2001, Volumen 17 n° 3.

[151] Ficha Técnica de Remicade® (infliximab). Schering-Plough SA (Febrero, 2001).

[152] European Agency for the Evaluation of Medical Products. Committee for Proprietary Medicinal Products. *European Public Assessment Report (EPAR)*. Remicade®. London: 1999.

[153] Targan S.R. *et al.* A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. *N Engl J Med* 1997; 337(15):1029-35.

[154] Agencia Española del Medicamento. Nota informativa sobre el riesgo de infección tuberculosa asociado a infliximab (Remicade®).

[155] Sands E. Therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000; 118(2): S 68-82.

- [156] Hanauer S.B. *et al.* Delayed hypersensitivity to infliximab (Remicade) re-infusion after 2-4 year interval without treatment. *Gastroenterology* 1999; 116: A731.
- [157] Sutherland L. Infliximab: un recours ultime pour la maladie de Crohn. *Rev Prescr* 2000; 20(207): 420-3.13-.
- [158] Cush J.J. Safety overview of new disease-modifying antirheumatic drugs. *Rheum Dis Clin North Am* 2004; 30(2): 237-55, v.
- [159] Infliximab. *Rev Prescrire* 2004; 24:331-334.
- [160] Keystone E.C. Advances in targeted therapy: safety of biological agents. *Ann Rheum Dis* 2003; 62 Suppl 2:ii34-ii36.
- [161] Lamdan Ordas H. Tesis doctoral: “Obtención de un fragmento de anticuerpo humano neutralizante contra un nuevo epítipo del factor de crecimiento del endotelio vascular”. *Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana, 2015.*
- [162] Giannis Mountzios *et al.* Bevacizumab and micrometastases: Revisiting the preclinical and clinical rollercoaster. *Pharmacology & Therapeutics* 141 (2014) 117–124.
- [163] Agencia Europea de Medicamentos (EMA). Ficha técnica de BVZ. <http://www.ema.europa.eu>
- [164] Napoleone Ferrara *et al.* Discovery and development of Bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nature Reviews | Drug Discovery* Volume 3 | May 2004.
- [165] Wiesmann C. *et al.* Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell* 1997; 91(5): 695-704.
- [166] Ted Shih *et al.* New Drug Bevacizumab: An Angiogenesis Inhibitor for the Treatment of Solid Malignancies. *Clinical Therapeutics/Volume 28, Number 11, 2006.*
- [167] Michel Marty *et al.* The potential of anti-vascular endothelial growth factor therapy in metastatic breast cancer: Clinical experience with anti-angiogenic agents, focusing on bevacizumab. *European Journal of Cancer* 44 (2008) 912–920.
- [168] Rosenfeld P.J. *et al.* Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2005; 36: 331-335.

Introducción

[169] Signorello L. *et al.* “Quantification, Microbial Contamination, Physico-chemical Stability of Repackaged Bevacizumab Stored Under Different Conditions”. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, June 2014, 15, 000-000.

[170] Ratner M. Fearful of Avastin's fate, Genentech asks for unusual hearing. *Nature Medicine*. 2011 Mar; 17(3):233.

[171] Keunen O. *et al.* Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 1; 108(9):3749-3754.

[172] Allegra C.J. *et al.* Phase III trial assessing bevacizumab in stages II and III carcinoma of the colon: results of NSABP protocol C-08. *Journal of Clinical Oncology*. 2011 Jan 1; 29(1):11-16.

[173] Van Cutsem E. *et al.* Lessons From the Adjuvant Bevacizumab Trial on Colon Cancer: What Next? *Journal of Clinical Oncology*. 2011 Jan 1; 29(1):1-10.

[174] John H. Heinzerling *et al.* Bowel Perforation from Bevacizumab for the Treatment of Metastatic Colon Cancer: Incidence, Etiology, and Management. *Current Surgery*. Volume 63/Number 5 • September/October 2006.

[175] Burger *et al.* Phase III trial of bevacizumab (BEV) in the primary treatment of advanced epithelial ovarian cancer (EOC), primary peritoneal cancer (PPC), or fallopian tube cancer (FTC): A Gynecologic Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology*, 2010 ASCO Annual Meeting Abstracts. Vol 28, No 18_suppl (June 20 Supplement), 2010: LBA1.

[176] Ranpura V. *et al.* Treatment-related mortality with bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis. *The Journal of the American Medical Association (JAMA)*. 2011 Feb 2; 305(5):487-494.

[177] Sònia Tugues. Review. Vascular endothelial growth factors and receptors: Anti-angiogenic therapy in the treatment of cancer. *Molecular Aspects of Medicine* 32 (2011) 88–111.

[178] Agencia Europea de Medicamentos (EMA). Ficha técnica de Erbitux® (cetuximab). <http://www.ema.europa.eu>

[179] Carretero Colomer M. Cetuximab. Inhibidor del crecimiento del cáncer colorrectal. Actualidad científica. *Medicamentos de Vanguardia OFFARM*. Vol 24, Núm. 6. (pág: 126-130). Junio 2005.

- [180] Hantash J. *et al.* The development, optimization and validation of an ELISA bioanalytical method for the determination of Cetuximab in human serum. *Analytical Methods Anal. Methods*, 2009, 1, 144–148.
- [181] Consejería de Sanidad Generalitat Valenciana. Resolución del Secretario Autonómico de Sanidad de declaración como MAISE de cetuximab. Director General de Farmacia y Productos Sanitarios. PAISE. Marzo 2012.
- [182] EMEA 2004. SCIENTIFIC DISCUSSION This module reflects the initial scientific discussion for the approval of Erbitux.
- [183] Graham J. *et al.* Cetuximab. News & analysis. *Nature Reviews | Drug Discovery*. Volume 3 | July 2004 | 549.
- [184] Kwang-Won H. *et al.* A novel anti-EGFR monoclonal antibody inhibiting tumor cell growth by recognizing different epitopes from cetuximab. *Journal of Biotechnology* 145 (2010) 84–91.
- [185] Baselga J. The EGFR as a target for anticancer therapy—focus on cetuximab. *European Journal of Cancer* 37 (2001) S16–S22.
- [186] Carnero Gómez R. Impacto del tratamiento del cáncer colorrectal metastásico con Erbitux (CETUXIMAB). *Rev Esp Econ Salud* 2005;4 (3):179-18.
- [187] Mendelson J. Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. *J Clin Oncol*. 2002 Sep 15; 20(18 Suppl):1S-13S.
- [188] Efat Azizi *et al.* Review Article: Antiepidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibodies: Applications in Colorectal Cancer. *Chemotherapy Research and Practice* Volume 2012.
- [189] Brenner H. *et al.* EURO CARE Working Group. Long term survival expectations of cancer patients in Europe in 2000-2002. *Eur J Cancer* 2009; 45: 1028-1041.
- [190] Vallböhmer D. *et al.* Molecular determinants of cetuximab efficacy. *J Clin Oncol*. 2005 May 20; 23(15):3536-44.
- [191] Saltz L.B. *et al.* Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol*. 2004 Apr 1; 22(7):1201-8. Epub 2004 Mar 1.

Introducción

[192] Cunningham D. *et al.* Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004 Jul 22; 351(4):337-45.

[193] Lenz H.J. *et al.* Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. *J Clin Oncol.* 2006 Oct 20; 24(30):4914-21.

[194] Lievre A. *et al.* KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2006 Apr 15; 66(8):3992-5.

[195] Benvenuti S. *et al.* Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res.* 2007 Mar 15; 67(6):2643-8.

[196] Di Fiore F. *et al.* Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer.* 2007 Apr 23; 96(8):1166-9. Epub 2007 Mar 20.

[197] De Roock W. *et al.* KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol.* 2008 Mar; 19 (3):508-15. Epub 2007 Nov 12.

[198] Azzopardi N. *et al.* Cetuximab Pharmacokinetics Influences Progression-Free Survival of Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Clinical Cancer Research* 17(19):6329-37 · September 2011.

[199] Huertas Fernández M.J. *et al.* Tratamiento con cetuximab en pacientes con cáncer colorrectal metastásico que no expresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico. *Farm Hosp* 2007; 31: 264-269.

[200] Siu-Fun Wong *et al.* Cetuximab: An Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody for the Treatment of Colorectal. *Cancer Clinical Therapeutics* Volume 27, Number 6, 2005.

[201] Marín Pozo J.F. *et al.* Estudio de utilización de cetuximab en cáncer colorrectal metastásico en un hospital de tercer nivel. *Farm Hosp.* 2009;33(2):72-9.

[202] Grigorean V.T. *et al.* Efficacy of Cetuximab in Metastatic Colon Cancer - Case Report. *Chirurgia* (2014) No. 3, 109: 383-389.

[203] Luedke E. *et al.* Cetuximab therapy in head and neck cancer: Immune modulation with interleukin-12 and other natural killer cell-activating cytokines. *SURGERY (September 2012)*, Volume 152, Num 3 431-440.

[204] Yong-Feng Yu *et al.* The Effects of Cetuximab Alone and in Combination With Endostatin on Vascular Endothelial Growth Factor and Interleukin-8 Expression in Human Lung Adenocarcinoma Cells. *Current Therapeutic Research. Volume 70, Number 2, April 2009.*

[205] Yang Z. *et al.* Chemotherapy with Cetuximab versus chemotherapy alone for chemotherapy-naive advanced non-small cell lung cancer (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews 2014, Issue 11. Art. N°:CD009948.*

[206] Misale S. *et al.* Emergence of *KRAS* mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature 2012 Volume 486, 532–536.*

[207] Agencia Europea de Medicamentos (EMA). Ficha técnica de Herceptin® (trastuzumab). <http://www.ema.europa.eu>

[208] Marvin M. Goldenberg. New Drugs Trastuzumab, a Recombinant DNA-Derived Humanized Monoclonal Antibody, a Novel Agent for the Treatment of Metastatic Breast Cancer. *Clinical Therapeutics Vol. 21, N° 2, 1999.*

[209] Robert M. Hudziak *et al.* p185HER2 Monoclonal Antibody Has Antiproliferative Effects *In Vitro* and Sensitizes Human Breast Tumor Cells to Tumor Necrosis Factor. *Molecular and Cellular Biology, Mar. 1989, p. 1165-1172.*

[210] Carter P. *et al.*, Humanization of an anti-p185her2 antibody for human cancer therapy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285–4289.*

[211] *Comunicado de prensa Roche.* Herceptin, de Roche, en inyección subcutánea es más práctico para el paciente y reduce los costos sanitarios generales en comparación con la infusión intravenosa estándar. *Basilea, 23 de marzo de 2012.*

[212] Peter S. Hall *et al.* Current perspective –Trastuzumab. *European Journal Of Cancer 45 (2009) 12–18.*

[213] Perez Lopez S. *et al.* Trastuzumab en el cáncer de mama metastásico HER-2 +. *Farm Hosp. 2002; 24(2):83-87.*

[214] Nahta R. *et al.* Mini review. Herceptin: mechanisms of action and resistance. *Cancer Letters 232 (2006) 123–138.*

Introducción

[215] Pradip De *et al.* Molecular determinants of trastuzumab efficacy: What is their clinical relevance?. *Cancer Treatment Reviews* 39 (2013) 925–934.

[216] Gómez Martín C. Tesis Doctoral: Importancia Pronóstica y Predictiva del estudio del oncogén *HER2* en Adenocarcinomas Gástricos. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid. 2010.

[217] Slamon D. *et al.* Adjuvant Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* 2011; 365:1273-83.

[218] McKeage K. *et al.* Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2. *Drugs*. 2002;62(1):209-43.

[219] Jr Recondo G. *et al.* Therapeutic options for HER-2 positive breast cancer: Perspectives and future directions. *World J Clin Oncol*. 2014 Aug 10; 5(3): 440–454.

[220] Corrigan P.A. *et al.* Ado-trastuzumab emtansine: a HER2-positive targeted antibody-drug conjugate. *Ann Pharmacother*. 2014 Nov; 48(11):1484-93.

[221] Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Antonio González Martín *et al.* Informe de Posicionamiento Terapéutico de trastuzumab emtansina (Kadcyla®). Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. 27 de julio de 2015.

[222] Catarina Pinto A. *et al.* Trastuzumab for patients with HER2 positive breast cancer: Delivery, duration and combination therapies. *The Breast* 22 (2013) S152-S155.

[223] Anido Folgueira J. Tesis Doctoral: Nuevos mecanismos de tumorigénesis del protooncogen *HER-2*. Implicaciones terapéuticas en cáncer de mama. Instituto de Investigación del Hospital Universitario Vall d' Hebrón. Barcelona. Junio 2006.

[224] Kamal S. Saini *et al.* Beyond trastuzumab: New treatment options for HER2-positive breast cancer. *The Breast* 20 (2011) S3, S20–S27.

[225] Iben Kümler *et al.* A systematic review of dual targeting in HER2-positive breast cancer. *Cancer Treatment Reviews* 40 (2014) 259–270.

[226] Bianchini G. *et al.* The immune system and response to HER2-targeted treatment in breast cancer. *Lancet Oncol* 2014; 15: e58–68.

[227] Pradip De *et al.* Molecular determinants of trastuzumab efficacy: What is their clinical relevance?. *Cancer Treatment Reviews* 39 (2013) 925–934.



CAPÍTULO I

METODOLOGÍA EMPLEADA

En este capítulo se presentan además de los reactivos, materiales e instrumentación utilizados, las diferentes herramientas analíticas empleadas en esta Tesis Doctoral para la puesta a punto y validación de los diferentes ELISAs que se han desarrollado. En este contexto, se incluyen tanto las variables seleccionadas para la puesta a punto de los ELISAs como la forma en que se ha llevado a cabo la validación y aplicación de los mismos.

1. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

1.1. REACTIVOS: PRODUCTOS QUÍMICOS, PROTEÍNAS Y SUS DISOLUCIONES

1.1.1. Productos químicos

✓ A través de la casa comercial Panreac Química S.A (Barcelona, España), fueron adquiridos los siguientes productos químicos:

- Carbonato sódico (Na_2CO_3)
- Hidrógenocarbonato sódico (NaHCO_3)
- Cloruro sódico (NaCl)
- Cloruro potásico (KCl)
- Monohidrógenofosfato sódico monohidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- Dihidrógenofosfato potásico (KH_2PO_4)
- Acido clorhídrico (HCl) (37 %)
- Hidróxido sódico (NaOH) (97 %)
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4)

✓ Productos químicos obtenidos de otras casas comerciales:

- Tween 20 procedente de Fluka Chemika (Madrid, España).
- Leche en polvo desnatada *La Asturiana* (Asturias, España)

Capítulo I

- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (30 % w/v 100 vol.) obtenido a través de Technical (Fontenay-sous-Bois, Francia).
- Cloruro sódico (NaCl) procedente de la casa comercial B. Braun Medical (Madrid, España).
- OPD SigmafastTM (orto-fenilendiamina dihidrocloruro) de Sigma Aldrich (Madrid, España).

1.1.2. Proteínas

➤ *Anticuerpos conjugados*

Los Abs conjugados empleados en la presente investigación han sido adquiridos en la casa comercial Sigma-Aldrich.

- a. *IgG antiratón (molécula completa) conjugado con peroxidasa producido en cabra*: se presenta como una disolución en tampón fosfato salino 0,01 M pH 7,4, conteniendo albúmina de suero bovino al 1 % y timerosal al 0,01 %. La preparación de las disoluciones de trabajo se llevó a cabo tomando como concentración inicial la indicada en el certificado de análisis emitido por el fabricante, siendo esta de 0,9 mg/ml. Mediante dilución con tampón hidrógenocarbonato/carbonato 0,1 M pH 9,6 (en adelante nombrado como tampón carbonato) se obtuvo la concentración de trabajo adecuada. La disolución final fue dividida en alícuotas, en viales de vidrio ámbar de 1,5 ml con tapón de rosca que se almacenaron a -20°C hasta su uso.
- b. *IgG antihumano (molécula completa) conjugado con peroxidasa producido en conejo*: se presenta como una disolución en tampón fosfato salino 0,01 M pH 7,4, conteniendo timerosal al 0,01 %. Las disoluciones de este Ab secundario se realizaron de acuerdo con la concentración indicada en el certificado de análisis y uso de la casa comercial, concentración que puede variar con cada lote. La concentración inicial se diluye por adición de tampón carbonato 0,1 M pH 9,6. hasta obtener la concentración adecuada de trabajo para cada situación. Después de la preparación, se

dividió el contenido íntegro en alícuotas, en viales de vidrio ámbar de 1,5 ml con tapón de rosca y se almacenó a -20°C hasta el momento de uso.

➤ *Antígenos*

Los Ags empleados para llevar a cabo el desarrollo de los inmunoensayos descritos en el presente trabajo han sido adquiridos en la casa comercial Sigma-Aldrich.

a. *Factor de necrosis tumoral α (TNF- α) recombinante*, expresado en *E. Coli*, se presenta en polvo, adecuado para cultivo celular. **Es el Ag de IFX**. El vial contiene 50 μ g de producto y según las indicaciones del fabricante debe ser reconstituido con agua purificada a una concentración comprendida entre 0,1-1,0 mg/ml. Se seleccionó reconstituir el TNF- α a una concentración de 0,1 mg/ml, mediante la adición de 500 μ l de agua purificada directamente sobre el contenido del vial. De esta forma se obtiene la mayor cantidad posible de disolución y se aprovecha mejor. Tras dicha reconstitución el vial fue centrifugado durante 3 minutos a 1.000 r.p.m, para asegurar la mezcla completa del contenido. Tras la centrifugación, se agitó el contenido con la ayuda de un agitador de tubos vortex durante unos segundos. Posteriormente, la disolución se dividió en alícuotas y se almacenó a -20°C hasta su uso, momento en el cual fue llevada a la concentración de ensayo usando tampón carbonato 0,1 M pH 9,6.

b. *Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) humano recombinante*, expresado en *E. Coli*, se presenta como polvo liofilizado. **Es el Ag de BVZ**. 10 μ g de VEGF como polvo liofilizado fueron reconstituidos según las instrucciones del fabricante, con agua purificada a una concentración de 0,1 mg/ml. Para ello se adicionaron 100 μ l de agua purificada a los 10 μ g iniciales de VEGF y se almacenaron alícuotados a -20°C. Tras su reconstitución y en el momento de uso, la disolución se llevó a la concentración óptima de trabajo usando tampón carbonato 0,1 M pH 9,6.

Capítulo I

c. Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) humano. **Es el Ag de CTX.** Esta proteína se suministra en una disolución de glicerol al 50 % con ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES) 50 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM, Triton X-100 0,1 % y 1,4-ditiotreitol 1mM. Tras su recepción, se almacena a -20°C. El certificado de análisis indica que tiene una concentración de 0,27 mg/ml. Todo el contenido del vial a esta concentración, se lleva a la concentración final de trabajo por dilución con disolución tampón carbonato 0,1 M pH 9,6. Posteriormente se alícuota y se congela a -20°C hasta el momento de uso.

d. Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2) recombinante expresado en células Sf9. **Es el Ag de TTZ.** Su concentración inicial indicada es de 0,05 mg. Fue reconstituido siguiendo las indicaciones del fabricante, con agua purificada a una concentración de 0,1 mg/ml. Para ello se añaden 500 µl de agua purificada. Posteriormente, la disolución de HER-2 se dividió en alícuotas y se almacenó a -80°C hasta su uso, momento en el cual fue llevado a la concentración adecuada usando tampón carbonato 0,1 M pH 9,6.

1.1.3. Disoluciones empleadas

Todas las disoluciones utilizadas a lo largo del presente trabajo de investigación se han preparado mediante el empleo de los siguientes **disolventes:**

✦ *Agua purificada*

Obtenida a través de un equipo de ósmosis inversa Milli RO12 Plus (Millipore) acoplado a un equipo de refinado Milli Q Plus 185 (Millipore) (Milli-Q®, Bedford, MA, USA).

✦ *Agua para inyectables*

Ampollas estériles de 10 ml de agua para inyectables obtenidas a través de la casa comercial B. Braun Medical.

A continuación, se recogen las disoluciones empleadas a lo largo del trabajo experimental llevado a cabo.

➤ **Disoluciones de mAbs**

✓ ***Suero salino 0,9 % (NaCl 0,9 %)***

Disolución empleada para reconstituir algunos de los mAbs ensayados. Elaborada mediante la dilución de 0,9 ml de NaCl (B. Braun Medical) hasta 100 ml con agua purificada.

✓ ***Tampón hidrógenocarbonato/carbonato***

Para obtener las diferentes disoluciones de mAbs se empleó como disolvente un tampón carbonato pH 9,6 de concentraciones 0,1 M y 0,05 M. *Composición:* Na₂CO₃, NaHCO₃ y agua purificada.

➤ **Otras disoluciones**

✓ ***Disolución de lavado : PBS 0,15 M pH 7,4 con Tween 20 0,3 % (v/v)***

Composición:

- Tampón fosfato salino (PBS) 0,15 M pH 7,4: NaCl 8 g; KCl 0,2 g; Na₂HPO₄·H₂O 1,44 g; KH₂PO₄ 0,24 g y agua purificada hasta enrase a 1000 ml.

- Tween 20 0,3 % (v/v). Se adicionan 3 ml en 1000 ml de disolución de lavado.

✓ ***Tampón de bloqueo***

Consistente en una disolución de leche en polvo desnatada al 2 % (w/v) preparada en PBS 0,15 M pH 7,4 con Tween® 20 0,3 % (v/v). Se prepararon diariamente 25 ml de tampón de bloqueo al 2 % mediante la adición de 0,5 g de leche en polvo desnatada en un matraz aforado de 25

Capítulo I

ml y posterior disolución y enrase hasta 25 ml con PBS 0,15 M pH 7,4 con Tween® 20 0,3 % (v/v).

✓ *OPD: Sustrato de la reacción enzimática*

OPD Sigmafast™. Todos los reactivos para la preparación del sustrato, excepto el agua purificada, fueron adquiridos en forma de comprimidos de la casa comercial Sigma Aldrich. Este producto es una patente de esta casa comercial que facilita el empleo del mismo.

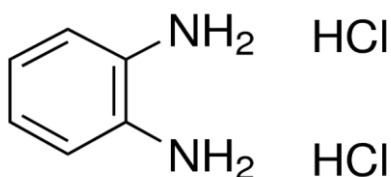


Figura 1.1. OPD (Orto-fenilendiamina dihidrocloruro). Fuente: www.sigmaaldrich.com

Este sustrato fue preparado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada comprimido se disuelve en 20 ml de agua purificada, de forma que se obtiene una disolución tampón lista para ser usada, que contiene OPD, urea, más peróxido de hidrógeno y tampón citrato-fosfato.

La composición de la disolución así preparada es la indicada a continuación:

OPD 0,4 mg/ml, H₂O₂ + urea 0,4 mg/ml, tampón citrato-fosfato 0,05 M pH 5 y 20 ml de agua purificada.

✓ *Disolución de parada de la reacción enzimática*

Disolución de H₂SO₄ 1 M. Cada vez que era necesario se elaboraban 50 ml de disolución con agua purificada.

✓ *Disoluciones empleadas para los estudios de degradación acelerada (estudios de estrés)*

- Disolución de H₂O₂ (30 % w/v 100 vol) como agente oxidante. Fueron preparadas dos disoluciones de H₂O₂ al 1 % y al 10 %. Para ello, en un matraz aforado de vidrio de 100 ml se adiciona agua purificada sobre la cual se vierte lentamente 1 ml y 10 ml respectivamente de H₂O₂ y se completa el volumen del matraz con agua purificada, es decir, se enrasa con agua purificada hasta 100 ml.
- Disolución de HCl (37 %) 0,1 M. En campana extractora se adicionó un pequeño volumen de agua purificada en un matraz aforado de 100 ml sobre la cual se fue vertiendo poco a poco 827 µl de HCl. Una vez adicionado todo el HCl se enrasó hasta 100 ml con agua purificada.
- Disolución NaOH (97 %) 0,1 M. Para preparar 100 ml fue necesario adicionar en un matraz aforado de vidrio 0,41 g de NaOH, enrasar hasta 100 ml con agua purificada y completar la disolución.
- Disolución de NaCl 1,5 M. En un matraz aforado de vidrio de 100 ml se adiciona agua purificada sobre la cual se añaden 8,7 g de NaCl, se disuelven y se enrasa hasta 100 ml con agua purificada.

1.2. ANTICUERPOS MONOCLONALES ESTUDIADOS

Los mAbs estudiados en la presente Tesis Doctoral no están comercializados, por lo que sólo pueden ser adquiridas muestras bien por cesión de las correspondientes compañías farmacéuticas comercializadoras de los mismos en España, o bien mediante proyectos específicos de colaboración con hospitales, como es el caso de la presente Tesis Doctoral. En consecuencia, todas las muestras de los mAbs usadas en este estudio fueron facilitadas por el Servicio de Farmacia Hospitalaria perteneciente al Hospital Universitario San Cecilio (Granada, España). Dichas muestras fueron recogidas en el momento de análisis. Una vez reconstituidos los MB que así lo requieren (IFX y TTZ) por el personal de dicho Servicio de Farmacia tal y como indica el fabricante, es decir, en

Capítulo I

cabina de flujo laminar, diluyendo adecuadamente su contenido en agua para inyectables, los remanentes o cantidades sobrantes de los MB no empleados eran conservados en frío, a 4°C hasta el momento de su recogida en el mismo día de su preparación para ser analizados.

Por tanto, y teniendo en cuenta los mAbs estudiados, los MB empleados a lo largo de este trabajo han sido:

- Remicade[®] (IFX) 10 mg/ml. Cada vial contiene 100 mg de IFX como polvo liofilizado. Después de la reconstitución con agua para inyectables, la concentración es de 10 mg/ml de IFX (Janssen Biologics B.V., Einsteinweg 101, 2333 CB Leiden, Países Bajos) [1].
- Avastin[®] (BVZ) 25 mg/ml. Se presenta como una disolución de concentración 25 mg/ml de BVZ. Se dispensa en dos presentaciones - 4 ml y 16 ml-, conteniendo 100 mg y 400 mg de BVZ respectivamente (Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Alemania) [2].
- Erbitux[®] (CTX) 5 mg/ml. Se presenta como una disolución para perfusión de concentración 5 mg/ml de CTX. Se dispensa en dos presentaciones -20 ml y 100 ml-, conteniendo 100 mg y 500 mg de CTX respectivamente (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) [3].
- Herceptin[®] (TTZ) 15 mg/ml. Cada vial contiene 150 mg de TTZ como polvo liofilizado. La disolución reconstituida con agua para inyectables presenta una concentración de 15 mg/ml de TTZ (Roche Registration Limited, Welwyn Garden City, Reino Unido) [4].
- Mabthera[®] (RTX) 10 mg/ml. Se presenta como una disolución de concentración 10 mg/ml de RTX y cada vial contiene 100 mg de RTX en 10 ml (Roche Registration Limited, Welwyn Garden City, Reino Unido) [5].

1.3. INSTRUMENTOS Y EQUIPOS

1.3.1. Instrumentos de medida

- Lector de absorbancia de placas de microtitulación de 96 pocillos Tecan Sunrise (Tecan Austria GMBH) acoplado a un PC dotado del programa informático *XFluor4*. Comecta (Barcelona, España).



Figura 1.2. Lector de microplacas Tecan Sunrise (Tecan Austria GMBH). Fuente: elaboración propia.

- Balanzas analíticas Ohaus Discovery DV215CD (Zurich, Suiza) y Ohaus Pioneer PA2102 (China), con intervalo de pesada de 0-81 y 0-2100 g y precisión 0,01 mg y 0,01 g, respectivamente.
- pHmetro digital modelo MicropH 2000 provisto de electrodo combinado de vidrio y plata/cloruro de plata (KCl 3M) CRISON (Barcelona, Spain).

1.3.2. Equipos

- Lavador de placas de microtitulación formadas por 96 pocillos VASHER RT-2600C de Comecta.

Capítulo I



- Congelador vertical de temperatura ultrabaja -86°C THERMO Scientific REVCO ULT2586-3SI-D38 (Madrid, España).
- Reloj electrónico con temporizador 24h, 1 memoria QUIRUMED TR118 suministrado por eLAB (Granada, España).

1.4. MATERIAL DE LABORATORIO

Todo el material utilizado en el trabajo experimental fue de vidrio, excepto las placas de microtitulación, los tubos eppendorf y las puntas de pipeta, para evitar posibles interferencias (adsorciones) del material proteico con el material plástico.

En el desarrollo de todo el trabajo experimental de laboratorio, se utilizó el siguiente material:

- Placas de microtitulación
 - Placas de microtitulación de 96 pocillos, de fondo plano, bolsa unitaria, sin tapa, Deltalab S.L (Granada, España).

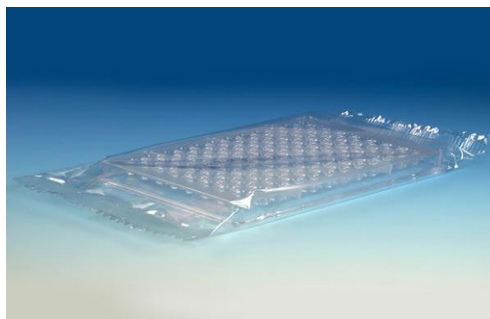


Figura 1.4. Placa de microtitulación. Fuente: www.globescientific.com

Estas placas fueron empleadas al inicio de la investigación para desarrollar en ellas los diferentes inmunoensayos. Sin embargo, a la hora

Capítulo I

de aplicar el método ELISA indirecto, las señales analíticas obtenidas fueron similares a las obtenidas en los pocillos sin ningún contenido. Debido a esto, comenzaron a utilizarse placas ya preparadas con un tratamiento biológico específico, en las cuales la sensibilización se realiza de forma correcta y el Ag/Ab queda fijado para poder desarrollar el ensayo. Las placas utilizadas finalmente fueron las indicadas a continuación.

- *Placas Nunc MaxisorpTM* de fondo plano. Fabricadas en poliestireno (PS), sin tapa, con capacidad de adsorción homogénea certificada y alta afinidad por moléculas con grupos hidrofílicos/hidrofóbicos mixtos adquiridas de Labclinic S.A (Barcelona, España).

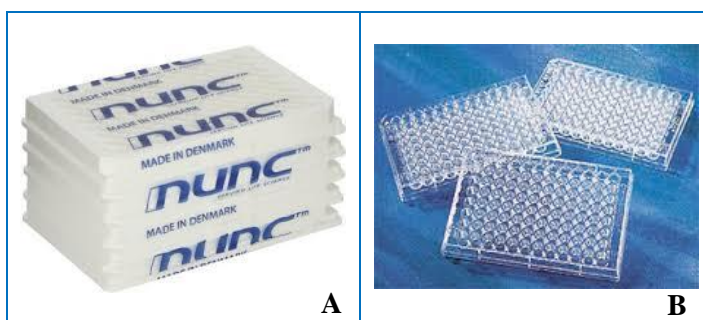


Figura 1.5. A. Paquete de 5 placas *Nunc MaxisorpTM*. Fuente: www.amazon.com.

B. Placas *Nunc MaxisorpTM*. Fuente: www.sigmaaldrich.com.

- Matracas aforados (2 l, 10, 25, 50 y 100 ml) AFORA clase A de Thermo Fisher Scientific Inc. (Madrid, España).
- Vasos de precipitado (10, 25, 50 y 100 ml) PYREX obtenidos a través de la casa comercial DeltaLab S.L.
- Micropipetas de diferentes capacidades (0,5-10 μ l; 10-100 μ l; 10-200 μ l; 1-5 ml) LABMATE, PZ HTL LAB Solutions S.A. (Varsovia, Polonia).

- Pipeta multicanal de 8 canales y capacidad 20-200 μ l, HTL LAB Solutions obtenida a través de eLAB (Granada, España).
- Puntas de micropipetas obtenidas a través de eLAB.
- Pipetas de vidrio graduadas y aforadas (10 ml y 25 ml) AFORA clase A de Thermo Fisher Scientific Inc.
- Botellas de vidrio graduadas (100 ml y 500 ml) AFORA clase A de Thermo Fisher Scientific Inc.
- Botellas de cristal topacio graduadas (100 ml y 500 ml) AFORA clase A de Thermo Fisher Scientific Inc.
- Jeringas estériles de plástico Kendall monojet* (1ml). Kendall S.A. (Costa del Este, Panamá).
- Agujas de jeringa BD MicrolanceTM 3 0,9 mm x 25 mm Becton Dickinson S.A. (Madrid, España).
- Viales de vidrio con tapón a presión y de rosca (2 ml, 4 ml, 8 ml, 10 y 20 ml) SYMTA. VWR International Eurolab, S.L., (Barcelona, España).
- Viales topacio graduados 1,5 ml, con sus correspondientes tapones de rosca 100/PK de eLAB.
- Cajas de congelación de viales de eLAB.
- Zapatillos de pesada, varillas de vidrio, cucharillas, así como otros materiales de uso habitual en cualquier laboratorio de Química Analítica.

Capítulo I

1.5. ORDENADORES Y SOFTWARES

- Ordenadores: ASUS X54H y ASUS Inter (R) Pentium (R) CPU G3240.

- Impresora OKI B430 (PCL) y BROTHER HL-2240.

- Programas informáticos empleados:

- El control del lector de placas de microtitulación y la adquisición de las señales de absorbancia de las placas, se ha realizado mediante el software *XFluor4TM* de Tecan (Männedorf, Suiza).
- Las representaciones gráficas se han realizado mediante el programa *Microsoft Office Excel 2007*.
- El programa de cálculo usado ha sido *Statgraphics Plus* versión 5.1. y *Statgraphics Centurion*. Statgraphics.net (Madrid, España).
- El tratamiento de textos se ha realizado mediante el programa *Microsoft Office Word 2007*.

2. METODOLOGÍA ANALÍTICA EMPLEADA

En la presente Tesis Doctoral se han desarrollado y validado ensayos tipo ELISA que permitan llevar a cabo estudios de estabilidad de varios MB, cuya validez, una vez abierto el vial es de entre 24 y 48 h, según datos del fabricante.

Para llevar a cabo este objetivo, se han desarrollado y validado varios **métodos ELISA, tanto en modalidad directa como indirecta, para la determinación de los diferentes MB en estudio**. La elección de estos tipos de ELISA se debe a que permiten obtener información de forma rápida y sencilla y con periodos de incubación pequeños, además de por sus ventajas en cuanto a sencillez y efectividad a la hora de evaluar la actividad biológica de los mAbs.

2.1. MÉTODOS ELISA: ASPECTOS GENERALES SELECCIONADOS PARA EL DESARROLLO DE LOS MISMOS.

El desarrollo de un método ELISA de forma habitual incluye, tal y como quedó inicialmente descrito en la Introducción de esta Tesis Doctoral, la selección de una serie de parámetros que condicionan su posterior desarrollo. Entre estos se incluyen las placas de microtitulación utilizadas, la elección del conjugado, el tiempo y temperatura a aplicar en los períodos de incubación, así como el uso de enzimas y sustratos adecuados.

En la presente Tesis Doctoral se han seleccionado de partida, y a partir de bibliografía consultada, las condiciones indicadas a continuación. Estas han sido elegidas de entre las más utilizadas habitualmente para el desarrollo de estos métodos [6-28]. Esto es:

✓ *Las **microplacas** empleadas para el desarrollo de las modalidades ELISA descritas en el presente trabajo y que han quedado descritas anteriormente.*

✓ ***Disolución bloqueo-conservante.***

Tras comprobar que era adecuada para el desarrollo de los inmunoensayos, como disolución bloqueo-conservante fue seleccionada la leche en polvo 2 % + PBS 0,15 M pH 7,4 con Tween 20 0,3 % (v/v)

✓ *La selección del número de **ciclos de lavado y aspiración**, así como de la **disolución de lavado**.*

Fue seleccionado el número de ciclos y aspiraciones empleados con mayor frecuencia en literatura y que son: 4 ciclos de lavado seguidos de 4 aspiraciones. Como disolución de lavado fue usada la disolución de PBS 0,15 M pH 7,4 con Tween 20 0,3 % (v/v)

✓ *Las **temperaturas y tiempos de incubación** tras adicionar los diferentes componentes del ELISA.*

Capítulo I

Fueron seleccionados las siguientes temperaturas y tiempos de incubación:

- ✦ La *sensibilización de las placas* de microtitulación (tras la adición del Ag o Ab) se realizó a 4°C durante 18 horas “overnight”.
 - ✦ Tras la adición del *bloqueante* las placas se incubaron a 37°C durante 2 horas.
 - ✦ Seguidamente, y tras la adición del *Ab primario* (muestra problema) la incubación de las placas se llevó a cabo a una temperatura de 37°C durante 45 minutos.
 - ✦ Tras la adición del *Ab secundario conjugado* mediante el cual se desvela la reacción Ag/Ab, las placas se incubaron a 37°C durante 30 minutos.
 - ✦ A continuación, tras la adición del *sustrato* de la reacción enzimática, las placas ELISA se mantuvieron a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) durante 20 minutos y en oscuridad.
 - ✦ Finalmente, tras la adición del *reactivo de parada* de la reacción enzimática, se realizó la lectura de las placas de forma inmediata.
- ✓ *Los Abs conjugados con los cuales han sido desarrollados los diferentes métodos ELISA son:*
- *IgG antihumano marcado con peroxidasa (molécula completa) producido en conejo.*
 - *IgG antiratón (molécula completa) conjugado con peroxidasa producido en cabra.*

Por tanto, la *enzima de marcaje* empleada fue la *peroxidasa*, dado que se trata de una enzima que se encuentra comercializada como conjugado,

posee un precio razonable y sus propiedades se adaptan a las requeridas para la investigación.

- ✓ Como sustrato de la peroxidasa ha sido usado el *sustrato soluble OPD*, también comercialmente disponible.
- ✓ *Reactivo de parada de la reacción enzimática.*

Como reactivo para llevar a cabo la finalización de la reacción enzimática fue seleccionado el H₂SO₄ 1 M.

- ✓ *Las condiciones de lectura seleccionadas y que vienen impuestas por la reacción enzimática que tiene lugar en las placas.*

La elección del OPD como sustrato lleva implícita la **longitud de onda** a la cual debe realizarse la **lectura** de los ensayos. Ya que el término de la reacción enzimática da lugar a la formación de un compuesto anaranjado, la longitud de onda seleccionada fue **450** (señal analítica) y **620 nm** (señal seleccionada como blanco).

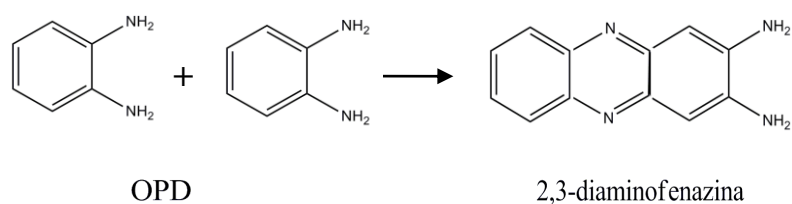


Figura 1.6. Reacción de oxidación producida entre H₂O₂ y OPD en presencia de la enzima peroxidasa. Fuente: elaboración propia.

Dado que el producto final de la reacción enzimática es de color anaranjado, este no presentará absorbancia característica a 620 nm y sí a 450 nm, siendo por tanto la absorbancia obtenida la resultante de la diferencia entre las absorbancias medidas a 450 nm y las medidas a 620 nm.

2.2. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ELISA DESARROLLADOS

Los ELISAs desarrollados en la presente Tesis Doctoral han sido validados de acuerdo con las recomendaciones recogidas en bibliografía específica de inmunoensayos [29-31], así como en las guías ICH Q6B (Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products) [32] y Q2 (R1) (Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology) [33]. Así, tras la optimización y selección de los factores críticos que afectan a un ELISA, se procede a la validación de cada método, incluyendo para ello la evaluación de:

1. Función o modelo de calibración estándar.
2. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).
3. Intervalo de cuantificación (IC) y de detección (ID).
4. Precisión como reproducibilidad intra-día e inter-día.
5. Exactitud/veracidad como porcentaje de recuperación.
6. Especificidad/selectividad determinada mediante estudios de reacciones cruzadas.

El gran gasto que supondría la compra de los mAbs ensayados para la realización de estos estudios de validación, así como la caducidad limitada que presentan según datos del fabricante, hacen que ante la falta de material estándar de los mAbs estudiados, para la etapa de validación sean usadas unidades de medicamentos considerados en dichos estudios como material patrón o estándar. Estos medicamentos fueron utilizados inmediatamente después de abrir los envases y/o reconstituirlos, y siempre dentro del periodo de validez indicado por el fabricante, que en ningún caso es superior a 24/48 horas.

2.2.1. Función de calibrado

Para cada mAb estudiado fue establecida una curva de calibración estándar ajustada mediante el método de los mínimos cuadrados [34]. Las curvas fueron obtenidas mediante el uso de muestras estándar de cada mAb. Dichas muestras fueron preparadas por triplicado y los datos obtenidos de absorbancia fueron usados para evaluar y seleccionar el modelo matemático al que mejor se ajustan los datos experimentales.

Dado que el modelo al que se ajusta la respuesta de la señal analítica a la reacción Ag/Ab estudiada varía en función de características intrínsecas de esta reacción específica, la representación gráfica de los datos de señal de absorbancia frente a concentración de mAb es el primer paso a la hora de estudiar la función de calibrado. A partir de esta gráfica se evalúan los diferentes modelos matemáticos que pueden establecerse para definir la función de calibrado de los ELISAs. La aceptación del modelo final se basó en la evaluación del error relativo (ER, %) entre las concentraciones calculadas y las concentraciones reales de las muestras de calibración estándar. **En la presente Tesis Doctoral, para aceptar el modelo, el valor de ER debe ser menor del 10 %**, tal y como es recomendado en la validación de inmunoensayos [30]. Además, fue empleado el valor del **coeficiente de variación** (R^2) para evaluar el mejor ajuste de los datos experimentales al modelo matemático, que cumpla los criterios de aceptación, esto es, que su valor expresado **en porcentaje sea superior a un 90 %**.

Para estudiar la homogeneidad de varianzas se realizó el análisis gráfico de los residuos como sugieren Boqué y Rius [35]. Esto se llevó a cabo mediante la representación gráfica de los residuos frente a la concentración. Esta representación permite además detectar fácilmente la presencia de valores atípicos.

2.2.2. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

a. El **límite de detección** se define como la menor concentración o cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser detectada pero

Capítulo I

no necesariamente cuantificada como valor [33] [36]. El límite de detección fue obtenido mediante el empleo de la ecuación:

$$LD = S_c \times K = S_c \times 3$$

donde S_c es la desviación estándar de al menos 10 muestras blanco (muestras que solo contienen el tampón usado para preparar la solución estándar del mAb) y K es un factor numérico cuyo valor depende del nivel de confianza deseado; así, el límite de detección fue calculado como $3 \times S_c$ valor que supone un nivel de confianza del 99,86 %.

b. Por su parte, el **límite de cuantificación** es definido como la menor concentración de analito en una muestra que se puede determinar cuantitativamente con adecuada precisión y exactitud [33]. El límite de cuantificación fue obtenido mediante el empleo de la ecuación:

$$LC = S_c \times K = S_c \times 10$$

donde, y al igual que para el cálculo del límite de detección, S_c es la desviación estándar de al menos 10 muestras blanco y K es un factor numérico cuyo valor es 10, valor que supone un nivel de confianza del 99,86 %. Por tanto, el límite de cuantificación fue calculado como $10 \times S_c$.

2.2.3 Intervalo de cuantificación (IC) y de detección (ID)

El **intervalo de cuantificación** o intervalo de concentración de aplicabilidad del método, se define como el intervalo de concentración para el cual puede utilizarse satisfactoriamente un método de análisis [37], y que está comprendido entre los niveles inferior y superior (ambos inclusive) de concentración de analito para la cual se ha demostrado que el procedimiento analítico es adecuado por lo que respecta a su precisión, exactitud y función de calibrado, esto es, entre la mínima concentración de analito que puede ser cuantificada (límite de cuantificación) y la máxima concentración ensayada cuya señal analítica permita una adecuada determinación de la concentración.

Por su parte, el **intervalo de detección** del método es el intervalo de concentraciones definido por el límite de detección y el límite de cuantificación calculados.

2.2.4. Precisión

Definida como el grado de concordancia (o de dispersión) entre resultados de medidas obtenidas de tomas múltiples a partir de la misma muestra homogénea y en las condiciones establecidas. La precisión puede ser subdividida en precisión intra-día o intraensayo y precisión inter-día o interensayo [36] [38]. Se expresa generalmente de forma numérica mediante medidas de dispersión tales como la varianza, la desviación estándar o el coeficiente de variación de una serie de mediciones bajo las condiciones especificadas [33].

En este trabajo, la precisión fue evaluada en términos de **repetibilidad** (precisión intra-día), definida como - *la precisión de los resultados de una medición obtenidos con el mismo método y bajo las mismas condiciones (laboratorios, analistas, días, diferentes equipos de medida, etc.)* [38] -, y de **reproducibilidad** (precisión intermedia o inter-día) definida como - *la precisión de los resultados de una medición obtenidos con el mismo método, pero bajo condiciones diferentes (laboratorios, analistas, días, equipos de medida, etc.)* [38] -, en el intervalo de concentraciones establecido para el método, tal y como indica la ICH Q2 (R1) (Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology) [33].

La **precisión intra-día o repetibilidad** para una concentración dada, fue estimada mediante el análisis de al menos 10 disoluciones estándar del mAb en estudio, preparadas a la misma concentración, el mismo día y bajo las mismas condiciones experimentales. Este estudio se realizó para los límites superior e inferior y para el valor intermedio del intervalo de concentraciones de aplicabilidad del método.

La precisión **inter-día o reproducibilidad** fue estimada mediante el análisis de al menos nueve réplicas de la concentración ensayada, durante cuatro días diferentes y bajo las mismas condiciones experimentales. Este

Capítulo I

estudio, al igual que el estudio de repetibilidad, se realizó para los límites superior e inferior y para el valor intermedio del intervalo de concentraciones de aplicabilidad del método.

Ambos parámetros fueron estimados como la desviación estándar relativa expresada como porcentaje (DER, %) de las concentraciones calculadas a partir de las señales analíticas obtenidas (absorbancia) usando la curva de calibración seleccionada para el método ELISA en estudio.

Como criterio de aceptación en la validación de los métodos ELISA propuestos en la presente Tesis Doctoral se establece una DER (%) menor del 10 %, tanto para repetibilidad como reproducibilidad, tal y como es recomendado para los inmunoensayos [29] [30]. Valores de repetibilidad y reproducibilidad inferiores a 10 % dan por tanto lugar a la consideración de precisos de los métodos ELISA propuestos.

2.2.5. Exactitud/veracidad

La exactitud es el grado de concordancia entre el resultado de una medición (valor medio) y el valor de referencia aceptado (patrón de uso interno o patrón internacional) o aceptado como verdadero [36]. El concepto de exactitud no representa una magnitud y no se expresa numéricamente; se dice que una medida es más exacta cuanto menor es el error cometido en la medida [39].

Aunque no son iguales, en el ámbito farmacéutico también se suele usar el término “veracidad” de una medida por el de exactitud [33]. La “veracidad” no está definida para una única medida como la exactitud, sino para un número infinito de medidas: **la veracidad** es la proximidad entre la medida de un número infinito de valores medidos repetidos y un valor de referencia. Al igual que la exactitud, no es una magnitud y no puede expresarse numéricamente. No obstante, dicha proximidad puede ser evaluada mediante diferentes formas [40], entre ellas mediante el empleo del factor de recuperación, el más habitual en el ámbito analítico.

En la presente Tesis Doctoral, y dado que se enmarca también dentro del ámbito farmacéutico, se han empleado como sinónimos los términos exactitud y veracidad. Por tanto, en los métodos ELISA desarrollados se ha evaluado a partir del estudio de recuperación realizado en el intervalo de concentraciones de aplicabilidad del método [33], mediante el análisis de al menos 10 disoluciones de trabajo estándar del mAb en estudio. La evaluación de dicha exactitud fue realizada a concentraciones correspondientes a los límites superior e inferior y al valor intermedio del intervalo de concentraciones de aplicabilidad del método.

El estudio de recuperación consistió en la obtención del porcentaje de recuperación (R, %) de la concentración obtenida a partir de las disoluciones de trabajo estándar. **En la validación de los métodos ELISA propuestos en la presente Tesis Doctoral, se ha establecido como criterio de aceptación de un ELISA, un valor del coeficiente de variación (CV, %) del estudio de recuperación de ± 10 % para establecer el método como exacto.**

Destacar que, según los criterios indicados para la validación de métodos bioanalíticos, tanto para la precisión como para la exactitud se recomienda un coeficiente de variación (CV) ≤ 20 % [38]. Sin embargo, el límite que fijamos para los métodos ELISA desarrollados en la presente Tesis Doctoral es del 10 %, la mitad del valor recomendado y empleado usualmente. Por tanto, la precisión y veracidad de las medidas obtenidas mediante los métodos ELISA desarrollados en la presente Tesis Doctoral constituyen un valor añadido de los mismos.

2.2.6. Especificidad/Selectividad

Un criterio de calidad muy importante en cualquier método de análisis es su capacidad para dar señales libres de interferencias y, por tanto, dar lugar a resultados verdaderos [41]. La capacidad para discriminar entre el analito y los compuestos interferentes ha sido considerada desde siempre como la “selectividad” de un método de análisis. Una definición clásica de *selectividad* sería la capacidad de un método para determinar un analito concreto en una mezcla compleja sin interferencias de otros componentes

Capítulo I

de la mezcla [42]. Sin embargo, y principalmente en el ámbito farmacéutico, este mismo significado es el asignado al término **especificidad**, que queda definido en la ICH Q2 (R1) (Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology) [33] como la capacidad de un método de medir y diferenciar las sustancias de interés en presencia de componentes que pueda esperarse que estén presentes (ello puede incluir metabolitos, impurezas o componentes de la matriz), es decir, capacidad para originar resultados que dependan de forma exclusiva del analito (o analitos) para su identificación o cuantificación en la muestra [33] [36]. Dado que el ámbito de aplicación de los métodos de análisis desarrollados en esta Tesis es el farmacéutico, y sobre todo por el carácter de inmunoanálisis ELISA basado en una reacción “específica”, se ha optado por emplear el término especificidad de los métodos ELISA en lugar del de selectividad, que es el recomendado actualmente por la IUPAC [41].

Por tanto, y considerando el campo de aplicabilidad de los métodos ELISA propuestos en la presente Tesis Doctoral –determinación de los mAbs en medicamentos y/o preparaciones farmacéuticas-, la especificidad de los mismos fue evaluada únicamente mediante estudios de reacciones cruzadas entre los distintos mAbs investigados.

En cuanto al estudio de degradación acelerada que propone la ICH Q2 (R1) (Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology) [33] para evaluar la especificidad de los métodos de análisis que vayan a ser validados para que puedan ser empleados en estudios de estabilidad de medicamentos según indica la ICH Q1B (Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products) [43], se comentará en el apartado siguiente de “Estudios de degradación acelerada”.

▪ *Estudio de reacciones cruzadas*

El estudio de reacciones cruzadas fue realizado mediante el análisis de disoluciones estándar de trabajo de cada uno de los mAbs, usando los ELISAs desarrollados en la presente Tesis Doctoral no específicos para ellos. La concentración de las disoluciones estándar empleadas seleccionada de los mAbs fue la misma en todos los casos, con objeto de poder realizar una posterior comparación de los resultados obtenidos. Esta

concentración fue elegida teniendo en cuenta los datos previamente obtenidos en los ensayos ELISAs desarrollados y validados específicamente para cada uno de estos mAbs.

El criterio seleccionado para aceptar la no existencia de reacciones cruzadas con otros mAbs es cuando los valores de absorbancia obtenidos para los mAbs analizados como interferentes mediante el método ELISA específico desarrollado para un determinado mAb, son estadísticamente iguales a los valores que se obtendrían con un blanco, por lo que se puede afirmar que no se producen reacciones cruzadas con el mAb estudiado y que por tanto, el ELISA propuesto es específico para la cuantificación de un mAb concreto objeto de estudio y no de los otros fármacos biotecnológicos ensayados.

2.3. ESTUDIOS DE DEGRADACIÓN ACELERADA

Los estudios de degradación acelerada (también llamados estudios de degradación forzada o de estrés) juegan un papel central en el desarrollo de proteínas terapéuticas, por ejemplo, para la selección de nuevas moléculas, caracterización molecular, desarrollo de la formulación, desarrollo de ensayos y estudios de comparabilidad [44]. Así, y tal y como indica la ICH Q2 (R1) (Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology) [33], la realización de los estudios de degradación acelerada sobre un medicamento puede resultar muy útil, ya que permiten detectar la degradación sufrida por los mismos ante situaciones de estrés y ayudar a establecer las vías de degradación y la estabilidad intrínseca de la molécula, además de comprobar la idoneidad del método de análisis para ser empleado en presencia de los compuestos de degradación del medicamento o fármaco en cuestión.

Por tanto, en principio, serían dos las razones principales por las cuales se realizan los estudios de degradación acelerada:

- en primer lugar para analizar la especificidad de los métodos ELISA desarrollados tal y como indica la guía ICH Q1B (Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products) [43].

Capítulo I

- en segundo lugar, estos estudios de degradación acelerada deben efectuarse para encontrar o adquirir más conocimientos sobre los factores externos que pueden influir en la degradación de los medicamentos.

Con respecto a la primera razón, la guía ICH Q2 (R1) (Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology) [33] indica que el estudio de estrés debe demostrar la capacidad del método propuesto para realizar el análisis de los componentes de interés en presencia de sus productos de degradación. Sin embargo, tal y como quedará expuesto y demostrado en los capítulos siguientes, en el caso particular de los métodos ELISA, sólo en el caso que los productos de degradación no mantengan la actividad biológica (hecho que se desconoce), el método será específico, ya que ésta será cuantificada en presencia de productos de degradación sin un paso previo de separación o ninguna otra estrategia que ayude a distinguir entre la actividad biológica del mAb intacto y la actividad biológica que podrían retener los productos de degradación.

Por tanto, en la presente Tesis Doctoral se han llevado a cabo los estudios de degradación acelerada sólo para obtener conocimiento e información sobre los medicamentos, y no para validar los métodos como específicos o no, ya que no existen alternativas para evaluar la actividad biológica en ausencia de los productos de degradación en los ELISA (no son métodos separativos, como por ejemplo los cromatográficos). La especificidad ha sido evaluada mediante el criterio anteriormente indicado, basado en las reacciones cruzadas entre los mAbs.

Así pues, los estudios de degradación forzada fueron realizados directamente sobre los MB. Antes de su análisis, las muestras de MB fueron diluidas en tampón carbonato 0,1 M pH 9,6 a la concentración adecuada (concentración alrededor de la mitad del intervalo de concentraciones estudiado, para minimizar los errores en los valores de absorbancia). La actividad biológica de las muestras sometidas a estrés fue cuantificada mediante el método ELISA correspondiente.

Las condiciones de estrés o de degradación acelerada investigadas fueron las recomendadas en la ICH Q5C (Quality of biotechnological products: Stability testing of biotechnological/biological products) [45] y que son:

2.3.1. Exposición a temperatura

Durante su producción, envío, almacenamiento y/o administración final, las proteínas terapéuticas pueden estar expuestas a temperaturas más altas que la temperatura recomendada para su almacenamiento, lo cual podría dar lugar a cambios significativos tanto físicos como químicos y biológicos de la misma. Al aumentar la temperatura, las proteínas pueden sufrir un cambio conformacional como el despliegue o desdoblamiento parcial. Estos cambios pueden posteriormente conducir a otras reacciones de degradación, incluida la agregación [44]. Para la mayoría de las proteínas el despliegue térmico es irreversible porque suele ir acompañado o seguido de agregación, así, por ejemplo, para la IgG se ha demostrado que el fragmento Fab y Fc se desnaturalizan de forma irreversible e independientemente a 63-71°C y 73-82°C, respectivamente. [46-48]. En algunos casos, este tipo de estudio se ha utilizado para predecir la estabilidad de formulaciones líquidas en condiciones de almacenamiento anticipado y en muchos casos para intentar predecir la vida útil de las formulaciones de péptidos y proteínas basadas en la extrapolación de los datos de estabilidad a partir de las condiciones de almacenamiento en tiempo real, ya que esto ayudaría a acelerar el desarrollo de productos y evitar esperas para obtener datos en tiempo real / temperatura real [44].

Por todo ello, la exposición de las proteínas terapéuticas a elevadas temperaturas es uno de los métodos de estrés más extendidos y aplicados para degradar las mismas y obtener información sobre su estabilidad.

En la presente Tesis Doctoral, los efectos de la alta temperatura fueron evaluados para determinar su influencia sobre la actividad biológica de los diferentes mAbs estudiados. El ensayo se llevó a cabo mediante la incubación de alícuotas individuales de cada MB en la estufa de incubación a temperatura de 50 y 70°C durante 24 horas. Posteriormente cada alícuota de MB representante de cada mAb estudiado, fue diluida con tampón carbonato 0,1 M pH 9,6 y analizada mediante el método ELISA específico desarrollado durante esta Tesis Doctoral para cada mAb.

Capítulo I

2.3.2. Exposición a la luz visible

Tal y como indica la ICH Q1B (Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products) [43], las características intrínsecas de fotoestabilidad de un medicamento deben ser evaluadas para demostrar que, según el caso, la exposición a la luz no da lugar a cambios inaceptables en dicho medicamento [43]. Las reacciones de degradación inducidas por la luz dependen de la estructura y conformación de las proteínas, la composición de la formulación y el embalaje primario, así como de la longitud de onda, la intensidad y la duración de la exposición a la luz. La fotodegradación conduce principalmente a cambios en los aminoácidos individuales, pero también conduce a múltiples reacciones cruzadas debidas a la formación de ditirosina o de disulfuro y a la formación de agregaciones no covalentes [44].

Son varios los test que se presentan como adecuados para llevar a cabo este tipo de estudios, así, es posible realizar los ensayos exponiendo el fármaco directamente a la acción de la luz, o bien exponiendo el medicamento fuera de su envase final, dentro de su envase primario o incluso en su envase secundario, es decir, tal y como es comercializado. El fármaco puede ser sometido a este tipo de degradación forzada solo o en suspensión y en recipientes químicamente inertes y transparentes [43].

En la presente Tesis Doctoral, los mAbs objeto de estudio han sido expuestos a la luz con la finalidad de detectar cambios en su funcionalidad, probablemente debidos a la aparición de impurezas o agregados [49], ya que mediante los métodos ELISA aquí desarrollados y validados no puede ser detectada y/o cuantificada la presencia de los mismos, pero sí la disminución de la funcionalidad a través de la pérdida de actividad biológica representada por la unión Ag/mAb.

Por tanto, para llevar a cabo el estudio, los efectos de la luz fueron investigados sometiendo los MB a un análisis de estrés acelerado en una cámara de envejecimiento, en la cual cada muestra fue expuesta a luz solar simulada. Las muestras fueron irradiadas con luz mediante el empleo de una lámpara de xenón usando un filtro UV S208/S408. La temperatura fue controlada y mantenida a 24°C (considerada como

temperatura del laboratorio). La irradiación fue de 250 W/m² entre 300-800 nm. Se siguió el protocolo indicado en la ICH Q1B (Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products) [43].



Figura 1.7. Cámara de envejecimiento. Fuente: elaboración propia.

2.3.3. Fuerza iónica del medio

Durante las etapas de manejo y almacenamiento de las proteínas terapéuticas antes de su administración, así como durante su dosificación y aplicación, éstas pueden estar expuestas a fuerza iónica que puede provocar degradaciones de las mismas, haciendo que sus condiciones difieran de la formulación inicial. Esto determina la importancia de estudiar la compatibilidad de la proteína terapéutica con diferentes disoluciones. Por ello, la exposición a condiciones extremas de formulación con respecto a fuerza iónica es considerada como un método para determinar la robustez de una proteína terapéutica en cuanto a su estabilidad química [44].

En este trabajo, la respuesta en cuanto a funcionalidad del MB ante una fuerza iónica, fue establecida mediante la exposición del mismo a una disolución de NaCl 1,5 M durante 24 h.

2.3.4. Exposición a medio ácido y básico

Al igual que en el caso anterior, las proteínas terapéuticas pueden verse sometidas a lo largo del proceso de producción, almacenaje y manipulación a pH extremos que pueden dar lugar principalmente a procesos de su desamidación. De ahí, que la exposición de las mismas a un pH extremo (ácido o básico) sea de gran interés a la hora de estudiar su estabilidad química y la susceptibilidad a desamidación que presentan [44].

En la presente Tesis Doctoral para llevar a cabo la exposición del MB a un medio ácido o básico fueron empleados el HCl 0,1 M como medio ácido y el NaOH 0,1 M como medio básico. Ambos fueron adicionados en una concentración del 10 % (v/v) (50 µl de ácido o base + 0,5 ml de la disolución del MB).

2.3.5. Exposición a medio oxidante

El estudio de la oxidación de proteínas es muy relevante en el desarrollo de la formulación, ya que los productos de oxidación pueden mostrar una bioactividad y conformación alteradas. La oxidación de la proteína puede ser causada por los peróxidos presentes como impurezas en excipientes (p. ej., polisorbatos), iones metálicos de superficies de acero inoxidable o presentes como impurezas en excipientes y residuos de agentes asépticos (p.ej., utilizado en aisladores). La oxidación también puede ser causada por acción de la luz [44].

El estrés por oxidación suele utilizarse para crear productos de degradación, por ejemplo, para el desarrollo del ensayo o para elucidar vías de degradación y cinéticas. La guía ICH general Q1A (R2) (Stability Testing of New Drug Substances and Products) [50] recomienda la evaluación de la susceptibilidad de una sustancia hacia la oxidación, pero sin especificar las condiciones [50]. Hay algunos residuos de aminoácidos que son particularmente sensibles a la oxidación como los residuos de histidina, metionina y tirosina entre otros. Las reacciones de oxidación pueden ser no específicas, como el caso de la fotooxidación y la oxidación de radicales libres o especies reactivas de oxígeno. Pero la oxidación

también implica especies de oxígeno reactivo, que ocurre principalmente cuando ciertos iones metálicos se unen a sitios específicos en la proteína.

Uno de los agentes de oxidación más comúnmente empleados para llevar a cabo este tipo de estudios de degradación acelerada es el H_2O_2 . Tanto la concentración, como el pH de la disolución de H_2O_2 empleada, como la temperatura usada durante la incubación con el mismo, influirán en el grado de degradación de la proteína [44].

En la presente Tesis Doctoral se llevó a cabo la exposición del MB a una disolución de H_2O_2 preparada a dos concentraciones distintas, 1 % (condiciones oxidativas suaves) y 10 % (condiciones oxidativas fuertes) e incubada durante 24 horas a temperatura ambiente y oscuridad, con objeto de evaluar la pérdida de actividad biológica sufrida por los MB.

La concentración del agente estresante fue 10 % (v/v) (50 μ l de agente estresante fueron adicionados a 0,5 ml de solución de mAb) tanto para las condiciones oxidativas suaves como para las fuertes. Las muestras fueron analizadas 24 horas después de adicionar el agente estresante.

3. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DE LOS MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS

La mayoría de estudios de estabilidad desarrollados por la industria farmacéutica son diseñados solamente para cumplir los requisitos exigidos para obtener la autorización de comercialización. Sin embargo, las necesidades clínicas difieren mucho de las requeridas para obtener dicha autorización. La estabilidad de los MB una vez reconstituidos suele estar limitada a 24 horas solo por razones bacteriológicas o porque se realizaron los test durante periodos muy cortos de tiempo o bajo condiciones de uso no prácticas, sin embargo, la estabilidad de estos MB puede ser mucho más duradera.

Durante la manipulación de los MB, estos pueden sufrir degradaciones más o menos complejas, de ahí la importancia de llevar a cabo estudios de estabilidad en condiciones habituales de uso y durante periodos más

Capítulo I

prolongados de tiempo [51]. La realización de estudios de estabilidad adecuadamente diseñados siguiendo, básicamente, las directrices de las Farmacopeas española y europea [52] [53] y las guías ICH Q1A (R2) (Stability Testing of New Drug Substances and Products) [50]; Q1B (Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products) [43]; Q1C (Stability Testing: Requirements for New Dosage Forms) [54]; Q1D (Bracketing and Matrixing designs for Stability Testing of Drug Substances and Drug Products) [54] y Q1E (Evaluation of Stability Data) [56], puede permitir conocer y aplicar datos de estabilidad físico-química y biológica superior a la establecida por la industria farmacéutica y con una mayor capacidad de adaptación a la práctica asistencial diaria.

Los métodos ELISA desarrollados en la presente Tesis Doctoral fueron empleados en estudios de estabilidad en el tiempo de los mAbs IFX, BVZ, CTX y TTZ en su forma farmacéutica una vez abierto el vial, para evaluar su actividad biológica, aspecto fundamental para estimar la reutilización de sobrantes a nivel hospitalario.

Para realizar los estudios fueron usados varios viales de cada MB. Una vez que los viales eran abiertos y/o reconstituidos, las disoluciones de los MB fueron conservadas en el mismo vial, protegidas de la luz y refrigeradas a 4°C.

Además, varias alícuotas de los medicamentos fueron conservadas en viales topacio protegidas de la luz a -20°C y -80°C.

La planificación de los estudios se llevó a cabo teniendo en cuenta el plazo de validez indicado por el fabricante una vez abiertos los viales (24 horas). Este hecho supone que la realización de los ensayos durante los primeros días de conservación de los MB sea crucial. De tal manera, se establecieron como días control para todos los MB los días 0, 1 y 2 (D0, D1 y D2). En función de los resultados de actividad biológica obtenidos el segundo día control, los ensayos continuarían haciéndose durante los siguientes días, eligiendo estos en función de los resultados obtenidos. El término de los estudios de estabilidad quedó establecido cuando la

actividad biológica presentada por el fármaco era igual o superior al 50 % de su actividad inicial.

La actividad biológica fue expresada como porcentaje de la actividad biológica remanente en comparación con la actividad biológica inicial del mAb, siendo la actividad biológica inicial la obtenida del análisis realizado el mismo día en que es abierto el vial que contiene el MB (día 0) y siempre dentro del periodo de caducidad indicado por el fabricante. En todos los casos, la actividad biológica remanente fue determinada a partir de los resultados obtenidos de al menos tres réplicas.

Las señales analíticas obtenidas para cada uno de los días de control fueron expresadas como concentración, calculada teniendo en cuenta la disolución de control.

Para el cálculo de la actividad biológica remanente (%) se empleó la expresión:

$$\text{Concentración día control} \times 100 \div \text{Concentración día 0} = \text{Actividad remanente (\%)}$$

A partir del cálculo anterior se obtuvo fácilmente el dato de pérdida de actividad mediante la ecuación:

$$100 - \text{Actividad remanente (\%)} = \text{Disminución de actividad (\%)}$$

Finalmente, los datos de actividad remanente (%) fueron representados gráficamente para las diferentes condiciones de conservación ensayadas.

A pesar de que en la práctica clínica se recomienda establecer los límites de estabilidad para cada medicamento tras considerar su índice terapéutico, uso clínico, seguridad, potencia y variabilidad farmacodinámica/farmacocinética y la dosis acumulativa total, la regla general para considerar un medicamento como estable en la práctica clínica, es que conserve un 90 % de su actividad biológica inicial, considerando el 10 % restante de degradación sufrida, como el límite de estabilidad en la gran mayoría de estudios de estabilidad publicados [51].

Capítulo I

Sin embargo, dependiendo del medicamento, y especialmente en el caso de MB anticancerosos, este límite podría llevar a considerar aceptable o inaceptable la pérdida de eficacia de dicho medicamento, ya que este 10 % puede suponer una degradación del producto que puede estar desencadenada por la aparición de productos que pueden ser tóxicos, inertes o activos, haciendo que en este caso ese 10 % de degradación no pueda llevar a considerar el MB como estable. De ahí, que el grupo de Consenso Europeo reunido en Francia en mayo del 2010 [51], indique que este límite de estabilidad pueda ser considerado también como un 95 % o un 85 %, dependiendo del medicamento. Así, recomiendan que para los medicamentos anticancerosos con bajo índice terapéutico el límite de estabilidad no sea inferior al 95 % [51].

Dado que es el límite de estabilidad usado de forma habitual en los estudios de estabilidad práctica, el criterio para indicar como estable un MB en función de su actividad biológica, en esta Tesis Doctoral, fue considerado el límite de +/-10 % para todas las condiciones ensayadas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Agencia Europea de Medicamentos (EMA). Ficha técnica de Remicade[®] (Infliximab). <http://www.ema.europa.eu>
- [2] Agencia Europea de Medicamentos (EMA). Ficha técnica de Avastin[®] (Bevacizumab). <http://www.ema.europa.eu>
- [3] Agencia Europea de Medicamentos (EMA). Ficha técnica de Erbitux[®] (Cetuximab). <http://www.ema.europa.eu>
- [4] Agencia Europea de Medicamentos (EMA). Ficha técnica de Herceptin[®] (Trastuzumab). <http://www.ema.europa.eu>
- [5] Agencia Europea de Medicamentos (EMA). Ficha técnica de Mabthera[®] (Rituximab). <http://www.ema.europa.eu>
- [6] Wajanarogana S. *et al.* Efficacy of indirect ELISA for serodiagnosis of melioidosis using immunodominant antigens from non-pathogenic *Burkholderia thailandensis*. *Springerplus*. 2016 Oct 19;5(1):1814.
- [7] Pan P. *et al.* Nontoxic virus nanofibers improve the detection sensitivity for the anti-p53 antibody, a biomarker in cancer patients. *Nano Res*. 2015 Nov; 8(11):3562-3570.
- [8] Cardinali B. *et al.* Trastuzumab quantification in serum: a new, rapid, robust ELISA assay based on a mimetic peptide that specifically recognizes trastuzumab. *Anal Bioanal Chem*. DOI 10.1007/s00216-014-7842-4 may 2014.
- [9] Human VEGF-A ELISA Kit. Diaclone SAS. 2013.
- [10] Yang Zhang, M.S. *et al.* Stability of Stock and Diluted Rituximab. *Am J Health Syst Pharm*. 2013 March 1; 70(5): 436–438.
- [11] Werth S. *et al.* Rapid enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against human neutrophil antigens -1a, -1b, and -1c. *Transfusion*. 2013 Jan; 53(1):193-201.
- [12] Alvydas Mikulskis *et al.* Solution ELISA as a platform of choice for development of robust, drug tolerant immunogenicity assays in support of drug development. *Journal of Immunological Methods* 365 (2011) 38–49.
- [13] Ma L.N. *et al.* An overview on ELISA techniques for FMD. *Virol J*. 2011 Sep 4; 8:419.

Capítulo I

[14] Chowdhury F. *et al.* Development, validation and application of ELISAs for pharmacokinetic and HACA assessment of a chimeric anti-CD40 monoclonal antibody in human serum. *Journal of Immunological Methods* 363 (2010) 1–8.

[15] Hampson G. *et al.* Validation of an ELISA for the determination of rituximab pharmacokinetics in clinical trials subjects. *Journal of Immunological Methods* 360 (2010) 30–38.

[16] Hantash J. *et al.* The development, optimization and validation of an ELISA bioanalytical method for the determination of Cetuximab in human serum. *Anal. Methods*, 2009, 1, 144–148.

[17] Nicolas Ce'ze', M.D. *et al.* An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Therapeutic Drug Monitoring of Cetuximab. *Ther Drug Monit* 2009; 31:597–601.

[18] Connie Luk *et al.* Development of a sensitive ELISA for quantification of three- and four-repeat tau isoforms in tauopathies. *Journal of Neuroscience Methods* 180 (2009) 34–42.

[19] Damen C. W.N. *et al.* Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of trastuzumab in human serum and plasma. *Analytical Biochemistry* 391 (2009) 114–120.

[20] Krohne T. U. *et al.* Intraocular Pharmacokinetics of Bevacizumab After a Single Intravitreal Injection in Humans. *American Journal of Ophthalmology*. October 2008. Vol. 146, N° 4. 508-512.

[21] Karnaukhova E. *et al.* Development and evaluation of an ELISA for quantification of human alpha-1-proteinase inhibitor in complex biological mixtures. *Biologicals* 35 (2007) 285e295.

[22] Blasco H. *et al.* Evaluation of a peptide ELISA for the detection of rituximab in serum. *Journal of Immunological Methods* 325 (2007) 127–139.

[23] Ternant D. *et al.* An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Therapeutic Drug Monitoring of Infliximab. *Ther Drug Monit* 2006; 28:169–174.

[24] Chad A. Ray *et al.* Development, validation, and implementation of a multiplex immunoassay for the simultaneous determination of five cytokines in human serum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 36 (2005) 1037–1044.

[25] Maple L. *et al.* Protocol. Development and validation of ELISA for Herceptin detection in human serum. *Journal of Immunological Methods* 295 (2004) 169– 182.

- [26] Benbrook D. M. An ELISA method for detection of human antibodies to an immunotoxin. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 47 (2002) 169–175.
- [27] Rolando Ochoa *et al.* Validación de un ELISA para la cuantificación de antitoxina tetánica en suero humano. *Vaccimonitor*, vol. 9, núm. 4, octubre-diciembre, 2000, pp. 16-21.
- [28] Steinitz M. and Baraz L. A rapid method for estimating the binding of ligands to ELISA microwells. *Journal of Immunological Methods* 238 (2000) 143–150.
- [29] Lipton C.R. *et al.* Guidelines for the validation and use of immunoassays for determination of introduced proteins in biotechnology enhanced crops and derived food ingredients, Food Agric. *Immunol.* 12 (2000) 153-164.
- [30] Findlay J.W.A. *et al.* Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *J Pharm. Biomed. Anal.* 21 (2000) 1249-1273.
- [31] De Silva B. *et al.* Recommendations for the Bioanalytical Method Validation of Ligand-binding Assays to Support Pharmacokinetic Assessments of Macromolecules, *Pharmaceut. Res.* 20 (2003) 1885-1900.
- [32] ICH Q6B. Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products.
- [33] ICH Q2 (R1). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.
- [34] SKOOG/WEST/HOLLER. Química Analítica. 6ª Edición. McGraw-Hill.
- [35] Boqué R. y Rius F. X. “Avances en Quimiometría Práctica”, Servicio de Publicaciones e Intercambio científico de la Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela (1994).
- [36] Valcárcel M. Principios de Química Analítica. Springer-Verlag Ibérica.
- [37] Duffau B. *et al.* Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos generales sobre la validación de métodos”. Edición Año 2010. Santiago de Chile. Diciembre de 2010.
- [38] Ministerio de Sanidad y Consumo. Buenas prácticas de laboratorio en el análisis de niveles de fármacos y sus metabolitos en especímenes biológicos. Documento N° 5. 1ª Versión. Noviembre 2001. Agencia Española del Medicamento.

Capítulo I

- [39] Luis C. R. *et al.* Glosario de términos analíticos. 1ª Edición. Revisión 1.0. 2013.
- [40] UNE 82009-4:1998 (ISO 5725-4:1994).
- [41] Vessman J. *et al.* Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001) *Pure Appl. Chem.*, Vol. 73, No. 8, pp. 1381–1386, 2001.
- [42] WELAC Guidance Document No. WG D2 1st ed., EURACHEM/WELAC Chemistry, Teddington (1993).
- [43] ICH Q1B. Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products.
- [44] Hawe A. *et al.* Reviews. Forced Degradation of Therapeutic Proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 101, N^o. 3, March 2012.
- [45] ICH Q5C. Quality of biotechnological products: Stability testing of biotechnological/biological products.
- [46] Vermeer A.W. and Norde W. 2000. The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein. *Biophys J* 78 (1):394–404 (2000).
- [47] Ionescu R.M. *et al.* Contribution of variable domains to the stability of humanized IgG1 monoclonal antibodies. *J Pharm Sci* 97(4):1414–1426 (2008).
- [48] Vermeer A.W *et al.* The unfolding/denaturation of immunoglobulin of isotype 2b and its F(ab) and F(c) fragments. *Biophys J* 79(4):2150–2154 (2000).
- [49] Hernández-Jiménez J. *et al.* The Effects of Light-Accelerated Degradation on the Aggregation of Marketed Therapeutic Monoclonal Antibodies Evaluated by Size-Exclusion Chromatography With Diode Array Detection. *J Pharm Sci.* 2016 Apr;105 (4):1405-18.
- [50] ICH Q1A (R2). Stability Testing of New Drug Substances and Products.
- [51] Bardin C. *et al.* Guidelines for the practical stability studies of anticancer drug: A European consensus conference. *Annales Pharmaceutiques Françaises* (2011) 69, 221-231.
- [52] Real Farmacopea Española. 5ª edición. Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios. 2015.

[53] Farmacopea Europea. 9ª edición. EDQM (Dirección Europea de la Calidad de los Medicamentos y Cuidado de la Salud). 2017.

[54] ICH Q1C. Stability Testing: Requirements for New Dosage Forms.

[55] ICH Q1D. Bracketing and Matrixing designs for Stability Testing of Drug Substances and Drug Products.

[56] ICH Q1E. Evaluation of Stability Data.



CAPÍTULO II

DETERMINACIÓN DE LA
ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE
INFLIXIMAB (REMICADE®)
MEDIANTE ELISA DIRECTO

Infliximab (Remicade[®]), aprobado en la UE en 1999, es un mAb IgG1 humano-murino quimérico producido en células de hibridoma murino mediante tecnología de ADN recombinante, que se une con alta afinidad tanto a la forma soluble como a la de transmembrana del TNF- α pero no a la linfotoxina α (TNF- β). Está indicado en el tratamiento de la artritis reumatoide (AR) en combinación con metrotexato (MTX), enfermedad de Crohn (EC) en adultos y pediatría, colitis ulcerosa (CU) en pacientes adultos, niños y adolescentes entre 6-17 años, espondilitis anquilosante (EA), artritis psoriásica (APs) y psoriasis (Ps). Es administrado de forma hospitalaria mediante perfusión intravenosa [1]. Recientemente está siendo investigado su uso intravítreo para el tratamiento de diversas patologías oculares.

Dada la reciente comercialización de biosimilares de Remicade[®] como Remsima[®] de Celltrion Healthcare Hungary Kft., cuya autorización de comercialización fue concedida por la EMA en septiembre de 2013 o Inflectra[™] de Hospira UK Limited, aprobado por la Comisión Europea (CE) también en septiembre de 2013 y disponible en 24 países europeos incluido España, en la presente Tesis Doctoral IFX hace referencia al MB Remicade[®] y no a ninguna de las nuevas formulaciones biosimilares del mAb.

1. DETERMINACIÓN DE INFLIXIMAB EN ESTUDIOS CLÍNICOS/FARMACÉUTICOS. TÉCNICAS ANALÍTICAS COMUNMENTE EMPLEADAS.

Son muchos los artículos publicados en relación con investigaciones clínicas basadas en el uso de IFX, estando gran parte de ellas dirigidas a la determinación de la eficacia, seguridad y efectos adversos derivados del uso de este mAb. La bibliografía consultada también muestra un apreciable número de ensayos cuya finalidad es evaluar la

Capítulo II

farmacocinética de este mAb [2] [3], así como la dosis y la frecuencia de la misma en el tratamiento de mantenimiento con IFX [4] y la comparación de este mAb con otros MB anti-TNF- α . [5] [6]. La seguridad, eficacia y efectos adversos derivados de su reciente uso intravítreo es otro de los aspectos más comúnmente evaluados [7] [8], así como el desarrollo de nuevas formulaciones [9]. Sin embargo, la gran mayoría de los trabajos se centran en la determinación de los niveles séricos de IFX y de los Ab anti-IFX (ATI) generados como resistencias por algunos pacientes que reciben tratamiento con el mismo [10] [11], ya que la monitorización de los niveles séricos de mAb es muy importante para la optimización de este tipo de terapia, para conocer el mecanismo por el cual aparecen respuestas incrementadas y la minimización de efectos adversos [12-14].

De entre todos los métodos empleados para llevar a cabo este tipo de análisis, el que es usado con mayor frecuencia es el inmunoensayo tipo ELISA en diferentes formatos, tanto para detectar IFX como ATIs en muestras de suero [15-22] y confirmar, detectar y monitorizar efectos adversos asociados al uso del mismo, como un mayor riesgo de aparición de tuberculosis activa [23]. Así, por ejemplo, para llevar a cabo la monitorización terapéutica de IFX, D. Ternant *et al.* [24] desarrollaron un ensayo ELISA midiendo las concentraciones séricas de IFX en pacientes tratados con el mismo. Las placas de microtitulación se sensibilizaron con TNF- α y se saturaron con PBS que contenía albúmina de suero bovino al 1 % (BSA). Se añadieron muestras diluidas a 1:100 en PBS-1 % de BSA y se detectó IFX unido, utilizando IgG de cabra conjugada con peroxidasa, específica para el fragmento Fc (HRP-anti hIgG) [24].

Otras de las técnicas inmunológicas más empleadas para el estudio de IFX son los inmunoensayos tipo RIA [21] [25] [26], el ensayo de cambio de movilidad homogéneo (HMSA) [27] [28] y el ensayo de gen “reporter” basado en células funcionales (RGA). En la mayor parte de estos ensayos, los autores realizan un estudio comparativo entre los resultados obtenidos mediante estas técnicas analíticas y los obtenidos mediante ELISA. Para la realización de este último suelen emplear kits ELISA comercializados para la determinación sérica de IFX [29] [27] o bien ELISAs en los que las muestras empleadas son suero del paciente que ha recibido el mAb.

Así, por ejemplo, Shui-Long Wang *et al.* [29] desarrollaron en 2012 un método de HMSA para medir ATI e IFX en muestras de suero. Los resultados fueron comparados con los obtenidos mediante un método ELISA de doble Ag en el que las placas eran sensibilizadas con IFX para capturar los ATI procedentes de muestras de suero de los pacientes. La captura de los ATI era detectada mediante el uso de IFX biotinilado y el uso del conjugado neutravidina-HRP y el sustrato OPD. La lectura era realizada a 490 nm. Se usó un Ab policlonal de conejo purificado IgG F(ab')₂ para generar la función de calibrado y calcular la cantidad relativa de ATI en la muestra de suero del paciente [29].

Son varios los autores que evalúan y comparan la eficacia de estas técnicas analíticas (RIA, ELISA, HMSA, RGA y EIA) entre sí en relación con el uso de IFX [30] [31]. Los cuatro ensayos no difieren mucho entre sí y dan lugar a resultados clínicos comparables [30]. También es frecuente en bibliografía la comparación entre los kits comercialmente disponibles y aprobados por la Administración de Bienes Terapéuticos (TGA) destinados a medir en muestras de suero los niveles de IFX para su monitorización, cuyos estudios de verificación o comparación entre ellos son limitados [32]. También ha sido comparado el rendimiento de diferentes tipos de ELISA para la predicción de la respuesta clínica y evaluar la importancia clínica de la ATI positiva en presencia de niveles detectables de IFX en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII) tratados con este mAb [33].

Recientemente se están desarrollando también nuevos métodos de análisis de IFX para llevar a cabo la monitorización y determinación de los niveles séricos del mismo, como el ensayo basado en el flujo lateral rápido (LF) desarrollado por Corstjens *et al.* [34] y un método LC-MS/MS, desarrollado y validado por Xiaoyun Peng *et al.* [35].

De tal manera, la literatura publicada en base a estudios relacionados con IFX, muestra que en efecto ELISA es la técnica analítica de elección para llevar a cabo la determinación clínica de este mAb. Sin embargo, los métodos descritos en bibliografía se basan en el uso de muestras de suero de pacientes que reciben tratamiento con el mismo y el uso de kits ELISA

Capítulo II

comercialmente disponibles en los que las muestras empleadas también han de ser muestras de suero de estos pacientes. Así, hasta el momento, no se ha encontrado descrito en literatura ningún ELISA desarrollado y validado con el fin específico de la determinación cuantitativa de IFX teniendo en cuenta que es el principio activo de un medicamento. Por tanto, el ELISA descrito a continuación no emplea muestras de pacientes tratados con IFX, sino que se basa en el empleo de placas sensibilizadas con el propio mAb a partir del medicamento que es empleado como material estándar -dada la imposibilidad de adquisición del mismo.

2. OBJETIVO

El frecuente empleo del FBIO IFX como tratamiento de numerosas patologías y su elevado coste, hace que sea uno de los mAb que contribuye de forma importante al actual elevado gasto sanitario. Este medicamento se administra según características de peso del paciente, por lo que una vez abierto un vial y reconstituido el liofilizado con agua para inyectables, son importantes los sobrantes diarios del mismo en las unidades de farmacia de los hospitales donde se administra. Por otra parte, dado que las indicaciones del fabricante recomiendan desechar la fracción sobrante de cada vial una vez pasadas 24 horas tras su apertura y reconstitución, estos sobrantes no son en principio reutilizables. Este hecho hace necesario el desarrollo de metodologías que permitan dilucidar si realmente la estabilidad de IFX una vez reconstituido es de 24 horas, o si, adecuadamente almacenado en condiciones de uso hospitalario (manteniendo las condiciones asépticas) podría ser reutilizado con total seguridad para el paciente, lo cual además supondría un importante ahorro en la factura del gasto farmacéutico hospitalario.

Dada la naturaleza proteica de IFX así como su mecanismo de acción, de entre los diferentes aspectos que tienen que ser evaluados para determinar la estabilidad global del MB, este Capítulo I tiene como objetivo la puesta a punto y validación de un ELISA que permita la determinación cuantitativa del principio activo IFX de forma sencilla, rápida y eficaz.

3. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ELISA

La puesta a punto del método ELISA para la determinación cuantitativa del mAb IFX, implica en primer lugar la selección y optimización de las variables que afectan al desarrollo de dicho método y que son las que se exponen a continuación.

3.1. *Selección de la modalidad ELISA*

Entre las diferentes modalidades existentes para llevar a cabo un ELISA, en el presente trabajo de investigación se optó por desarrollar un **ELISA directo no competitivo**. Esto es debido a que IFX es un mAb, por tanto su naturaleza proteica hace posible sensibilizar la placa de microtitulación sin necesidad de usar otro tipo de Ab primarios. Además, en principio, en la muestra en la cual va a ser aplicado el método propuesto –medicamento reconstituido-, sólo va a estar presente IFX como compuesto proteico, por lo que no es necesaria una etapa de aislamiento.

3.2. *Selección de las placas de microtitulación*

Las placas de microtitulación empleadas para el desarrollo del método ELISA directo no competitivo fueron **placas de microtitulación de 96 pocillos, de fondo plano y sin tapa**, obtenidas a través de la casa comercial eLAB, ya que para el desarrollo de este inmunoensayo daban lugar a señales analíticas adecuadas.

3.3. *Selección del anticuerpo secundario (conjugado)*

Debido a que IFX es un mAb quimérico constituido por un 75 % humano y un 25 % murino, fueron seleccionados como conjugados para llevar a cabo la reacción Ag-Ab, un Ab secundario IgG antihumano y un Ab secundario IgG antiratón, ambos marcados con peroxidasa. Estos dos conjugados son ampliamente usados en la bibliografía consultada.

Capítulo II

El método ELISA fue llevado a cabo sensibilizando la placa de microtitulación con IFX, diluido a una concentración que fue variada en función de las señales analíticas obtenidas y haciendo reaccionar éste de forma separada e independiente con ambos conjugados.

Los datos de lectura de absorbancia obtenidos para ambos ensayos, demostraron que la sensibilidad era mayor cuando era usado el IgG antihumano que cuando se usa el IgG antiratón, ya que para que se produzca señal analítica debida a este segundo Ab conjugado– el IgG antiratón-, es necesario el uso de concentraciones de IFX más elevadas, del orden de $\mu\text{g/ml}$, mientras que en el caso del IgG antihumano, las concentraciones mínimas necesarias de IFX para obtener señal analítica, son del orden de ng/ml . Los datos obtenidos para una de las concentraciones ensayadas para ambos conjugados se muestran en la tabla 2.1.

Por tanto, y debido a la mayor sensibilidad mostrada en este ensayo, se seleccionó como conjugado el Ab IgG antihumano marcado con peroxidasa.

Tabla 2.1. Absorbancia obtenida para una misma concentración de IgG antihumano e IgG antirratón marcados con peroxidasa frente a varias concentraciones de IFX en la placa ELISA.

IgG ANTIHUMANO 5 µg/ml		IgG ANTIRATÓN 5 µg/ml	
Concentración IFX (ng/ml)	Absorbancia	Concentración IFX (µg/ml)	Absorbancia
500	1,346	150	0,217
500	1,462	150	0,213
500	1,332	150	0,214
400	1,121	100	0,203
400	1,120	100	0,218
400	1,069	100	0,215
200	0,605	75	0,207
200	0,618	75	0,204
200	0,581	75	0,208
70	0,294	50	0,218
70	0,297	50	0,213
70	0,289	50	0,203
30	0,156	5	0,139
30	0,147	5	0,138
30	0,131	5	0,130
10	0,072	0,5	0,035
10	0,065	0,5	0,035
10	0,075	0,5	0,035
5	0,053	-----	
5	0,055		
5	0,051		
1	0,044		
1	0,053		

3.4. Selección de la concentración óptima de conjugado

El objetivo de este estudio es seleccionar una concentración del conjugado que asegure la detección de IFX a los niveles de concentración más altos. Para ello, fueron realizados varios ensayos utilizando diferentes concentraciones del mismo y empleando la placa sensibilizada saturada con IFX. Concretamente se estudiaron las concentraciones de 50, 5, 0,5 y 0,05 µg/ml de conjugado. Se comprobó que las concentraciones de 0,5 y 0,05 no eran suficientes para que el conjugado reaccionara con todo el IFX (500 ng/ml) depositado en las placas de microtitulación.

Capítulo II

Así mismo, se comprobó que las señales analíticas que se obtenían eran independientes de las concentraciones de 50 y 5 $\mu\text{g/ml}$. Por tanto, se seleccionó la concentración **5 $\mu\text{g/ml}$** , como la concentración óptima del conjugado IgG antihumano.

3.5. *Selección del tampón diluyente y de fijación*

El empleo de disoluciones tampón adecuadas (en composición, pH y concentración) es fundamental para un buen desarrollo de un inmunoensayo, ya que el medio acuoso en el que se preparan las disoluciones de las proteínas afecta a la conformación de las mismas y por tanto, afecta a las reacciones Ag/Ab base del inmunoensayo. La adecuada sensibilización de la placa con el Ab (IFX) también depende de la selección de la disolución tampón. Por tanto, para seleccionar el diluyente tanto de las muestras de IFX como de los conjugados, se realizaron ensayos con diferentes tipos de disoluciones tampón.

En la tabla 2.2 se muestran los tampones ensayados, así como su concentración y pH de trabajo. Los datos iniciales de partida fueron recogidos de la bibliografía consultada, siendo estos los tampones y medios habituales para la preparación de disoluciones de Abs.

Aunque las señales analíticas obtenidas con las disoluciones tampón basadas en hidrogenocarbonato/carbonato son semejantes, parece haber una cierta tendencia a que estas sean ligeramente superiores para el tampón hidrógenocarbonato/carbonato de concentración 0,1 M que las obtenidas cuando la concentración del mismo es de 0,05 M. Por tanto, se optó por la selección **del tampón hidrógenocarbonato/carbonato de concentración 0,1 M y pH 9,6 como disolución tampón diluyente de los Abs y como disolución tampón empleada para la fijación de IFX a la placa (sensibilización de la placa)**, lo cual dará lugar posteriormente a una mayor sensibilidad del método ELISA propuesto.

Dado que en los ensayos realizados con PBS-Tween 20 como diluyente las señales analíticas obtenidas eran muy similares a la del blanco, se

pudo deducir que mediante el uso de este tipo de tampón, el fármaco no sensibilizaba la placa de microtitulación.

Tabla 2.2. Selección de la disolución tampón diluyente

Disoluciones tampón ensayadas	Resultados		Aceptación/ Rechazo	Elección
	Concentración (ng/ml)	Absorbancia		
Tampón Hidrógenocarbonato /Carbonato 0,1 M pH 9,6	500	1,332	ACEPTADO	SELECCIONADO
	100	0,417		
	70	0,297		
	30	0,156		
	10	0,075		
	5	0,055		
	1	0,044		
Tampón Hidrógenocarbonato /Carbonato 0,05 M pH 9,6	500	1,281	ACEPTADO	NO SELECCIONADO
	100	0,432		
	70	0,296		
	30	0,123		
	10	0,065		
	5	0,056		
	1	0,044		
Tampón Fosfato Salino (PBS) 0,15 M pH 7,4 – Tween 20 0,3 %	Blanco	0,028	RECHAZADO	-----
	50	0,044		
	50	0,050		
	5	0,048		
	5	0,045		
	0.5	0,043		
	0.5	0,043		

3.6. Selección del intervalo de concentración de IFX

Previo a la validación del método, se establece el intervalo de concentraciones de IFX que origina señal detectable y ligada a la concentración, independientemente a los límites de aplicación del método que serán posteriormente establecidos en el estudio de validación del mismo. Este intervalo permitirá una primera aproximación al intervalo en el que finalmente se aplicará el método, a la vez que posibilita un adecuado desarrollo del mismo en cuanto a su optimización.

Capítulo II

El intervalo de concentraciones de IFX estudiado para evaluar su señal analítica fue entre 0,5 µg/ml y 5 ng/ml. Los resultados obtenidos mostraron que concentraciones por debajo de 1 ng/ml, como las concentraciones ensayadas de 1 y 0,5 ng/ml daban lugar a señales analíticas similares a la de un blanco, con valores de absorbancia alrededor de 0,056; mientras que concentraciones por encima de 1 µg/ml daban valores de absorbancia saturados. Así, la concentración ensayada de 1 µg/ml dio señales analíticas de absorbancia con valores alrededor de 1,80. Para una concentración igual a 5 µg/ml el valor de la señal oscilaba entre 1,90-2,00 y para la concentración de 50 µg/ml las señales analíticas alcanzaban valores de absorbancia de 2,30. Por tanto, se estableció como intervalo de concentraciones de trabajo para estudiar el modelo de calibración el comprendido **entre 500 y 5 ng/ml de IFX**.

3.7. Selección de las variables restantes

La selección del tampón de bloqueo de las placas ELISA tras la sensibilización, de la disolución de lavado de esas mismas placas ELISA, el número de ciclos de lavado y aspiración, la temperatura y los tiempos de incubación, la enzima de marcaje y su sustrato, así como el reactivo de parada, se realizó a partir de la bibliografía consultada, ya que estos parámetros son bien conocidos y establecidos en los inmunoensayos tipo ELISA. Se seleccionaron aquellos parámetros y valores comúnmente empleados y que son, en orden temporal en que son empleados para el desarrollo del ELISA:

- a. Disolución tampón de bloqueo consistente en leche en polvo 2% (w/v) + PBS 0,15 M pH 7,4 – Tween 20 0,3 % (v/v)
- b. Como disolución tampón de lavado para llevar a cabo el lavado de las placas ELISA tras cada incubación, fue empleada una disolución de PBS 0,15 M pH 7,4 – Tween 20 0,3 % (v/v)
- c. Tras cada etapa, se realizaron 4 ciclos de lavado y aspiración

- d. La duración de las incubaciones y las temperaturas a las que son llevadas a cabo las mismas, tras la adición de los distintos reactivos, fueron:
 - d.1. Tras la adición de IFX a la placa, esta se incuba a 4°C durante 18 horas (esta etapa se desarrolla durante la noche, “overnight”) y cubierta con parafilm.
 - d.2. Tras la adición de la disolución bloqueante, de nuevo se incuba la placa a 37°C durante 2 horas y cubierta con parafilm.
 - d.3. Tras la adición del Ab secundario conjugado, las placas cubiertas con parafilm se incuban a 37°C durante 30 minutos.
 - d.4. Tras la adición del sustrato, las placas son incubadas sin cubrir, a temperatura ambiente durante 20 minutos.
 - d.5. Finalmente, tras la adición del reactivo de parada de la reacción, se lleva a cabo la lectura de la placa de forma inmediata.
- e. Enzima de marcaje: el Ab secundario seleccionado para llevar a cabo la reacción con IFX puede ser conjugado con diferentes tipos de enzimas, tal y como quedó descrito en la Introducción de esta Tesis Doctoral. De entre las enzimas disponibles en el mercado fue seleccionada la peroxidasa, ya que es una de las enzimas empleadas con mayor frecuencia en este tipo de análisis, con un precio asequible y que da lugar a resultados adecuados.
- f. Sustrato de la reacción enzimática: una vez elegida la enzima de marcaje, dado que no es específica para una única reacción, se seleccionó como sustrato el OPD Sigmafast™, ya que la bibliografía indica que es uno de los reactivos empleados como sustrato que da lugar a mayor sensibilidad.

Capítulo II

- g. Reactivo de parada de la reacción: este viene impuesto por el sustrato empleado, y es el H₂SO₄ a una concentración 1 M, como ya ha sido citado en el Capítulo anterior.

3.8. *Evaluación de la estabilidad de las placas sensibilizadas con IFX*

Con la finalidad de evaluar la estabilidad de las placas de microtitulación una vez sensibilizadas con IFX bajo diferentes condiciones de conservación, se llevó a cabo un ensayo en el cual las placas sensibilizadas con IFX eran conservadas durante 24 horas cubiertas con papel de aluminio o parafilm y sobre un soporte plástico que contenía silicagel a temperatura ambiente y oscuridad. Los resultados obtenidos tras desarrollar el ELISA propuesto sobre estas placas no daban lugar a señales analíticas coherentes, siendo en gran parte los resultados obtenidos similares a los del blanco. Por tanto, se desechó la idea de emplear placas sensibilizadas con el mAb y conservadas en la forma descrita anteriormente.

También fueron llevados a cabo ensayos en los que las placas sensibilizadas con IFX eran conservadas a -20°C, cubiertas con parafilm hasta el momento de ser usadas para desarrollar el resto de etapas del ELISA. En este caso, los resultados obtenidos tampoco fueron satisfactorios. De ahí que se optara por no conservar placas sensibilizadas para su posterior uso, sino que los ensayos se realizaran de forma que inmediatamente después de la sensibilización de las mismas.

4. DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS DEL ELISA DESARROLLADO

Una vez seleccionados y optimizados los diversos factores y variables del ELISA desarrollado, a continuación se describen las etapas en las que finalmente se lleva a cabo dicho ELISA, que es un ELISA directo no competitivo. La figura 2.1 recoge el esquema de las etapas del mismo.

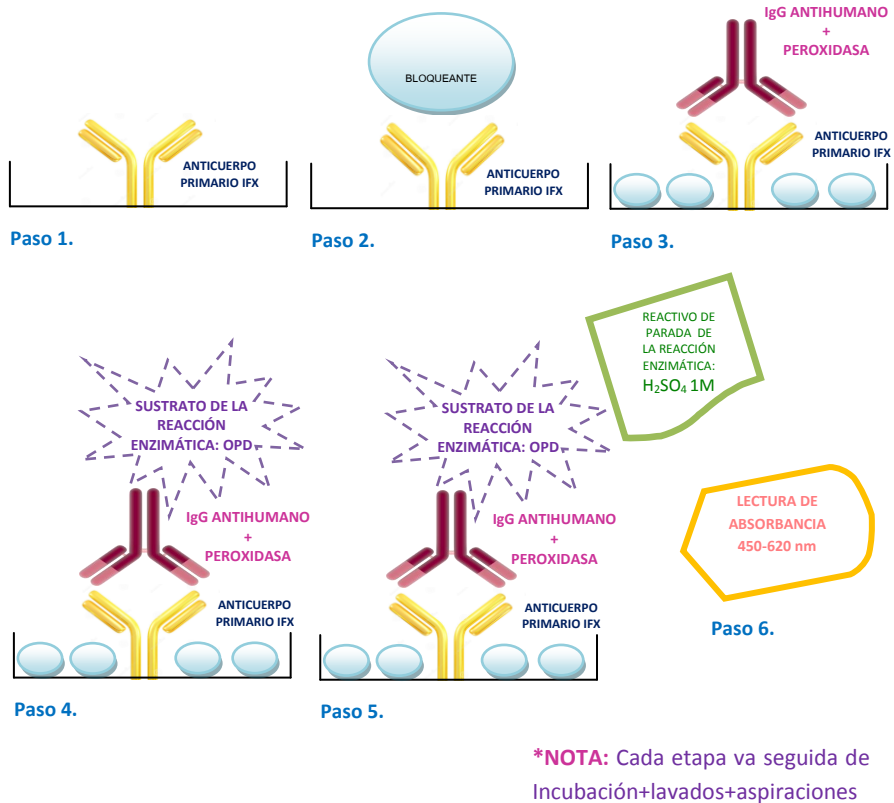


Figura 2.1. Esquema de las diferentes etapas del ELISA directo no competitivo desarrollado. Fuente: elaboración propia.

ETAPA 1. SENSIBILIZACIÓN DE PLACAS DE MICROTITULACIÓN

Las placas de microtitulación son sensibilizadas por incubación con la disolución de IFX (Remicade[®]), diluido en tampón carbonato 0,1 M pH 9,6 a la concentración adecuada. El volumen de disolución adicionado en cada pocillo es de 100 µl.

La incubación se realiza en una cámara frigorífica a 4°C durante 18 horas (overnight) con las placas cubiertas con parafilm (Figura 2.2).

Capítulo II

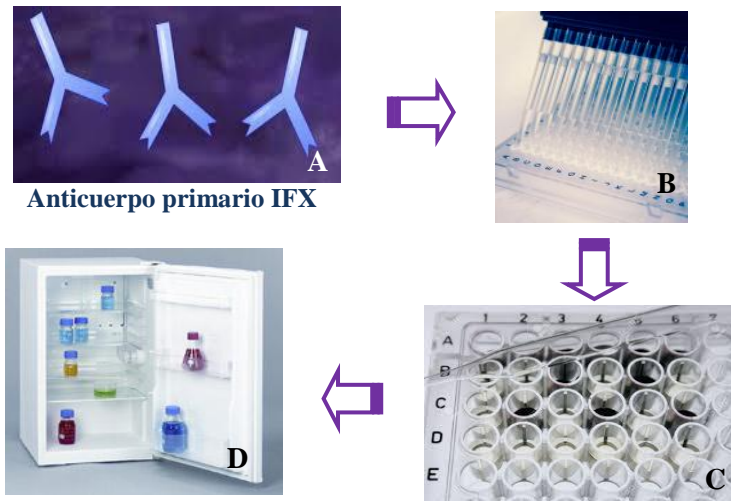


Figura 2.2. Esquema de la etapa 1. del ELISA directo no competitivo desarrollado.
A. IFX. Fuente: genomasur.com. B. Sensibilización de la placa de microtitulación con el Ab primario (IFX). Fuente: www.freeimages.com. C. Placa cubierta con parafilm. Fuente: es.123rf.com. D. Incubación durante 18 horas (overnight) a 4°C. Fuente: es.vwr.com.

ETAPA 2. LAVADO Y ASPIRACIÓN

Transcurridas las 18 horas de incubación y con objeto de eliminar los restos de IFX que no queden adheridos al material plástico de los pocillos, las placas se someten a cuatro ciclos de lavado y aspiración, siendo dispensados 250 μ l de disolución de lavado PBS-Tween 20 por pocillo y ciclo, y realizándose la aspiración tras cada ciclo de lavado.

ETAPA 3. ADICIÓN DEL BLOQUEANTE-CONSERVANTE

A continuación se procede al bloqueo de la muestra de IFX sobre los pocillos. Esta operación se realiza para asegurar que las entidades de IFX queden totalmente adheridas a los pocillos y no queden huecos vacíos en los mismos, en los que posteriormente pueda adherirse el conjugado con el consiguiente aumento de la señal analítica.

Para ello, se adiciona la disolución del bloqueante (100 μ l/pocillo), que actúa a modo de material cementante, pegando la muestra completamente a los pocillos y cubriendo los huecos donde ésta no se haya adherido. El bloqueante-conservante usado es leche en polvo al 2 % (w/v) diluida en PBS 0,15 M pH 7,4 con Tween 20 0,3 % (v/v) (Figura 2.3).

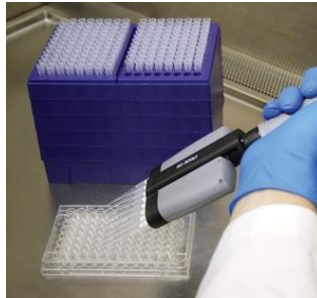


Figura 2.3. Adición del bloqueante-conservante. Fuente: www.denvillescientific.com.

ETAPA 4. INCUBACIÓN

Tras la adición del bloqueante y una vez cubiertas las placas con parafilm, son sometidas de nuevo a incubación a una temperatura de 37°C y durante 2 horas, para conseguir un óptimo bloqueo de las placas sensibilizadas (Figura 2.4).



Figura 2.4. Estufa de incubación. Fuente: elaboración propia.

Capítulo II

ETAPA 5. LAVADO Y ASPIRACIÓN

Tras la incubación llevada a cabo, las placas son sometidas de nuevo a ciclos de lavado y aspiración, para eliminar los restos de la disolución de bloqueo, siguiendo el procedimiento citado anteriormente en la etapa 2 y con la misma finalidad.

ETAPA 6. ADICIÓN DE Ab SECUNDARIO (CONJUGADO)

A continuación se procede a adicionar el conjugado, concretamente el Ab IgG antihumano marcado con la enzima peroxidasa producido en conejo (Figura 2.5). Se adicionan 100µl por pocillo.

Mediante este Ab secundario marcado con peroxidasa, se puede realizar la determinación espectrofotométrica de la reacción que tiene lugar en cada pocillo de la placa sensibilizada.

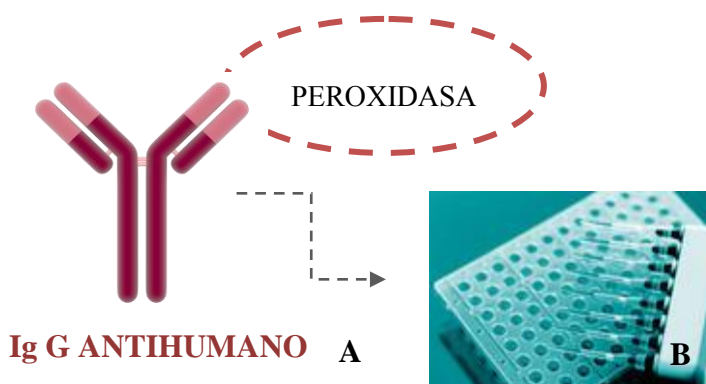


Figura 2.5. Adición del Ab secundario marcado con peroxidasa (conjugado). A. IgG antihumano. Fuente: cosmos.ucdavis.edu. B. Adición del Ab secundario marcado con peroxidasa en la placa de microtitulación. Fuente: es.123rf.com.

Capítulo II

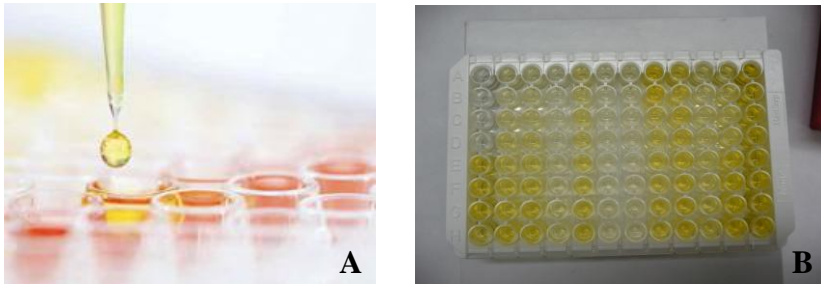


Figura 2.7. A. Adición del sustrato OPD. Fuente: www.thermofisher.com B. Reacción enzimática que tiene lugar en cada pocillo de la placa de microtitulación. Fuente: www.weinersmith.com.

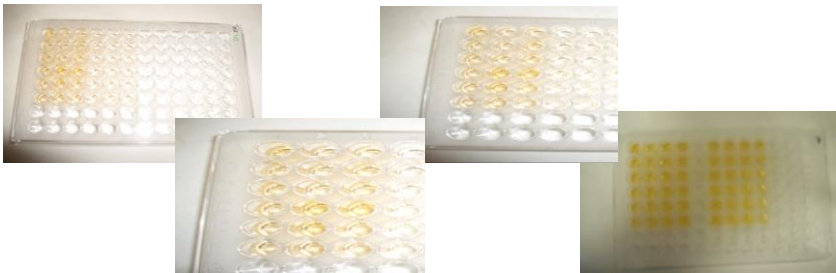


Figura 2.8. Ejemplo de placas de microtitulación una vez añadido el sustrato de la reacción enzimática: OPD. Fuente: elaboración propia.

ETAPA 10. INCUBACIÓN

Una vez adicionado el sustrato, las placas vuelven a incubarse sin ser cubiertas, en oscuridad y a temperatura ambiente durante 20 minutos, para dar lugar a que se produzca la reacción colorimétrica entre la enzima peroxidasa y su sustrato, el $\text{OPD-H}_2\text{O}_2$.

ETAPA 11. PARADA DE LA REACCIÓN

La reacción enzimática se detiene tras un cambio brusco de pH a valores muy ácidos. Para ello, y transcurridos los 20 minutos de incubación, se procede a paralizar la reacción enzimática mediante la adición de H₂SO₄ 1M adicionando en este caso 50 µl de esta disolución de parada por pocillo. Las disoluciones de los pocillos adquieren una coloración marrón-anaranjada con distintas intensidades dependientes de la concentración inicial de IFX en la muestra (Figura 2.9).

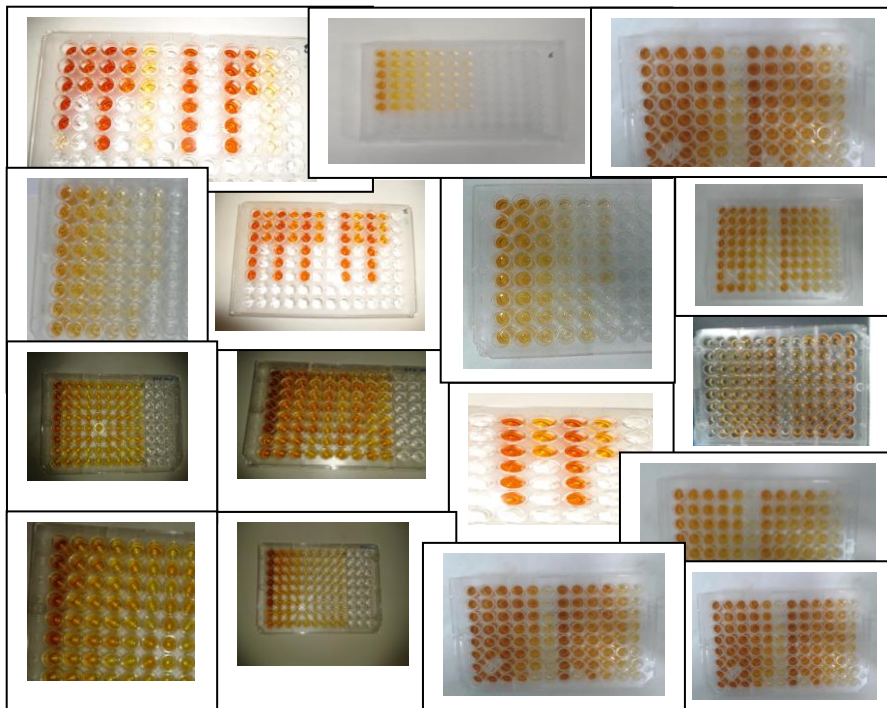


Figura 2.9. Imágenes de placas ensayadas tras la parada de la reacción. Fuente: elaboración propia.

Capítulo II

ETAPA 12. MEDIDA DE LA ABSORBANCIA

Por último, la absorbancia es medida mediante el uso del lector de absorbancia de placas de microtitulación. Para ello se emplean dos filtros de lectura centrados a las longitudes de onda (λ) de 450 nm y 620 nm, respectivamente.

La absorbancia obtenida es la resultante de la diferencia entre las absorbancias medidas a 450 nm y las medidas a 620 nm. Dado que el resultado final de la reacción enzimática es un compuesto de color anaranjado, no presentará absorbancia a la longitud de onda de 620 nm y sí a la de 450 nm. La lectura a 620 nm actúa como un blanco de referencia, restando la señal a esa longitud de onda de la señal propia debida al compuesto de interés (IFX) a 450 nm.

5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ELISA

5.1. Validación del método ELISA propuesto

El procedimiento de validación del ELISA propuesto ha sido llevado a cabo tal y como se describe en el Capítulo I. Como en él se indica, se han seguido principalmente las recomendaciones descritas en las guías ICH Q1A (R2) (Stability Testing of New Drug Substances and Products) [36], ICH Q2 (R1) (Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology) [37], ICH Q1B (Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products) [38] y en estudios de validación específicos de inmunoensayos [39-41]. Así, siguiendo estas recomendaciones de validación, se ha abordado el estudio de:

- Función de calibrado.
- Linealidad.
- Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).
- Intervalo de detección (ID) e intervalo dinámico lineal (IDL).
- Precisión: estudiada como precisión intra-día (repetibilidad) y precisión inter-día (reproducibilidad).

- Exactitud/veracidad como porcentaje de recuperación.

5.1.1. Función de calibrado

Una vez conocido el intervalo de concentraciones en las que la señal analítica de absorbancia está relacionada con la concentración de las muestras de IFX, se procedió a seleccionar y caracterizar el modelo matemático al que mejor se ajusten los datos experimentales. Esta etapa es especialmente importante en los inmunoensayos, incluidos los ELISAs, pues los datos experimentales pueden ajustarse a modelos matemáticos muy diferentes, que van desde lineales, a logarítmicos, a exponenciales, polinomiales, etc., y que dependerá de factores no conocidos asociados a la reacción Ag/Ab en la que se basa el inmunoensayo concreto.

Así pues, para establecer el modelo matemático, en este ELISA directo no competitivo se partió de disoluciones estándar de IFX, preparadas a partir del medicamento reconstituido, Remicade[®], y considerando para este estudio dicho medicamento como patrón -como ya fue comentado en el Capítulo I-. Las concentraciones empleadas fueron 500 ng/ml, 400 ng/ml, 200 ng/ml, 100 ng/ml, 70 ng/ml, 30 ng/ml, 10 ng/ml y 5 ng/ml; se prepararon disoluciones estándar de cada concentración por triplicado y se analizaron mediante el método ELISA propuesto. A partir de los datos de absorbancia obtenidos para cada disolución, se estudió el modelo matemático que mejor se ajustara a los resultados experimentales mediante el empleo del método de mínimos cuadrados parciales, siendo para este caso concreto, un modelo matemático lineal. Por tanto, se establece que la relación entre la concentración de IFX en el intervalo de concentraciones estudiado y la absorbancia se ajusta a una función lineal cuya ecuación es la siguiente:

$$y (\text{Absorbancia}) = 0,0026 x (\text{Concentración}) + 0,064$$

El coeficiente de correlación (r) obtenido fue 0,995 (Figura 2.10), lo cual indica que hay una fuerte relación entre las variables.

Capítulo II

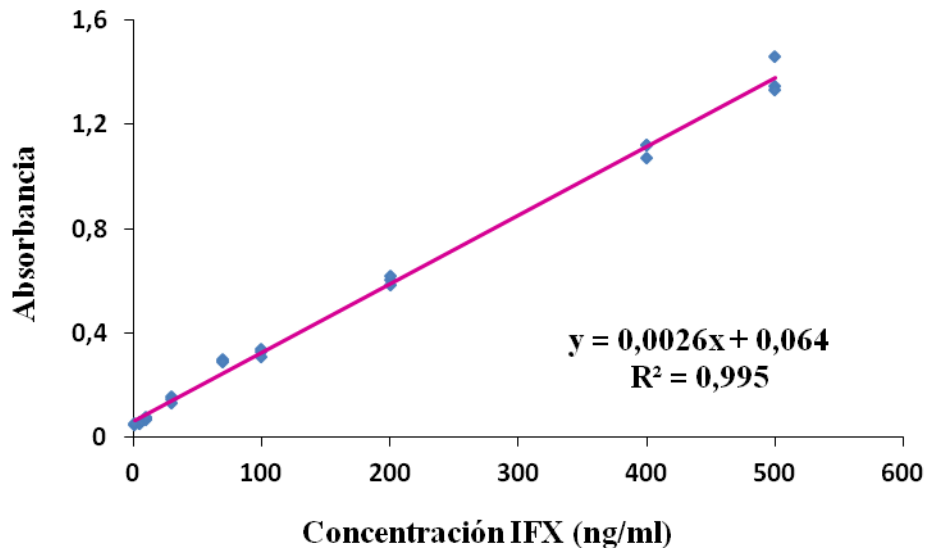


Figura 2.10. Función de calibrado de IFX mediante ELISA directo no competitivo.

Los parámetros estadísticos de la función de calibrado obtenida se muestran en la tabla 2.3.

Dado que el P-Valor de la pendiente y de la ordenada en el origen es inferior a 0,05, se puede afirmar que existe relación estadísticamente significativa entre absorbancia y concentración para un nivel de confianza del 95 %, siendo por tanto su valor el establecido en el modelo.

Tabla 2.3. Parámetros estadísticos de la función lineal de calibrado de IFX mediante ELISA directo no competitivo.

Parámetro		Valor
Función		$A = 0,0026 \text{ [IFX]} + 0,064$
s (a) ⁽¹⁾		0,009
s (b) ⁽²⁾		0,00004
Error estándar del estadístico		0,0326
R ² (%) ⁽³⁾		99,5
P-Valor	ordenada	0,0000
	pendiente	0,0000
Intervalo de concentración estudiado		5 – 500 (ng/ml)

1. Desviación estándar del intercepto.
2. Desviación estándar de la pendiente.
3. Coeficiente de correlación en porcentaje.

Además, para estudiar **la homogeneidad de varianzas** se hizo el análisis gráfico de los residuos como sugieren Boqué y Rius [42], de manera que se obtiene la representación gráfica de los residuos frente a la concentración. Mediante esta representación se puede además detectar la presencia de valores atípicos. En la figura 2.11 se muestra la gráfica correspondiente a dichos residuos.

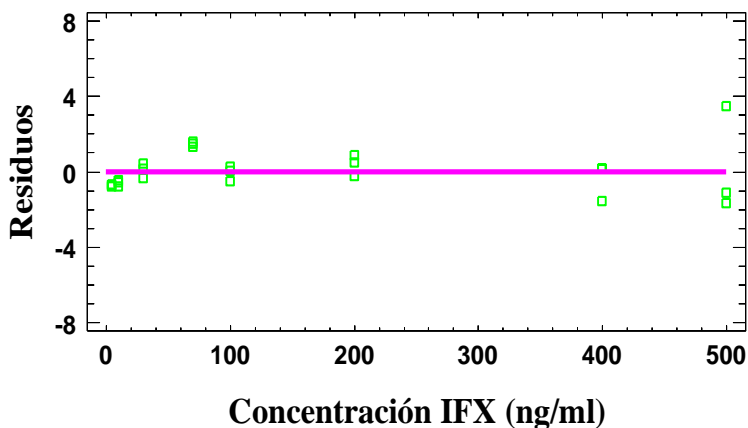


Figura 2.11. Gráfico de residuos de IFX.

Se observa que se cumple la premisa fijada para el cumplimiento de la homogeneidad de varianzas, estando los residuos aleatoriamente distribuidos alrededor de cero.

Por tanto, es posible afirmar que, a partir de los valores obtenidos tanto en el análisis gráfico de los residuos como de coeficiente de regresión, la respuesta de la señal obtenida con la concentración de IFX es lineal en el intervalo de concentraciones estudiado, y que su comportamiento se ajusta a la función lineal que se muestra en la tabla 2.3.

5.1.2. Linealidad

Una vez verificado el ajuste de los datos experimentales a un modelo lineal, la linealidad nos indica el grado de ajuste de la señal medida sobre la recta de calibrado. La linealidad se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$LIN = (1 - s_b) \times 100$$

Donde s_b , como ya se indicó anteriormente, es la desviación estándar de la pendiente de la función de calibrado.

La linealidad máxima puede ser del 100 % y cuanto más próximo esté el valor calculado a éste, mejor será el ajuste de los datos experimentales. En nuestro caso la linealidad obtenida fue:

$$LIN = (1 - 0,00004) \times 100 \qquad LIN = 99,996$$

Tras haber sido confirmada la linealidad en el apartado anterior, se comprueba además que ésta es superior al 99,9 %.

5.1.3. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

Para determinar la menor concentración o la cantidad más baja de IFX que puede ser detectada en una muestra, pero no necesariamente cuantificada como valor, se calculó el **límite de detección**, el cual se obtiene aplicando la siguiente ecuación, tal y como se indicó en el Capítulo I:

$$LD = S_c \times K = S_c \times 3$$

donde s_c es la desviación estándar de diez muestras blanco y K es un factor numérico cuyo valor es 3, valor que supone un nivel de confianza del 99,86 %.

De igual forma, para determinar el **límite de cuantificación**, es decir, la menor concentración de IFX que puede ser cuantificada con adecuada precisión y exactitud en una muestra, se empleó la ecuación:

$$LC = S_c \times K = S_c \times 10$$

Capítulo II

donde, y al igual que para el cálculo del límite de detección, S_c es la desviación estándar de 10 muestras blanco y K tiene un valor igual a 10, valor que supone un nivel de confianza del 99,86 %.

Los valores obtenidos de **límite de detección y cuantificación** son **2 ng/ml y 5 ng/ml respectivamente.**

5.1.4. Intervalo de detección (ID) e intervalo dinámico lineal (IDL)

A partir de los datos obtenidos de límites de detección y cuantificación se estableció el **intervalo de detección.**

También se estableció el **intervalo dinámico lineal (IDL)**, definido por el límite inferior de concentración que es posible cuantificar en el método analítico desarrollado (LC) y el límite superior de concentración ensayada y que no se desvía del modelo matemático de calibración.

La tabla 2.4 muestra los resultados obtenidos para el intervalo de detección y el intervalo dinámico lineal.

Tabla 2.4. ID e IDL del modelo establecido para IFX

ID	2 -5 ng/ml
IDL	5 - 500 ng/ml

Los resultados obtenidos para el LD y LC, 2 ng/ml y 5 ng/ml respectivamente, indican que el método propuesto es sensible para el intervalo de concentraciones propuesto. Además se establece un ID comprendido entre 2 ng/ml y 5 ng/ml y un IDL comprendido entre 5 ng/ml y 500 ng/ml.

5.1.5. Precisión

La precisión fue evaluada estudiando la precisión intra-día (repetibilidad) e inter-día (reproducibilidad) (4 días).

La repetibilidad fue calculada mediante el análisis de 7 muestras de trabajo estándar preparadas a la misma concentración, el mismo día y bajo las mismas condiciones experimentales. La reproducibilidad fue calculada mediante el análisis de 5 muestras patrón a la misma concentración, durante 4 días y bajo las mismas condiciones experimentales. La repetibilidad y la reproducibilidad fueron expresadas como la DER (%) de las concentraciones calculadas a partir de las señales analíticas obtenidas usando la curva de calibrado estándar.

La evaluación de dicha repetibilidad y reproducibilidad fue establecida para concentraciones de 50 ng/ml y 25 ng/ml.

Las tablas 2.5 y 2.6 muestran los resultados obtenidos.

Tabla 2.5. Precisión intra-día (repetibilidad) del ELISA directo no competitivo en la determinación de la concentración de IFX.

IFX concentración (ng/ml)	Promedio concentración 10 réplicas (ng/ml)	Desviación estándar (DE) (ng/ml)	DER (%)
50	50,2	3,2	6,5
25	22,8	1,5	6,4

Capítulo II

Tabla 2.6. Precisión inter-día (reproducibilidad) de IFX.

IFX concentración (ng/ml)	Día control	Promedio concentración 10 réplicas/día	Promedio concentración (4 días)	Desviación estándar (DE) (ng/ml)	DER (%)
50	1	51,1	50,4	1,6	4,0
	2	49,3			
	3	52,2			
	4	48,8			
25	1	23,2	22,5	2,7	12,0
	2	25,9			
	3	20,0			
	4	21,5			

La precisión intra-día e inter-día en la determinación de IFX mediante el ELISA directo no competitivo propuesto a la concentración estudiada de 50 ng/ml fue bastante menor del 10 % en ambos casos. Para la concentración de 25 ng/ml ensayada, la precisión intra-día es también inferior al 10 % y similar a la obtenida para la concentración de 50 ng/ml. Sin embargo, la precisión inter-día es ligeramente superior al 10 %, pero cumple con el criterio indicado para la validación de métodos bioanalíticos para la precisión, mediante el cual se recomienda un coeficiente de variación (CV) ≤ 20 % [41].

Por tanto, podemos concluir que **el método es repetitivo y reproducible** para las condiciones de trabajo seleccionadas, por lo que el método ELISA propuesto **es preciso**.

5.1.6. Exactitud/veracidad

La exactitud (veracidad) fue evaluada a partir del estudio de recuperación, mediante el análisis de 10 muestras de trabajo estándar. La exactitud fue estimada a partir del porcentaje de recuperación de la concentración calculada de disolución estándar. La evaluación de dicha exactitud fue realizada a la concentración de 50 ng/ml y 25 ng/ml.

El porcentaje de recuperación fue calculado mediante la ecuación:

$$\frac{\text{Concentración obtenida } (\mu\text{g/ml})}{\text{Concentración ensayada } (\mu\text{g/ml})} \times 100 = \text{Porcentaje de recuperación}$$

La tabla 2.7 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 2.7. Estudio de recuperación.

IFX concentración (ng/ml)	Promedio concentración 10 réplicas (ng/ml)	Recuperación (%)
50	50,6	101,2
25	24,7	98,8

El porcentaje de **recuperación** obtenido fue del **101,2 %** para la concentración ensayada de 50 ng/ml y del **98,8 %** para la concentración de 25 ng/ml, por tanto dichos porcentajes de **recuperación** se encuentran dentro del criterio previo establecido de aceptación, $\pm 10 \%$ con respecto a la concentración inicial. De tal manera se puede afirmar que **el método**

Capítulo II

ELISA propuesto es exacto para la finalidad que se propone, la determinación de la concentración de IFX en medicamentos y/o preparaciones farmacéuticas.

A destacar que los valores obtenidos al evaluar tanto la precisión como la exactitud cumplen sobradamente con los criterios de aceptación indicados para la validación de inmunoensayos, los cuales recomiendan que el coeficiente de variación (CV, %) sea $\leq 20\%$ [41].

5.2. Resumen de los parámetros de calidad del ELISA propuesto

En la siguiente tabla 2.8 se recogen los parámetros analíticos de calidad obtenidos en el estudio de validación del ELISA directo no competitivo propuesto para la determinación de IFX en medicamentos.

Tabla 2.8. Resumen de los parámetros de calidad del método ELISA propuesto.

Parámetro	Valor	
Modelo matemático ajustado	Modelo lineal	
Función	$A = 0,0026 [\text{IFX}] + 0,064$	
R^2 (%) ⁽³⁾	99,5	
Intervalo de concentración estudiado (ng/ml)	5 – 500	
LD (ng/ml)	2	
LC (ng/ml)	5	
ID (ng/ml)	2-5	
IDL (ng/ml)	5-500	
	Concentración (ng/ml)	
	50	25
Precisión intra-día (DER, %)	6,5	6,4
Precisión inter-día (DER, %)	4,0	12,0
Recuperación (%)	101,2	98,8

6. CONCLUSIONES

En este segundo Capítulo de la presente Tesis Doctoral se ha desarrollado un método ELISA directo no competitivo:

1. Centrado en la determinación cuantitativa del mAb IFX (Remicade[®]) una vez reconstituido, antes de ser administrado.
2. Validado para la determinación cuantitativa de IFX siguiendo las recomendaciones de organismos internacionales del ámbito farmacéutico (ICHs). Se han obtenido resultados satisfactorios para todos los parámetros validados, esto es, modelo de calibración, límite de detección, límite de cuantificación, intervalo de concentraciones de aplicación, precisión y exactitud, cumpliéndose en todos los casos que así lo requerían, los criterios de aceptación inicialmente fijados en el proceso de validación. Es por tanto un método de análisis adecuado, con alto grado de precisión y exactitud, para la determinación cuantitativa del FBIO IFX en estudios relacionados con el mismo en medicamentos.
3. Además, el método propuesto es sencillo, rápido y fácil de realizar, lo cual permite que cualquier investigador/a con unas nociones básicas sobre ELISAs sea capaz de desarrollarlo con éxito.

Capítulo II

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Agencia Europea de Medicamentos (EMA). Ficha técnica de Remicade® (Infliximab). <http://www.ema.europa.eu>.
- [2] Moriconi, F. *et al.* Quantitative gene expression of cytokines in peripheral blood leukocytes stimulated in vitro: modulation by the anti-tumor necrosis factor- α antibody infliximab and comparison with the mucosal cytokine expression in patients with ulcerative colitis. *Translational Research* 2007; 150:223–232.
- [3] S.W.M. Lun *et al.* Decreased ex vivo production of TNF- α and IL-8 by peripheral blood cells of patients with rheumatoid arthritis after infliximab therapy. *International Immunopharmacology* 7 (2007) 1668–1677.
- [4] Waters, H. *et al.* Stability of infliximab dosing in inflammatory bowel disease: results from a multicenter US chart review. *J Med Econ.* 2011; 14(4):397-402.
- [5] Grattendick, K.J. *et al.* Effects of three anti-TNF- α drugs: Etanercept, infliximab and pirfenidone on release of TNF- α in medium and TNF- α associated with the cell in vitro. *International Immunopharmacology* (2008) 8, 679-687.
- [6] Bernie Scallon *et al.* Binding and Functional Comparisons of Two Types of Tumor Necrosis Factor Antagonists. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* May 2002, 301 (2) 418-426.
- [7] Giganti, M.D. *et al.* Adverse events after intravitreal Infliximab (Remicade). *Retina* 30:71–80, 2010.
- [8] S. Pulido *et al.* More Questions Than Answers: A Call for a Moratorium on the Use of Intravitreal Infliximab Outside of a Well-Designed Trial. *Retina.* 2010 Jan; 30 (1): 1–5.
- [9] Kedar S. Gokhale and Sriramakamal Jonnalagadda. Preparation and Evaluation of Sustained Release Infliximab Microspheres. *PDA J Pharm Sci Technol* 2013 May-Jun; 67(3):255-66.
- [10] Seow, C.H. *et al.* Trough serum infliximab: a predictive factor of clinical outcome for infliximab treatment in acute ulcerative colitis. *Gut* (2010) 59, 49.
- [11] Maser, E.A. *et al.* Association of trough serum infliximab to clinical outcome after scheduled maintenance treatment for Crohn's disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* (2006) 4, 1248.

- [12] Ordas, I. *et al.* Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms. *Clin. Pharmacol. Ther.* (2012) 91, 635.
- [13] Miheller, P. *et al.* Anti-TNF trough levels and detection of antibodies to anti-TNF in inflammatory bowel disease: are they ready for everyday clinical use? *Expert. Opin. Biol. Ther.* (2012) 12, 179.
- [14] Guerra, I. *et al.* Utility of measuring serum concentrations of anti-TNF agents and anti-drug antibodies in inflammatory bowel disease. *Curr. Drug Metab.* (2011) 12, 594.
- [15] Ghia, C. *et al.* Analytical and Clinical Evaluation of an Immunoassay for Estimating Immunogenicity of Infliximab and Etanercept in Indian Population. *J Assoc Physicians India.* 2016 Sep; 64(9):14-17.
- [16] Bogdan Kolarz *et al.* Antiphospholipid antibodies during 6-month treatment with infliximab: A preliminary report. *Med Sci Monit*, 2014; 20: 2127-1231.
- [17] Ben-Horin *et al.* The decline of anti-drug antibody titres after discontinuation of anti-TNFs: implications for predicting re-induction outcome in IBD. *Aliment. Pharmacol. Ther.* (2012) 35, 714.
- [18] Imaeda *et al.* Development of a new immunoassay for the accurate determination of anti-infliximab antibodies in inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol.* (2012) 47, 136.
- [19] Bendtzen, K. *et al.* Individual medicine in inflammatory bowel disease: monitoring bioavailability, pharmacokinetics and immunogenicity of anti-tumour necrosis factor-alpha antibodies. *Scand. J. Gastroenterol.* (2009) 44, 774.
- [20] Aysegul Yucel *et al.* Investigation of the functional characteristics of antibodies to therapeutic anti-human tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody. *Immunology Letters* 111 (2007) 84–91.
- [21] Bendtzen, K. *et al.* Individualized monitoring of drug bioavailability and immunogenicity in rheumatoid arthritis patients treated with the tumor necrosis factor alpha inhibitor infliximab. *Arthritis Rheum.* (2006) 54, 3782.
- [22] Baert, F. *et al.* Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* (2003) 348, 601.

Capítulo II

[23] Xi Xie *et al.* A T-cell-based enzyme-linked immunospot assay for tuberculosis screening in Chinese patients with rheumatic diseases receiving infliximab therapy. *Clin Exp Med* (2011) 11:155–161.

[24] Ternant, D. *et al.* An enzyme-linked immunosorbent assay for therapeutic drug monitoring of infliximab. *Ther Drug Monit.* 2006 Apr; 28(2):169-74.

[25] Svenson *et al.* Monitoring patients treated with anti-TNF-alpha biopharmaceuticals: assessing serum infliximab and anti-infliximab antibodies. *Rheumatology (Oxford)* (2007) 46,1828.

[26] Wolbink *et al.* Development of antiinfliximab antibodies and relationship to clinical response in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* (2006) 54, 711.

[27] Hernández-Breijo, B. *et al.* Standardization of the homogeneous mobility shift assay protocol for evaluation of anti-infliximab antibodies. Application of the method to Crohn's disease patients treated with infliximab. *Biochem Pharmacol.* 2016 Dec 15; 122: 33-41.

[28] Steenholdt, C. *et al.* Changes in serum trough levels of infliximab during treatment intensification but not in anti-infliximab antibody detection are associated with clinical outcomes after therapeutic failure in Crohn's disease. *J Crohns Colitis.* 2015 Mar; 9(3):238-45.

[29] Shui-Long Wang *et al.* Development and validation of a homogeneous mobility shift assay for the measurement of infliximab and antibodies-to-infliximab levels in patient serum. *Journal of Immunological Methods* 382 (2012) 177–188.

[30] Steenholdt, C. *et al.* Clinical implications of measuring drug and anti-drug antibodies by different assays when optimizing infliximab treatment failure in Crohn's disease: post hoc analysis of a randomized controlled trial. *Am J Gastroenterol.* 2014 Jul;109(7):1055-64.

[31] Steenholdt, C. *et al.* Comparison of techniques for monitoring infliximab and antibodies against infliximab in Crohn's disease. *Ther Drug Monit.* 2013 Aug; 35(4):530-8.

[32] Lee, M.W. *et al.* Comparison of infliximab drug measurement across three commercially available ELISA kits. *Pathology.* 2016 Oct; 48(6):608-12.

- [33] Kopylov, U. *et al.* Clinical utility of antihuman lambda chain-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) versus double antigen ELISA for the detection of anti-infliximab antibodies. *Inflamm Bowel Dis.* 2012 Sep; 18(9):1628-33.
- [34] Corstjens, P.L. *et al.* A rapid assay for on-site monitoring of infliximab trough levels: a feasibility study. *Anal Bioanal Chem.* 2013 Sep; 405(23):7367-75.
- [35] Peng, X. *et al.* Development and Validation of LC-MS/MS Method for the Quantitation of Infliximab in Human Serum. *Chromatographia.* April 2015, Volume 78, Issue 7, pp 521-531.
- [36] International Conference on Harmonization (ICH) guidelines ICH Q1A (R2). Stability Testing of New Drug Substances and Products.
- [37] International Conference on Harmonization (ICH) guidelines ICH Q2 (R1). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.
- [38] International Conference on Harmonization (ICH) guidelines ICH Q1B. Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products.
- [39] Lipton, C.R. *et al.* Guidelines for the validation and use of immunoassays for determination of introduced proteins in biotechnology enhanced crops and derived food ingredients. *Food Agric. Immunol.* 12 (2000)153-164.
- [40] Findlay, J.W.A. *et al.* Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *J Pharm. Biomed. Anal.* 21 (2000) 1249-1273.
- [41] De Silva, B. *et al.* Recommendations for the Bioanalytical Method Validation of Ligand-binding Assays to Support Pharmacokinetic Assessments of Macromolecules. *Pharmaceut. Res.* 20 (2003) 1885-1900.
- [42] Boqué, R. y Rius, F.X. Avances en Quimiometría Práctica. *Servicio de Publicaciones e Intercambio científico de la Universidad de Santiago de Compostela.* Santiago de Compostela (1994).



CAPÍTULO III

DETERMINACIÓN DE LA
ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE
INFLIXIMAB (REMICADE®)
MEDIANTE ELISA INDIRECTO

1. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE INFLIXIMAB

De acuerdo con las indicaciones del fabricante, la infusión de medicamento diluido de IFX debe realizarse dentro de las tres horas de la preparación de la dosis y cualquier porción no utilizada del vial de dosis única o de la solución de infusión diluida deben ser desechadas. Para evitar la pérdida de las cantidades sobrantes de IFX, muchas clínicas posponen la preparación de las dosis hasta que los pacientes llegan para el tratamiento, lo que da como resultado retrasos sustanciales en la infusión e insatisfacción del paciente. Si se demostrara que las dosis preparadas de IFX conservan su estabilidad y eficacia durante períodos superiores, la fecha de vencimiento podría liberalizarse y las dosis podrían prepararse por adelantado, reduciendo el desperdicio y aumentando la conveniencia del tratamiento [1].

Son pocos los estudios encontrados en la bibliografía consultada destinados a determinar la estabilidad del principio activo IFX en su medicamento reconstituido o en las correspondientes disoluciones, con objeto de demostrar si verdaderamente este Ab presenta la estabilidad indicada por el fabricante, o bien esa estabilidad podría ampliarse siempre que este haya sido preparado en condiciones asépticas. Reseñamos a continuación los estudios realizados con dicha finalidad.

Así por ejemplo, Ryuji Ikeda *et al.* [1] analizaron la estabilidad de diluciones de IFX en bolsas de cloruro de polivinilo (PVC) almacenadas a 4°C durante un máximo de 14 días, con el objetivo de determinar la fecha de caducidad adicional de IFX en estas condiciones. Para ello determinaron la estabilidad de IFX de forma indirecta, haciendo reaccionar IFX con una cantidad fija de TNF- α , siendo la fracción que no reacciona analizada mediante un ELISA “validado” del que no se aportan datos. Con este método concluyen que IFX, cuando se preparó a una concentración de 400 $\mu\text{g/ml}$ en NaCl 0,9 % en una inyección, no sufrió

Capítulo III

ninguna pérdida de actividad biológica, permaneciendo inalterado tras su almacenamiento a 4°C en bolsas de PVC durante 7 y 14 días [1].

El grupo de investigación de M. Perry *et al.* determinó la estabilidad *in vitro* de IFX y adalimumab (ADA) en muestras de sangre coagulada y en suero, almacenadas hasta 7 días a temperatura ambiente antes de ser congeladas (-20°C) y analizadas como lote. El análisis se llevó a cabo mediante el empleo de kits ELISA comercialmente disponibles y específicos para cada uno de los mAbs. El ensayo de IFX se basó en la unión de IFX libre a un mAb específico anti-IFX adicionado sobre las placas incubadas con suero. Como conjugado se empleó un Ab marcado con peroxidasa y como sustrato la tetrametilbencidina, siendo la intensidad de color amarillo adquirida por las muestras tras paralizar la reacción, proporcional a la concentración de IFX libre en las mismas. El ensayo de ADA fue similar al de IFX. Como resultado no encontraron ninguna diferencia significativa entre la concentración de IFX y ADA medida en muestras almacenadas como suero o sangre durante 7 días a temperatura ambiente [2].

S. Guirao *et al.* [3] también estudiaron la estabilidad físico-química de las disoluciones de IFX en NaCl 0,9 % a concentraciones de 0,7 y 1,6 mg/ml. Estas disoluciones se envasaron en bolsas estériles de poliolefina y se almacenaron a 4, 22 y 40°C. Para cada concentración y temperatura, se prepararon tres lotes diferentes. Después de 0, 7, 14 y 30 días, se tomaron alícuotas de cada bolsa antes del análisis. Se evaluaron diversos parámetros físico-químicos de estas disoluciones. Así, el proceso de la agregación se estudió mediante la medida de turbidez UV antes y después de centrifugar a tres 3 longitudes de onda. El ensayo de proteínas se realizó mediante el método de Bio-rad. La identificación de una posible fragmentación o la formación de agregados solubles se estimaron por SEC y la modificación global de la carga por HPLC iónica. Se empleó la dispersión dinámica de luz (DLS) para evaluar los tamaños de agregados solubles. Los resultados indicaron que IFX en soluciones diluidas en NaCl 0,9 % conservadas en bolsas de poliolefina a concentraciones de 0,7 y 1,6 mg/ml eran estables al menos un mes a 4 y 22°C [3], sin embargo, no se llevó a cabo un estudio de actividad biológica para determinar si durante

ese mes de conservación, dicha actividad biológica se mantiene como la actividad inicial o se produce una disminución de la misma.

Dado que las condiciones externas a las que se ve sometido el MB pueden influir negativamente en la estabilidad del mismo, varios autores han analizado las consecuencias que pueden derivarse de este hecho. Así, JA. Alsaddique *et al.* [4] investigaron la influencia de los factores de estrés térmicos y de cizallamiento sobre la estabilidad de IFX diluido en agua estéril para inyectables. Para ello, IFX a concentraciones de 1, 4 y 10 mg/ml se sometió a un tratamiento térmico a temperatura de 25-65°C y a fuerza de cizallamiento por sonicación durante 1 y 3 minutos. Las muestras sometidas a sonicación se analizaron en cuanto a propiedades físicas para tamaño de partícula y potencial zeta. Para determinar su integridad estructural se empleó la electroforesis en gel (SDS-PAGE) y dicroísmo circular (técnicas estas poco sensibles a modificaciones estructurales puntuales). El contenido de IFX fue evaluado mediante espectroscopia UV y la actividad biológica por ELISA indirecto comercial. Para llevar a cabo el ELISA, el IFX, antes y después de ser sometido a estrés, fue diluido a una concentración de 20 ng/ml e incubado con una cantidad conocida de TNF- α durante 1 hora. Transcurrida esa hora, la combinación de TNF- α -IFX se hizo reaccionar con un Ab TNF- α detector, con el que previamente habían sido sensibilizadas las placas de microtitulación. De tal manera, se determinó la cantidad de TNF- α libre en los sobrenadantes de la muestra, ya que éste se unirá al Ab detector de TNF- α , mientras que las moléculas de TNF- α capturado por IFX (parámetro indicador de que IFX mantiene su funcionalidad), no se unirán a dicho Ab detector y se eliminarán mediante la etapa de lavado. Así, la determinación de la cantidad de TNF- α libre que queda en la muestra, fue utilizada como medida de la actividad de IFX. Este ensayo fue validado en términos de curva de calibrado, coeficiente de correlación e intervalo de aplicabilidad. Los resultados de todo el estudio no mostraron cambios en las propiedades físicas o la integridad estructural de IFX, en ninguna de las concentraciones ensayadas, cuando se someten a una temperatura de hasta 50°C. A 65°C, se observó agregación y precipitación de IFX. Cuando se sometieron a fuerzas de cizallamiento, las concentraciones más altas de IFX (4 y 10 mg/ml) mantuvieron sus propiedades físicas e

Capítulo III

integridad estructural. Sin embargo, se encontró que la actividad biológica de IFX disminuyó con el aumento de la temperatura y el tiempo de sonicación y fue dependiente de la concentración. La liofilización de IFX a 1 mg/ml no afectó sus propiedades físicas, integridad estructural o su actividad biológica [4] según los resultados obtenidos con los métodos aplicados.

Ya que las diferencias en la glicosilación en glicoproteínas terapéuticas también pueden cambiar significativamente la seguridad y la eficacia de las mismas, algunos autores también han investigado mediante el empleo de técnicas como ELISA, HPLC y MS, la consistencia lote a lote de algunas de estas proteínas terapéuticas entre las que se encuentra IFX [5].

Desde el año 2009 los estudios de investigación basados en el MB Remicade[®] están dirigidos a la búsqueda y demostración de nuevas indicaciones en enfermedades para las cuales su uso no está autorizado, siendo su aplicación intravítrea para el tratamiento de patologías oculares la evaluada con mayor frecuencia. Para ello, los investigadores analizan la estabilidad de IFX con la finalidad de que este pueda ser empleado de forma intravítrea sin dar lugar a riesgos para el paciente tratado con el mismo. De tal forma, Beer *et al.* [6] investigaron la estabilidad de soluciones de IFX reconstituidas y determinaron si su composición es adecuada para su potencial uso intravítreo. Para ello, tras reconstituir IFX, la disolución se dividió en alícuotas y se almacenó refrigerada. Cada dilución se ensayó por inmunoensayo de microesferas diariamente, durante 5 días y semanalmente, durante un total de 6 semanas. Los autores encontraron que la inmunoreactividad de dos concentraciones diferentes de IFX almacenado a 4°C durante un período de 6 semanas se mantuvo estable y que por tanto, la composición de IFX era adecuada y podría ser una medicación intravítreal coste-efectiva para su uso en la práctica clínica, si un estudio adicional apoyara su seguridad y eficacia [6].

Otros grupos de investigación han llevado a cabo estudios de estabilidad física y biológica de IFX en las condiciones de almacenamiento recomendadas, para evaluar la toxicidad de la formulación en el epitelio

de la superficie ocular in vitro y con el propósito de desarrollar nuevas gotas de ojos de IFX [7]. Para estas investigaciones las técnicas empleadas con mayor frecuencia son la electroforesis en gel, los inmunoensayos ELISA, el HPLC y MS.

Sin embargo, y aunque, la investigaciones realizadas con objeto de demostrar el uso eficaz y seguro de IFX intravítreo y en otras indicaciones no autorizadas para el mismo, son muy frecuentes durante los últimos años, los estudios realizados actualmente en relación con IFX van dirigidos en su mayoría al análisis del comportamiento tanto clínico como físico-químico y biológico de los medicamentos biosimilares (MBS) de IFX recientemente comercializados (RemsimaTM e Inflectra[®]). De tal forma, la bibliografía consultada muestra que los estudios de estabilidad más actuales se han dedicado al análisis de estos dos biosimilares para determinar su comportamiento y farmacocinética en comparación con el del medicamento original [7] [8].

Los estudios descritos anteriormente demuestran que no son muchas las investigaciones realizadas sobre IFX con la finalidad de determinar su actividad biológica siendo conservado durante periodos de tiempo superiores a los indicados por el fabricante, y que, los análisis que hay realizados evalúan la estabilidad de este mAb conservado en bolsas de almacenamiento de distintos materiales plásticos y no en el propio vial, tal y como se ha realizado en la presente Tesis Doctoral. Además, queda reflejado que la técnica analítica preferentemente usada para evaluar la estabilidad de este tipo de medicamentos (MB), entre los cuales se incluye IFX, es el inmunoensayo tipo ELISA en sus distintos formatos. Sin embargo, para la mayoría de ELISAs empleados en estos estudios se usan kits comercialmente disponibles, de elevado precio, con lo cual se encarece la determinación funcional del mAb, o bien ELISAs desarrollados por los propios investigadores pero que no han sido validados rigurosamente, sino que han sido empleados como una mera prueba para determinar la actividad biológica de los medicamentos. De ahí, que el desarrollo y la validación de este tipo de análisis haya sido el seleccionado para llevar a cabo los estudios descritos en esta investigación.

Capítulo III

2. OBJETIVO

Con objeto de contribuir a establecer la estabilidad en el tiempo de IFX en el medicamento original Remicade® tras ser reconstituido y conservado en condiciones habituales de uso hospitalario, en el presente trabajo se ha desarrollado y validado, según las recomendaciones de organismos internacionales, un ELISA para determinar la actividad biológica de IFX de forma rigurosa. Mediante esta investigación, se contribuirá a determinar si IFX conserva su actividad anti-TNF- α para poder ser empleado después del tiempo indicado por el fabricante una vez abierto el vial, manteniendo la seguridad para el paciente y permitiendo el importante beneficio económico al que daría lugar este hecho.

3. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ELISA

Para la puesta a punto del método ELISA para la determinación cuantitativa de la actividad biológica del mAb IFX, se procedió a la selección y optimización de las variables que afectan a dicho método y que son las que se exponen a continuación.

3.1. *Selección de la modalidad ELISA*

Entre las diferentes modalidades existentes para llevar a cabo un ELISA, en el presente trabajo de investigación se optó por desarrollar un **ELISA indirecto no competitivo**, siendo este el más indicado ya que permite una evaluación directa de la reacción en la cual basa el mAbs IFX su mecanismo de acción.

3.2. *Selección de las placas de microtitulación*

Este inmunoensayo comenzó a desarrollarse en el mismo tipo de placas que fueron empleadas para el desarrollo del ELISA directo destinado a cuantificar IFX y descrito en el capítulo anterior y que resultaron ser

efectivas para la adsorción de IFX. Sin embargo, se observó que para varias concentraciones diferentes ensayadas, no dieron resultado para la adsorción del TNF- α empleado en este ensayo, es decir, las placas no estaban quedando sensibilizadas con el Ag, por lo que se probaron otro tipo de placas más especializadas para el desarrollo de este tipo de inmunoensayo, como las **placas de microtitulación Nunc Maxisorp[®]** de 96 pocillos, de fondo plano y sin tapa, con una superficie tratada que permite que el Ag empleado en el método desarrollado quede perfectamente adherido a la misma, consiguiendo de tal forma una sensibilización adecuada. Tanto en las placas desmontables como no desmontables de este tipo, el método se desarrollaba de forma adecuada puesto que el material es el mismo, sin embargo, se optó por emplear las **placas no desmontables** dado que su coste era menor al de las placas desmontables, siendo más útiles estas últimas cuando solamente se van a realizar pequeños ensayos en los que con la sensibilización de unas pocas columnas de la placa es suficiente, no siendo este nuestro caso.

3.3. Selección del anticuerpo secundario (conjugado)

Debido a que IFX es un mAb quimérico constituido por un 75 % humano y un 25 % murino, fue seleccionado como conjugado para la reacción Ag-Ab estudiada, un Ab secundario IgG antihumano marcado con peroxidasa.

Los datos obtenidos anteriormente para el desarrollo del ELISA directo no competitivo que permite cuantificar este mAb, IFX (Capítulo I. Apartado 4.3.), indican que el uso de un Ab secundario IgG antiratón marcado con peroxidasa da lugar a señales analíticas más bajas, de forma que el método es más sensible con el uso de un Ab secundario IgG antihumano marcado con su correspondiente enzima.

Por tanto, y debido a la mayor sensibilidad mostrada en ensayos previos, se seleccionó como conjugado el Ab IgG antihumano conjugado.

Capítulo III

3.4. *Selección de la concentración óptima de conjugado*

Al igual que en el caso anterior, la selección de la concentración óptima de conjugado para la cual se obtuviera una señal analítica adecuada, se basó en los estudios previamente realizados y descritos en el presente trabajo para el desarrollo del ELISA directo no competitivo de este mismo FBIO, IFX (Capítulo I, Apartado 4.4.). De nuevo aquí la concentración óptima del conjugado es aquella que permita la detección de los mayores niveles de concentración de IFX ensayados, dado que es un reactivo que se adiciona en exceso. Este exceso tampoco ha de ser amplio, dado el elevado coste de este tipo de reactivos.

Se realizaron pruebas empleando diversas concentraciones de IFX una vez saturada la placa ELISA con TNF- α (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por pocillo, discutido más adelante) hasta un valor de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se comprobó que la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ optimizada para el ELISA directo descrito en el capítulo anterior, era suficiente – y se encontraba en exceso - para determinar el IFX ligado a TNF- α fijado en la placa. Por tanto, la concentración óptima de Ab secundario conjugado IgG antihumano empleada para el desarrollo de este ELISA es **5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por pocillo**.

3.5. *Optimización del proceso de sensibilización de las placas ELISA*

Para llevar a cabo una adecuada sensibilización de las placas ELISA, fueron ensayadas y seleccionadas determinadas variables que pueden influir en dicho proceso y que son: la selección del *tampón diluyente*, la selección de la *concentración de antígeno* y del *intervalo de concentración de IFX*, así como la *selección de los volúmenes de disoluciones a adicionar sobre la placa de microtitulación*, empleados para desarrollar el ELISA.

Para seleccionar el diluyente tanto de las muestras de IFX, como del Ag (TNF- α), se realizaron ensayos con diferentes tipos de tampones. En la tabla 3.1 se muestran los tampones ensayados.

El ensayo ELISA se realizó con TNF- α e IFX diluidos en diferentes tampones y a distintos intervalos de concentración. El Ab secundario fue siempre el IgG antihumano marcado con peroxidasa a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ diluido en tampón carbonato 0,1 M pH 9,6 y previamente seleccionado.

Tal y como se muestra en la tabla 3.1, el tampón de dilución más adecuado tanto para TNF- α como para IFX fue el tampón carbonato 0,1 M pH 9,6, ya que con este las señales analíticas obtenidas eran más elevadas y diferían de las resultantes de un blanco obtenidas en el resto de ensayos realizados con los demás tampones.

Tabla 3.1. Selección del tampón diluyente

TAMPON DILUYENTE DE TNF- α	TAMPÓN DILUYENTE DE IFX	ANTICUERPO CONJUGADO	INTERVALO DE SEÑAL ANALÍTICA OBTENIDA	ACEPTACIÓN/ RECHAZO	ELECCIÓN
TNF- α + BSA 1 %	IFX + BC 0,1M pH 9,6	IgG antihumano - peroxidasa + BC 0,1M pH 9,6			
10-0,1 ng/ml	500-25 ng/ml	5 $\mu\text{g/ml}$	0,01-0,05	RECHAZADOS	NO SELECCIONADO
10-0,1 ng/ml	50-0,5 $\mu\text{g/ml}$		0,04-0,05		
10-0,1 ng/ml	100-5 $\mu\text{g/ml}$		0,04-0,05		
0,5 $\mu\text{g/ml}$	50-0,5 $\mu\text{g/ml}$		0,04-0,05		
TNF- α + BC 0,1M pH 9,6	IFX + BC 0,1M pH 9,6				
0,5 $\mu\text{g/ml}$	50-5 $\mu\text{g/ml}$		0,04-0,05	RECHAZADO	NO SELECCIONADO
0,75 $\mu\text{g/ml}$	25-0,04 $\mu\text{g/ml}$		0,12-0,019	ACEPTADO	NO SELECCIONADO
1 $\mu\text{g/ml}$	25-0,04 $\mu\text{g/ml}$		0,15-0,025	ACEPTADO	SELECCIONADO
TNF- α + BC 0,1M pH 9,6	IFX + PBS - BSA 1 %				
0,5 $\mu\text{g/ml}$	100-0,5 $\mu\text{g/ml}$		0,13-0,20	RECHAZADOS	NO SELECCIONADO

Capítulo III

Por tanto, y dado los resultados obtenidos, se seleccionó como tampón **diluyente** tanto de TNF- α como de las muestras de IFX, el **tampón carbonato 0,1 M de pH 9,6**.

De los resultados obtenidos tras el desarrollo del método ELISA con diversas concentraciones de TNF- α diluido en el tampón seleccionado y mostradas en la tabla 3.1, se observa que TNF- α diluido a una concentración de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ da lugar a señales muy bajas y que mediante el aumento de la concentración del mismo hasta 0,75 $\mu\text{g/ml}$, se obtienen resultados satisfactorios pero con una sensibilidad ligeramente menor que cuando se emplea TNF- α a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$, concentración a la cual la placa queda sensibilizada de forma óptima. Así, por ejemplo, para muestras de IFX con una concentración de 0,1 $\mu\text{g/ml}$, TNF- α 0,75 $\mu\text{g/ml}$ daba lugar a señales analíticas con un valor alrededor de 0,357, mientras que los valores de absorbancia obtenidos con TNF- α 1 $\mu\text{g/ml}$ eran 0,389. Por tanto, y dados los resultados obtenidos, se seleccionó como **concentración** para llevar a cabo el ensayo **1 $\mu\text{g/ml}$ de TNF- α** .

En la figura 3.1 se muestra un estudio comparativo de las señales obtenidas tras desarrollar el método ELISA para las tres concentraciones de TNF- α ensayadas (0,5 $\mu\text{g/ml}$; 0,75 $\mu\text{g/ml}$ y 1 $\mu\text{g/ml}$), donde se puede observar que las señales analíticas de mayor valor y por tanto que dan lugar a una mayor sensibilización de las placas ELISA, son las obtenidas mediante el empleo de TNF- α a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$.

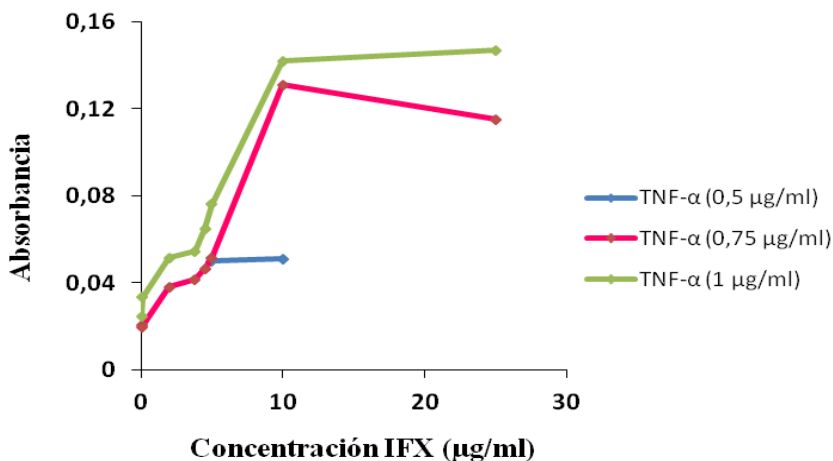


Figura 3.1. Estudio de la sensibilización de las placas de microtitulación con diferentes concentraciones de TNF- α (100 μ l/pocillo).

La tabla anterior 3.1 también muestra los resultados obtenidos para evaluar el nivel de concentración al que puede ser determinada la concentración de IFX en el ELISA. Se evaluaron niveles de ng/ml y μ g/ml, empleando siempre el IFX diluido en tampón carbonato 0,1 M pH 9,6. De los resultados obtenidos, se concluye que son necesarios los niveles de concentración mayores ensayados, es decir **μ g/ml de IFX**. Como se indicará más adelante, el método será validado por tanto para estos niveles de concentración del mAb.

3.6. Selección del volumen de disoluciones a adicionar en la placa ELISA

El volumen adicionado de **todas las disoluciones** empleadas fue de **100 μ l por pocillo**, excepto en el caso del **reactivo de parada** que se requieren **50 μ l por pocillo**.

Una vez optimizada la concentración de TNF- α (1 μ g/ml), se procedió a estudiar el volumen a adicionar del mismo, de manera que quedase asegurada la adecuada sensibilización de la placa. Para ello, se estudió la

Capítulo III

adición de los volúmenes de 100 μl , 150 μl y 200 μl por pocillo de TNF- α .

En la figura 3.2 se muestran algunos de los resultados obtenidos tras desarrollar el ELISA adicionando tres volúmenes distintos de TNF- α para sensibilizar las placas. Se puede observar que mediante la adición de TNF- α en un volumen de 200 μl por pocillo se obtienen valores de absorbancia más adecuados para el desarrollo del ensayo.

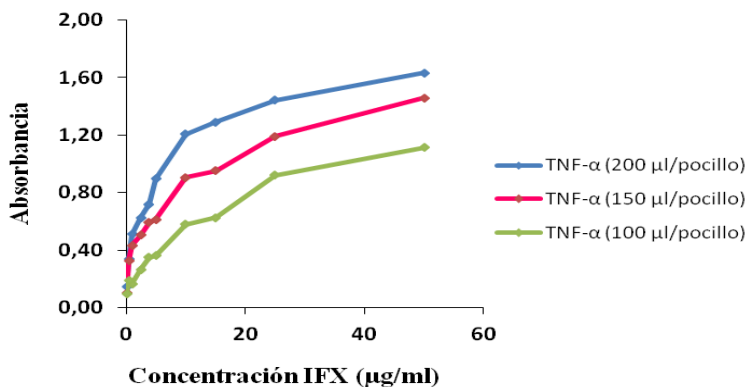


Figura 3.2. Estudio del volumen a adicionar de disolución de TNF- α de concentración 1 $\mu\text{g/ml}$.

La siguiente figura 3.3 muestra que para un mismo volumen de TNF- α adicionado, esto es, 200 μl por pocillo, una concentración del mismo igual a 0,75 $\mu\text{g/ml}$ da lugar a señales analíticas ligeramente inferiores a las obtenidas con una concentración de TNF- α igual a 1 $\mu\text{g/ml}$, por lo que se demuestra nuevamente una mejor sensibilización de las placas ELISA con esta concentración.

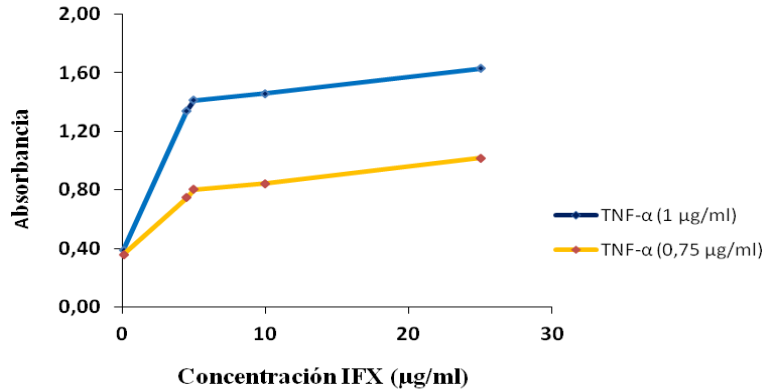


Figura 3.3. Comparación de resultados tras el desarrollo del método ELISA con dos concentraciones de TNF- α (200 μ l/pocillo).

Por tanto, y dado los resultados obtenidos, el volumen adicionado de **TNF- α** mediante el cual queda asegurada una adecuada sensibilización de las placas, asegurando siempre un exceso del mismo con respecto a la cantidad de IFX, fue de **200 μ l por pocillo** de TNF- α a una **concentración de 1 μ g/ml**.

3.7. Selección de las variables restantes

La selección del tampón de bloqueo de las placas ELISA sensibilizadas con TNF- α , de la disolución de lavado de esas mismas placas ELISA, el número de ciclos de lavado y aspiración, la temperatura y los tiempos de incubación, así como la enzima de marcaje y su sustrato y el reactivo de parada de la reacción enzimática, se realizó a partir de la bibliografía consultada, ya que estos parámetros son bien conocidos y empleados en ELISAs. De tal forma, se seleccionaron los parámetros y valores más comúnmente empleadas y que son:

- a. Con objeto de asegurar la fijación de TNF- α a las placas ELISA y de cubrir los huecos vacíos restantes, se empleó una disolución

Capítulo III

tampón de bloqueo consistente en leche en polvo 2% (w/v) + PBS 0,15 M pH 7,4 – Tween 20 0,3 % (v/v)

- b. Para llevar a cabo el lavado de las placas ELISA tras cada incubación, fue empleada como disolución tampón de lavado una disolución de PBS 0,15 M pH 7,4 – Tween 20 0,3 % (v/v)
- c. El número de ciclos de lavado y aspiración realizados tras cada etapa fue de 4 ciclos.
- d. La temperatura y tiempos de incubación empleados tras la adición de los distintos reactivos fueron:
 - d.1. Tras la adición de TNF- α a la placa, ésta se incubaba a 4°C durante 18 horas (esta etapa se desarrolla durante la noche, “overnight”) y cubierta con parafilm.
 - d.2. Tras la adición de la disolución bloqueante, se incubaba la placa nuevamente cubierta con parafilm a 37°C durante 2 horas.
 - d.3. Tras la adición del Ab primario - IFX -, las placas cubiertas con parafilm son incubadas a 37°C durante 45 minutos, para dar lugar a la reacción Ag-Ab.
 - d.4. Tras la adición del Ab secundario conjugado, de nuevo las placas cubiertas con parafilm son incubadas a 37°C durante 30 minutos.
 - d.5. Tras la adición del sustrato, las placas, esta vez sin ser cubiertas con parafilm, son incubadas a temperatura ambiente durante 20 minutos y en oscuridad.
 - d.6. Por último, tras llevar a cabo la parada de la reacción, la lectura se hizo de forma inmediata.

- e. Enzima de marcaje: el Ab secundario seleccionado para llevar a cabo la reacción enzimática puede estar conjugado con diferentes tipos de enzimas, tal y como quedó descrito en la Introducción de esta Tesis Doctoral. De entre las enzimas disponibles en el mercado, y por las mismas razones expuestas en el Capítulo anterior, se seleccionó la peroxidasa.
- f. Sustrato de la reacción enzimática: una vez elegida la enzima de marcaje, dado que no es específica para una única reacción, se seleccionó como sustrato el OPD Sigmafast™, ya que la bibliografía indica que es uno de los reactivos empleados como sustrato que da lugar a mayor sensibilidad.
- g. Reactivo de parada de la reacción enzimática: este viene impuesto por el sustrato empleado, y es el H₂SO₄ a una concentración 1 M, como ya ha sido citado en el Capítulo anterior.

4. DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS DEL ELISA DESARROLLADO

Una vez optimizadas y seleccionados los diversos factores y variables del ELISA desarrollado, a continuación se describen las etapas en las que se lleva a cabo dicho ELISA, que es un ELISA indirecto no competitivo y que quedan esquematizadas en la figura 3.4.

ETAPA 1. SENSIBILIZACIÓN DE PLACAS DE MICROTITULACIÓN

Las placas de microtitulación son sensibilizadas por incubación con 200 µl/pocillo de la disolución de TNF- α de concentración 1 µg/ml. Este es el Ag específico contra el que actúa el mAb IFX.

Una vez adicionado el Ag, se procede con la incubación de las placas cubiertas con parafilm en una cámara frigorífica a 4°C durante 18 horas (overnight).

Capítulo III

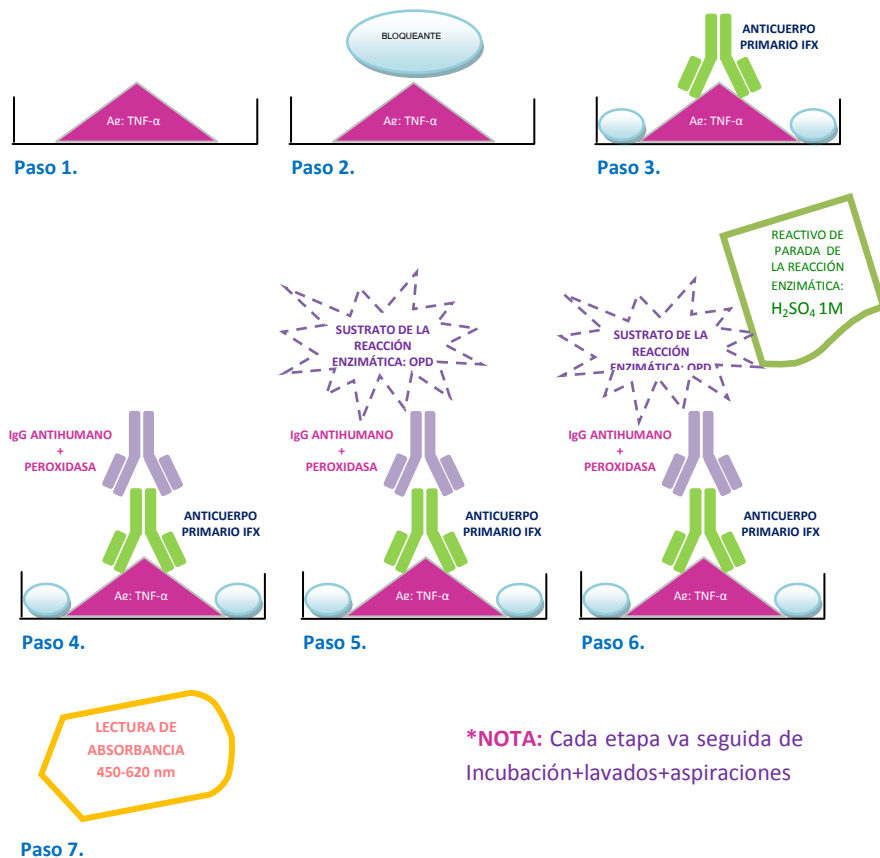


Figura 3.4. Esquema de las diferentes etapas del ELISA indirecto no competitivo desarrollado. Fuente: elaboración propia.

ETAPA 2. LAVADO Y ASPIRACIÓN

Transcurridas las 18 horas de incubación y con objeto de eliminar los restos de TNF- α que no queden adheridos al material plástico de los pocillos, las placas se someten a cuatro ciclos de lavado alternados con aspiraciones, siendo dispensados 250 μ l de solución de lavado PBS 0,15 M pH 7,4 con Tween 20 0,3 % (v/v) por pocillo y ciclo.

ETAPA 3. ADICIÓN DEL BLOQUEANTE-CONSERVANTE

A continuación se procede al bloqueo del TNF- α adicionado sobre los pocillos. Para ello, se añade la disolución bloqueante (100 μ l/pocillo), que actúa adhiriendo dicho Ag completamente a los pocillos y cubriendo los huecos donde ésta no se haya adherido. Además, la adición del bloqueante-conservante permite evitar la posterior adsorción de las muestras de IFX sobre posibles huecos que queden sin cubrir en la placa y que darían lugar a la obtención de señales analíticas erróneas. El bloqueante-conservante usado es leche en polvo al 2 % (w/v) diluida en PBS 0,15 M pH 7,4 con Tween 20 0,3 % (v/v).

ETAPA 4. INCUBACIÓN

Tras la adición del bloqueante y una vez cubiertas las placas con parafilm, estas son sometidas de nuevo a incubación a una temperatura de 37°C y durante 2 horas para conseguir un óptimo bloqueo de las placas sensibilizadas.

ETAPA 5. LAVADO Y ASPIRACIÓN

Tras la incubación llevada a cabo, las placas son sometidas de nuevo a lavado y aspiración siguiendo el procedimiento citado anteriormente en la etapa 2, en este caso para eliminar los restos de la disolución de bloqueo.

ETAPA 6. ADICIÓN DEL mAb OBJETO DE ESTUDIO, IFX

Una vez sensibilizadas las placas con TNF- α y bloqueadas adecuadamente, se adiciona en cada pocillo 100 μ l de disolución de IFX objeto de análisis, diluida previamente a concentración comprendida entre 50 y 0,02 μ g/ml con tampón carbonato 0,1 M pH 9,6. De esta forma se desarrollará sobre cada pocillo la reacción Ag-Ab, de la extensión de la cual dependerá la señal analítica posteriormente medida.

Capítulo III

ETAPA 7. INCUBACIÓN

Tras la adición del Ab primario IFX y una vez cubiertas las placas con parafilm, éstas son sometidas de nuevo a incubación a una temperatura de 37°C y durante 45 minutos, tiempo durante el cual se desarrollará la reacción Ag-Ab que permitirá evaluar la actividad biológica de IFX.

ETAPA 8. LAVADO Y ASPIRACIÓN

Tras la incubación, las placas son sometidas de nuevo a ciclos de lavado y aspiración siguiendo el procedimiento citado anteriormente en la etapa 2 y con objeto de eliminar los restos del Ag-Ab formado durante las etapas anteriores.

ETAPA 9. ADICIÓN DE Ab SECUNDARIO (CONJUGADO)

A continuación, se procede a adicionar el conjugado, concretamente el Ab IgG antihumano marcado con la enzima peroxidasa producido en conejo. Su selección, tal y como quedó descrito en el Capítulo I de la presente Tesis Doctoral, se basó en la mayor sensibilidad presentada por este Ab conjugado frente a la mostrada por el Ab conjugado IgG antiratón marcado con peroxidasa para el ensayo. Se adicionan 100 µl por pocillo.

ETAPA 10. INCUBACIÓN

A continuación, se incuban de nuevo las placas con el conjugado, cubiertas con parafilm, a 37°C durante 30 minutos en una cámara de incubación para que tenga lugar la reacción específica IFX/Conjugado.

ETAPA 11. LAVADO Y ASPIRACIÓN

Transcurridos los 30 minutos de incubación las placas se someten de nuevo a cuatro ciclos de lavado y aspiración siguiendo el protocolo descrito en la etapa 2 y con la finalidad de eliminar los restos de la disolución del conjugado.

ETAPA 12. ADICIÓN DEL SUSTRATO

Al igual que para el ELISA directo desarrollado para la determinación de IFX y descrito en el Capítulo anterior, como reactivo de la reacción enzimática se emplea OPD SigmafastTM. Este reactivo es usado habitualmente como sustrato de la reacción enzimática de la enzima peroxidasa. Se adiciona 100 µl de disolución de reactivo por pocillo.

ETAPA 13. INCUBACIÓN

Una vez adicionado el sustrato, las placas vuelven a incubarse sin ser cubiertas, en oscuridad y a temperatura ambiente durante 20 minutos, para dar lugar a que se produzca la reacción colorimétrica entre la enzima peroxidasa y su sustrato el OPD-H₂O₂

ETAPA 14. PARADA DE LA REACCIÓN

Como ya se comentó en el Capítulo anterior, la reacción enzimática se detiene tras un cambio brusco de pH a valores muy bajos. Para ello, y transcurridos los 20 minutos de incubación, se procede a paralizar la reacción enzimática mediante la adición de H₂SO₄ 1 M, adicionando en este caso 50 µl de esta disolución de parada por pocillo. Las disoluciones de los pocillos adquieren una coloración marrón-anaranjada con distintas intensidades dependientes de la concentración inicial de IFX en la muestra.

ETAPA 15. MEDIDA DE LA ABSORBANCIA

La absorbancia es medida mediante el uso del lector de absorbancia de placas de microtitulación. Para ello se emplean dos filtros de lectura centrados a las longitudes de onda (λ) de 450 nm y 620 nm, respectivamente.

La absorbancia obtenida es la resultante de la diferencia entre las absorbancias medidas a 450 nm y las medidas a 620 nm. Dado que el

Capítulo III

resultado final de la reacción enzimática es un compuesto de color anaranjado, no presentará absorción a la longitud de onda de 620 nm y sí a la de 450 nm. La lectura a 620 nm actúa como un blanco de referencia, restando la señal a esa longitud de onda de la señal propia debida al compuesto de interés (IFX) a 450 nm.

5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ELISA

5.1. *Validación del método ELISA propuesto*

La validación del método propuesto ha sido llevada a cabo tal y como se describe en el Capítulo I, siguiendo principalmente las recomendaciones descritas en las guías ICH Q1A (R2) (Stability Testing of New Drug Substances and Products) [9], ICH Q2 (R1) (Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology) [10], ICH Q1B (Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products) [11] y en estudios de validación específicos de inmunoensayos [12-14]. Así, siguiendo estas recomendaciones de validación, se ha abordado el estudio de:

- Función de calibrado.
- Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).
- Intervalo de detección (ID) e intervalo de cuantificación (IC).
- Precisión, evaluada estudiando la precisión intra-día y la precisión inter-día (repetibilidad y reproducibilidad respectivamente).
- Exactitud/veracidad como porcentaje de recuperación.
- Especificidad/selectividad evaluada mediante un estudio de reacciones cruzadas.

5.1.1. **Función de calibrado**

A partir de los datos obtenidos en el estudio de sensibilización de la placa anteriormente descrito, se seleccionó el intervalo de concentración de IFX

(a niveles de $\mu\text{g/ml}$), que permite obtener una señal analítica de absorbancia que esté relacionada con la concentración de las muestras de IFX. Este intervalo es de $50 \mu\text{g/ml}$ a $0,02 \mu\text{g/ml}$. Se procedió, por tanto, a seleccionar y caracterizar el modelo matemático al que mejor se ajusten los datos experimentales de concentración/absorbancia.

Se partió de disoluciones estándar de IFX, preparadas a partir del medicamento reconstituido, Remicade[®], y considerando para este estudio dicho medicamento como patrón -como ya fue comentado en el Capítulo I-. Las concentraciones empleadas fueron $50 \mu\text{g/ml}$; $25 \mu\text{g/ml}$; $10 \mu\text{g/ml}$; $5 \mu\text{g/ml}$; $0,1 \mu\text{g/ml}$; $0,04 \mu\text{g/ml}$ y $0,02 \mu\text{g/ml}$; preparadas por triplicado y aplicando el método ELISA propuesto. A partir de los datos de absorbancia obtenidos para cada disolución, se estudió el modelo matemático que mejor se ajustara a los resultados experimentales mediante el empleo del método de mínimos cuadrados parciales, siendo para este caso concreto, un modelo matemático logarítmico neperiano. Por tanto, se establece que la relación entre la concentración de IFX en el intervalo de concentraciones estudiado y la absorbancia se ajusta a una función logarítmica neperiana cuya ecuación es la siguiente:

$$y (\text{Absorbancia}) = 0,203 \ln [x (\text{Concentración})] + 0,96$$

El coeficiente de correlación (r) obtenido fue 0,982 (Figura 3.5), lo cual indica que hay una fuerte relación entre las variables.

Capítulo III

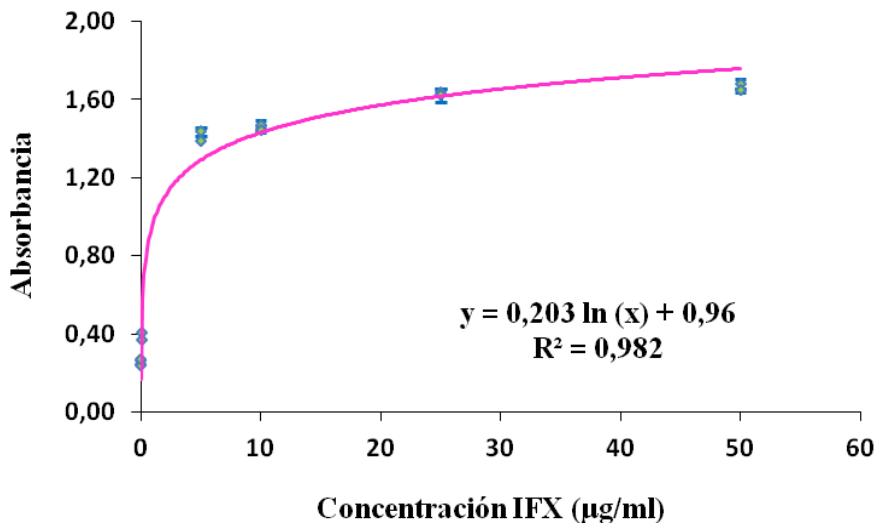


Figura 3.5. Función de calibrado TNF- α -IFX mediante ELISA indirecto no competitivo.

Los parámetros estadísticos de la función de calibrado obtenida se muestran en la tabla 3.2.

Dado que el P-Valor de la pendiente y de la ordenada en el origen es inferior a 0,05, se puede afirmar que existe relación estadísticamente significativa entre absorbancia y concentración para un nivel de confianza del 95 %, siendo por tanto su valor el establecido en el modelo.

Tabla 3.2. Parámetros estadísticos de la función logarítmica de calibrado de IFX.

Parámetro		Valor
Función		$A = 0,203 \ln [\text{IFX}] + 0,96$
s (a) ⁽¹⁾		0,02
s (b) ⁽²⁾		0,008
Error estándar del estadístico		0,0897
R ² (%) ⁽³⁾		98,2
P-Valor	ordenada	0,0000
	pendiente	0,0000
Intervalo de aplicabilidad		0,01-10 (µg/ml)

1. Desviación estándar del intercepto.
2. Desviación estándar de la pendiente.
3. Coeficiente de correlación en porcentaje.

Ya que el modelo matemático al que se ajustan los datos experimentales de concentración/absorbancia se corresponde con un modelo logarítmico, se puede observar a través de la gráfica 3.5, que a concentraciones superiores a **10 µg/ml**, las señales analíticas de absorbancia no sufren mucha variación con la concentración, por lo que, se estableció este valor de concentración como el **máximo de la aplicabilidad de la función de calibrado**.

Para estudiar la homogeneidad de varianzas se hizo el análisis gráfico de los residuos como sugieren Boqué y Rius [15], para obtener la representación gráfica de los residuos frente a la concentración. Mediante

Capítulo III

esta representación podemos además detectar la presencia de valores atípicos. En la figura 3.6 se muestra la gráfica correspondiente a dichos residuos.

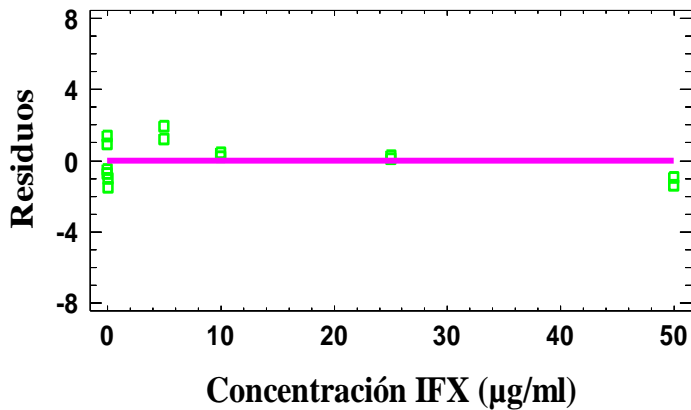


Figura 3.6. Gráfico de residuos de IFX

Se observa que se cumple la premisa fijada para el cumplimiento de la homogeneidad de varianzas, estando los residuos aleatoriamente distribuidos alrededor de cero.

Por tanto, es posible afirmar que, a partir de los valores obtenidos tanto de coeficiente de regresión como en el análisis gráfico de los residuos, la respuesta de la señal obtenida con la concentración de IFX es logarítmica en el intervalo de concentraciones estudiado, y que su comportamiento se ajusta a la función que se muestra en la tabla 3.2.

5.1.2. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

Para determinar la menor concentración o la cantidad más baja de IFX que puede ser detectada en una muestra, se calculó el límite de detección, el cual se obtuvo aplicando la siguiente ecuación, tal y como se indicó en el Capítulo I:

$$LD = S_C \times K = S_C \times 3$$

donde s_c es la desviación estándar de diez muestras blanco y K es un factor numérico cuyo valor es 3, valor que supone un nivel de confianza del 99,86 %.

Para determinar la menor concentración de IFX que puede ser cuantificada con adecuada precisión y exactitud en una muestra, se calculó el límite de cuantificación, obtenido mediante el empleo de la ecuación:

$$LC = S_C \times K = S_C \times 10$$

donde, y al igual que para el cálculo del límite de detección, s_c es la desviación estándar de 10 muestras blanco y K tiene un valor igual a 10, valor que supone un nivel de confianza del 99,86 %.

El límite de detección y de cuantificación son 0,009 µg/ml y 0,01 µg/ml respectivamente.

5.1.3. Intervalo de detección (ID) e intervalo de cuantificación (IC)

A partir de los datos obtenidos de límite de detección y límite de cuantificación se estableció el **intervalo de detección (ID)**.

Capítulo III

Además, el **intervalo de cuantificación del método (IC)** se define desde el límite de cuantificación hasta la concentración máxima ensayada donde la señal analítica varía con la concentración, en este caso, como ha sido indicado anteriormente, hasta 10 µg/ml.

La tabla 3.3 muestra los resultados obtenidos para el intervalo de detección y el intervalo de cuantificación del método.

Tabla 3.3. ID e IC del modelo establecido para IFX

ID	0,009-0,01 µg/ml
IC	0,01-10 µg/ml

Los resultados obtenidos para el límite de detección y el límite de cuantificación, 0,009 µg/ml y 0,01 µg/ml respectivamente, indican que el método propuesto es sensible para el intervalo de concentraciones propuesto. Además, se establece un intervalo de detección comprendido entre 0,009 y 0,01 µg/ml y un intervalo de cuantificación comprendido entre 0,01 y 10 µg/ml.

5.1.4. Precisión

La precisión fue evaluada estudiando la precisión intra-día (repetibilidad) e inter-día (reproducibilidad) (4 y 3 días).

La repetibilidad fue calculada mediante el análisis de 10 muestras de trabajo estándar preparadas a la misma concentración, el mismo día y bajo las mismas condiciones experimentales. La reproducibilidad fue calculada mediante el análisis de 10 muestras patrón a la misma concentración,

durante 4 y 3 días y bajo las mismas condiciones experimentales. La repetibilidad y la reproducibilidad fueron expresadas como la DER (%) de las concentraciones calculadas a partir de las señales analíticas obtenidas usando la función de calibrado estándar.

La evaluación de dicha repetibilidad fue establecida para tres concentraciones diferentes: 5 µg/ml, 2 µg/ml y 0,1 µg/ml y la reproducibilidad para las concentraciones 5 µg/ml y 2 µg/ml. Las tablas 3.4 y 3.5 muestran los resultados obtenidos.

Tabla 3.4. Precisión intra-día (repetibilidad) de IFX.

IFX concentración (µg/ml)	Promedio concentración 10 réplicas (µg/ml)	Desviación estándar (DE) (µg/ml)	DER (%)
5	5,4	0,3	5,5
2	1,8	0,1	7,7
0,1	0,070	0,004	6,4

Capítulo III

Tabla 3.5. Precisión inter-día (reproducibilidad) de IFX.

IFX concentración (µg/ml)	Día control	Promedio concentración 10 réplicas/día	Promedio concentración (4 días)	Desviación estándar (DE) (µg/ml)	DER (%)
5	1	6,0	5,9	0,4	6,6
	2	6,0			
	3	5,3			
	4	6,2			
2	1	2,2	2,2	0,2	7,2
	2	2,1			
	3	2,4			

La precisión intra-día e inter-día de las concentraciones estudiadas de IFX 5 µg/ml, 2 µg/ml y 0,1 µg/ml fue menor al 10 % en todos los casos, por tanto, podemos concluir que **el método es repetitivo y reproducible** para las condiciones de trabajo seleccionadas, por lo que el método ELISA propuesto **es preciso**.

5.1.5. Exactitud/veracidad

La exactitud (veracidad) fue evaluada a partir del estudio de recuperación, mediante el análisis de 10 muestras de trabajo estándar. La exactitud fue estimada a partir del porcentaje de recuperación de la concentración calculada de disolución estándar. La evaluación de dicha exactitud fue realizada a dos concentraciones diferentes: 5 µg/ml y 2 µg/ml.

El porcentaje de recuperación fue calculado mediante la ecuación:

$$\frac{\text{Concentración obtenida } (\mu\text{g/ml})}{\text{Concentración ensayada } (\mu\text{g/ml})} \times 100 = \text{Porcentaje de recuperación}$$

La tabla 3.6 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 3.6. Estudio de recuperación.

IFX concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Promedio concentración 10 réplicas ($\mu\text{g/ml}$)	Recuperación (%)
5	5,1	102,4
2	1,9	96,5

El porcentaje de **recuperación** obtenido fue **mayor del 96 %** para las dos concentraciones ensayadas, por tanto dichos porcentajes de **recuperación** se encuentran dentro del criterio previo establecido de aceptación, $\pm 10 \%$ con respecto a la concentración inicial. De tal manera se puede afirmar que **el método ELISA propuesto es exacto para la finalidad que se propone, la determinación de la concentración de IFX en medicamentos y/o preparaciones farmacéuticas.**

Ambas, precisión y exactitud cumplen con los criterios de aceptación indicados para la validación de inmunoensayos, los cuales recomiendan que la DER (%) sea $\leq 20 \%$ [14].

Capítulo III

5.1.6. Especificidad/selectividad

La especificidad/selectividad del método fue evaluada mediante un estudio de reacciones cruzadas en el que fueron analizadas varias disoluciones estándar de trabajo de diferentes mAbs usando el método ELISA indirecto no competitivo desarrollado para IFX y no específico para ellos y estudios de degradación acelerada.

→ *Estudio de reacciones cruzadas*

Al objeto de estimar la posible interferencia producida por mAbs similares en el análisis de IFX, se evalúa la aplicabilidad del ELISA propuesto para IFX para el análisis de otros mAbs, es decir, se evalúa la posibilidad de que se establezca reacción específica TNF- α /mAbs diferente a IFX. Para ello, las placas de microtitulación sensibilizadas con TNF- α son sometidas a la acción de otros mAbs no específicos, para los cuales su Ag es diferente. Los mAbs ensayados fueron: BVZ, CTX, RTX y TTZ.

La concentración seleccionada para dichos mAbs fue la misma en todos los casos, con objeto de poder realizar una posterior comparación de los resultados obtenidos. Así, la concentración a la que fueron ensayados BVZ, CTX, RTX y TTZ fue 2 μ g/ml. La tabla 3.7 muestra los resultados obtenidos en este estudio.

Tabla 3.7. Estudio de reacciones cruzadas. ELISA específico para IFX.

mAb específico	Concentración TNF- α (μ g/ml)	mAb no específico	Concentración mAbs no específico (μ g/ml)	Concentración obtenida mAb específico (μ g/ml)	Promedio concentración obtenida mAb no específico (μ g/ml)
IFX	1	BVZ	2	2,07	0,16
		CTX			0,23
		RTX			0,19
		TTZ			0,21

Dado que las señales analíticas obtenidas para los cuatro mAbs no específicos analizados mediante el método ELISA desarrollado para IFX se corresponden con valores de concentraciones muy por debajo de la ensayada, es decir, valores de absorbancia correspondientes a concentraciones que oscilan entre 0,16-0,23 $\mu\text{g/ml}$ frente a los 2 $\mu\text{g/ml}$ ensayados, se puede afirmar que no se producen reacciones cruzadas entre los cuatro IgG1 estudiados y que por tanto, el método ELISA propuesto es específico para la cuantificación de IFX y no de otros FBIOs.

5.2. *Estudios de degradación acelerada*

Varias muestras obtenidas a partir de un vial de Remicade[®] 10 mg/ml, reconstituido en agua para inyectables, fueron sometidas a diferentes tipos de degradación y posteriormente analizadas mediante el método ELISA desarrollado. En los casos en que el agente estresante es adicionado a la muestra de medicamento, se emplean 50 μl del mismo en 0,5 ml de disolución del mAb, por lo que la concentración de agente estresante final es del 10 % (v/v). Las muestras fueron analizadas 24 horas después de someter la muestra de IFX a la acción del agente estresante.

Las condiciones de estrés investigadas fueron la temperatura (50 y 70°C), exposición a la luz (cámara de envejecimiento), adición de un ácido (HCl 0,1M) y una base (NaOH 0,1M) y adición de un oxidante (H_2O_2 1 % v/v; H_2O_2 10 % v/v).

Para proceder con el análisis, las muestras sometidas a estrés fueron primeramente diluidas a concentración de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ con tampón carbonato 0,1 M pH 9,6. La actividad biológica, expresada como porcentaje de actividad remanente, fue comparada con la actividad biológica correspondiente a una muestra estándar preparada en el momento de realizar el análisis y que no ha sido sometida a ningún tratamiento de degradación. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.8.

Capítulo III

Tabla 3.8. Estudios de degradación forzada de Remicade® 10 mg/ml

AGENTE ESTRÉS	CONCENTRACIÓN OBTENIDA TRAS DEGRADACIÓN (mg/ml)	ACTIVIDAD REMANENTE (%)	ACTIVIDAD PERDIDA (%)
NaOH 0.1M ⁽¹⁾	5,6	56,0	44,0
HCl 0.1M ⁽¹⁾	6,3	63,2	36,8
H ₂ O ₂ 1 % ⁽¹⁾	6,5	65,3	34,7
H ₂ O ₂ 10 % ⁽¹⁾	5,9	59,0	41,0
T (50°C)	8,8	87,6	12,4
T (70°C)	0,03	0,3	99,7
LUZ VISIBLE	0,05	0,5	99,5

* Concentración inicial de Remicade®: 10 mg/ml

(1) Concentración de agente estresante: 10 % (v/v) (50 µl de agente estresante añadidos a 0,5 ml de Remicade®).

La exposición del MB a elevadas temperaturas puede dar lugar a cambios conformacionales en la estructura de la proteína como puede ser el despliegue total o parcial de la misma que puede a su vez provocar otras reacciones de degradación como la formación de agregados. Esta desestabilización gradual de la proteína se produce de forma más intensa cuanto mayor es la temperatura a la que es expuesta la misma. Para la mayoría de proteínas, el despliegue térmico es irreversible, porque va acompañado o seguido por la agregación, lo cual puede provocar una disminución en la funcionalidad de la proteína [16].

En este caso, de los resultados obtenidos se puede concluir que, sorprendentemente, las muestras de Remicade® expuestas a la acción de

una temperatura de 50°C son las que conservan mayor actividad biológica. Sin embargo, cuando el MB es sometido durante 24 horas a una temperatura de 70°C se degrada totalmente, dando lugar a la formación de un precipitado de color blanco sin actividad biológica.

Por otra parte, la exposición de IFX a la luz puede provocar cambios tanto en su estructura como en su conformación y en la composición de su formulación. Además, la luz puede provocar la oxidación de esta proteína, la cual puede ser causada por la formación de especies reactivas del oxígeno. Esta fotodegradación conduce principalmente a cambios en los aminoácidos individuales, pero también conduce a múltiples reacciones cruzadas debido a la formación de ditirosina o de disulfuro y a la agregación no covalente. Tal y como se ha demostrado en literatura, varias proteínas terapéuticas son sensibles a la exposición de la luz, como por ejemplo, el factor VIII Humano recombinantes [17], el Interferón- α 2a humano recombinante [18] y un anticuerpo monoclonal IgG1 humano, sufriendo ante la exposición a la misma una decoloración acompañada de la pérdida de actividad [17] [19] y la formación de diversos productos de degradación física [18] [19]. Al igual que ocurre en estas proteínas terapéuticas, los resultados obtenidos muestran que Remicade[®] también es sensible a la exposición a la luz visible, dándose una pérdida total de su funcionalidad [16].

Mediante la adición de una base la pérdida de actividad biológica que sufre Remicade[®] es mayor que cuando es adicionado un ácido, siendo la pérdida de actividad de un 36,8 % y 44 %, respectivamente. Esta pérdida de actividad ante la exposición a dos pH extremos probablemente sea debida a la desamidación producida en la proteína ante tal exposición [16].

La exposición a un medio oxidante supone una pérdida de la actividad inicial de IFX por encima del 59 %. Esto puede ser debido a que los productos resultantes de la oxidación como la formación de radicales libres, oxidación de residuos aminoacídicos como la metionina o la histidina o la generación de especies de oxígeno reactivas, pueden mostrar

Capítulo III

una bioactividad y conformación alteradas que dará lugar a esa pérdida de funcionalidad del mAb con respecto a su actividad inicial [16].

5.3. Aplicación del método ELISA propuesto. Evaluación de la actividad biológica en el tiempo de IFX (Remicade®)

El método ELISA indirecto no competitivo desarrollado y validado se aplicó en un estudio de estabilidad en el tiempo empleando tres viales de Remicade® procedentes de lotes diferentes, reconstituidos y almacenados en condiciones hospitalarias habituales, es decir, muestras reconstituidas en agua para inyectables a concentración final de 10 mg/ml; de estos viales fueron extraídas alícuotas que se almacenaron protegidas de la luz a 4°C (refrigeradas) y a -20°C (congeladas).

Así, una alícuota de cada vial de Remicade® recién abierto fue analizada mediante el método ELISA propuesto. El resto de alícuotas fueron conservadas a 4°C y -20°C en viales de congelación topacio de 2 ml. Con objeto de obtener una concentración de ensayo adecuada, las muestras conservadas bajo las condiciones descritas anteriormente (y tras su descongelación a temperatura ambiente en el caso de las muestras conservadas a -20°C) fueron diluidas los días de control en tampón carbonato 0,1 M pH 9,6 justo en el momento de realizar el ensayo. Fueron analizadas tres réplicas de cada una de las alícuotas conservadas.

Uno de los viales de Remicade® fue analizado durante 17 días conservado a 4 °C. El segundo vial de Remicade® perteneciente a un lote diferente, fue analizado durante 3 días para la misma temperatura de conservación (4 °C) y el tercer vial fue analizado durante 6 días.

Alícuotas de dos viales diferentes de Remicade® fueron conservadas congeladas a -20 °C y analizadas durante 3 días para uno de los viales y 6 días para el otro vial perteneciente a un lote diferente.

La extensión en el tiempo (días) del estudio de estabilidad estuvo condicionada por los resultados, de forma que al alcanzar un determinado

porcentaje de disminución en la actividad biológica del IFX se finalizaba el estudio.

La actividad biológica fue expresada como porcentaje de actividad biológica remanente en comparación con la actividad inicial del mAb IFX en cada momento de control, siendo la actividad biológica inicial la obtenida del análisis realizado durante el primer día control (Día 0) y recién abierto el vial de Remicade®.

Para el cálculo de la actividad biológica remanente se empleó la siguiente expresión:

$$\text{Concentración día control} \times 100 \div \text{Concentración día 0} = \text{Porcentaje de actividad biológica remanente (expresada en unidades de concentración)}$$

A partir de este dato de porcentaje de actividad biológica remanente se obtiene fácilmente la pérdida o disminución de actividad mediante la expresión:

$$100 - \text{Actividad remanente (\%)} = \text{Pérdida de actividad (\%)}$$

La tabla 3.9 muestra los resultados de actividad remanente y de pérdida de actividad obtenidos en los diferentes días de control para los tres viales de Remicade® ensayados y conservados refrigerados a 4°C. Estos datos son representados gráficamente en la figura 3.7.

Capítulo III

Tabla 3.9. Estabilidad de tres viales de Remicade® 10 mg/ml conservados a 4°C.

Nº VIAL	DIA CONTROL	PROMEDIO CONCENTRACIÓN (mg/ml)	ACTIVIDAD REMANENTE (%)	ACTIVIDAD PERDIDA (%)
1 (06.11.12)	0	10	100	0
	1	5,1	51,1	48,9
	2	3,3	32,5	67,5
	15	1,7	16,6	83,4
	17	1,6	16,3	83,7
2 (20.11.12)	0	10	100	0
	3	2,1	21,3	78,7
3 (14.05.13)	0	10	100	0
	1	4,4	44,1	55,9
	2	4,5	45,3	54,7
	3	2,0	20,4	79,6
	6	1,4	14,1	85,9

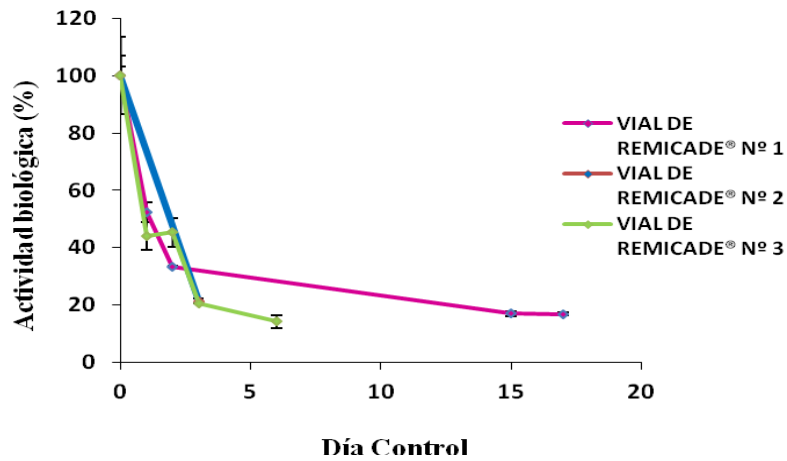


Figura 3.7. Estabilidad de tres viales de Remicade® 10 mg/ml conservados a 4°C.

La tabla 3.10 muestra los resultados de actividad remanente y de pérdida de actividad obtenidos en los diferentes días de control para los dos viales de Remicade® ensayados y conservados congelados a -20°C, quedando representados gráficamente dichos resultados en la figura 3.8.

Tabla 3.10. Estabilidad de dos viales de Remicade® 10 mg/ml conservados a -20°C.

Nº VIAL	DIA CONTROL	PROMEDIO CONCENTRACIÓN (mg/ml)	ACTIVIDAD REMANENTE (%)	ACTIVIDAD PERDIDA (%)
1 (20.11.12)	0	10	100	0
	3	3,1	30,6	69,4
2 (14.05.13)	0	10	100	0
	1	5,2	52,1	47,9
	2	4,7	46,6	53,4
	6	2,2	21,5	78,5

Capítulo III

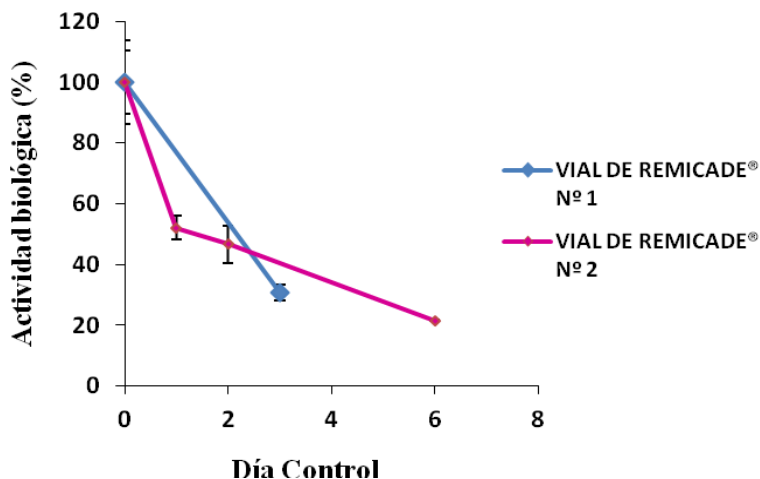


Figura 3.8. Estabilidad de dos viales de Remicade® 10 mg/ml conservados a -20°C.

Los resultados obtenidos muestran que la pérdida de actividad de Remicade® 10 mg/ml conservado a 4°C es próxima e incluso superior en uno de los viales ensayados (vial número 3) al 50 % de su actividad inicial el día 1 de control, incrementándose hasta un 55-67 % el día 2. La pérdida de actividad se produce de forma progresiva llegando a ser de un 80-86 % los días 3 y 6 de control respectivamente, porcentaje de pérdida de actividad que se mantiene hasta los 17 días de conservación.

Remicade® 10 mg/ml conservado a -20°C muestra una pérdida de actividad biológica muy similar a la producida cuando es conservado a 4 °C, así, para el día 1 de control, el porcentaje de pérdida de actividad es del 48 % aproximadamente con respecto a su actividad inicial, incrementándose hasta un 54 % el segundo día. Dicha pérdida de actividad va aumentando de forma progresiva en los siguientes días de ensayo, llegando a alcanzar un valor del 70 % el tercer día de control y un 79 % el sexto día.

Considerando el límite de $\pm 10\%$ usado en los estudios de estabilidad

práctica [20] [21] comúnmente empleados en los estudios de estabilidad en condiciones de uso hospitalario para los sobrantes de medicamentos y preparaciones farmacéuticas, estudios de mezclas de fármacos, etc., se puede concluir a la vista de los resultados obtenidos en el presente estudio que, la actividad biológica de Remicade[®] no se mantiene una vez abierto el vial más de 24 horas en las condiciones de conservación estudiadas (refrigerado a 4°C protegido de la luz y congelado a -20°C protegido de la luz), ya que el primer día de control se estima una disminución de la actividad como mínimo del 48 % en ambas condiciones de almacenamiento ensayadas y para medicamentos procedentes de diferentes lotes.

6. CONCLUSIONES

Dada la importancia de establecer la estabilidad del FBIO IFX, desde el punto de vista de su funcionalidad, en condiciones habituales de uso hospitalario, se ha desarrollado y validado un ELISA específico para éste, mediante el cual se hace reaccionar el mAb IFX con su Ag correspondiente, el TNF- α , reacción en la que basa su mecanismo de acción. De esta forma se puede establecer la funcionalidad de este MB.

El ELISA propuesto para la cuantificación de la actividad biológica del mAb IFX ha sido validado siguiendo las recomendaciones de organismos internacionales (ICHs entre otros), habiéndose obtenido resultados satisfactorios para los parámetros de calidad del método estudiados, esto es, el modelo de calibración, el intervalo de concentraciones de aplicación, los límites de detección y cuantificación, la exactitud, la precisión y la especificidad. Es por tanto un método válido para el objetivo perseguido, es decir, es un método de análisis adecuado para la determinación cuantitativa de actividad biológica del FBIO IFX en estudios en los que esta propiedad deba ser evaluada.

El método desarrollado ha sido aplicado en un estudio de estabilidad en el tiempo de varios viales del MB Remicade[®], una vez abiertos y reconstituidos tal y como indica su ficha técnica [22]. Alícuotas del

Capítulo III

mismo fueron conservadas protegidas de la luz refrigeradas a 4°C y congeladas a -20°C. Estas alícuotas fueron periódicamente analizadas en diferentes días control para cuantificar la actividad biológica remanente en las mismas. Para los tres viales conservados a 4°C, la duración del estudio fue de 17 días, 3 días y 6 días respectivamente. En el caso de los dos viales conservados a -20°C, la duración del estudio de estabilidad fue de 3 días para el primer vial y 6 días para el segundo. Los resultados obtenidos en estos estudios, indican que el medicamento una vez abierto no muestra diferencias significativas entre las dos condiciones de conservación ensayadas. Además, los resultados de actividad biológica obtenidos para muestras pertenecientes a lotes diferentes y conservadas a 4°C indican que la pérdida de actividad se produce de forma ligeramente más acelerada en una de las muestras, lo cual podría inducir a pensar en una posible existencia de diferente estabilidad entre lotes. Este hecho no ha sido corroborado con posteriores estudios.

Finalmente concluimos, que el método ELISA propuesto ha demostrado su aplicabilidad en estudios de estabilidad en el tiempo del mAb IFX, realizados en este caso concreto con objeto de aportar datos para evaluar la posible reutilización de forma segura y eficaz de los excedentes generados diarios de este medicamento en los servicios de farmacia hospitalaria, hecho que contribuiría a racionalizar el gasto farmacéutico debido a los elevados costes que suponen los tratamientos en los que está implicado el mAb IFX.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ryuji Ikeda *et al.* Stability of infliximab in polyvinyl chloride bags. *Am J Health Syst Pharm.* 2012 September 1; 69(17): 1509–1512.
- [2] Perry M. *et al.* Infliximab and adalimumab are stable in whole blood clotted samples for seven days at room temperature. *Ann Clin Biochem.* 2015 Nov; 52 (Pt 6):672-4.
- [3] Guirao S. *et al.* Stabilité de l'Infliximab en solutions diluées. Poster XXXI^{èmes} Journées d'Études de Pharmacie Hospitalière APHIF 17 et 18 novembre 2009.
- [4] Alsaddique J.A. *et al.* Effect of Thermal and Shear Stressors on the Physical Properties, Structural Integrity and Biological Activity of the Anti-TNF-alpha Monoclonal Antibody, Infliximab. *Curr Pharm Biotechnol.* 2016; 17(10):905-14.
- [5] Planinc A. *et al.* Batch-to-batch N-glycosylation study of infliximab, trastuzumab and bevacizumab, and stability study of bevacizumab. *Eur J Hosp Pharm.* September 2016. doi:10.1136/ejhpharm-2016-001022.
- [6] Beer P.M. *et al.* Infliximab stability after reconstitution, dilution, and storage under refrigeration. *Retina.* 2010 Jan; 30(1):81-4.
- [7] Vieillard V. *et al.* One-month stability study of a biosimilar of Infliximab (Remsima®) after dilution and storage at 4°C and 25°C. *Ann Pharm Fr. Volume 75, Issue 1, January 2017, Pages 17-29 Sep 19.*
- [8] Young B.L. *et al.* Evaluation of the physicochemical and functional stability of diluted REMSIMA® upon extended storage--A study compliant with NHS (UK) guidance. *Int J Pharm.* 2015 Dec 30; 496(2):421-31.
- [9] International Conference on Harmonization (ICH) guidelines ICH Q1A (R2), Stability Testing of New Drug Substances and Products.
- [10] International Conference on Harmonization (ICH) guidelines ICH Q2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.
- [11] International Conference on Harmonization (ICH) guidelines ICH Q1B, Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products.

Capítulo III

- [12] Lipton, C.R. *et al.* Guidelines for the validation and use of immunoassays for determination of introduced proteins in biotechnology enhanced crops and derived food ingredients. *Food Agric. Immunol.* 12 (2000)153-164.
- [13] Findlay, J.W.A. *et al.* Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *J Pharm. Biomed. Anal.* 21 (2000) 1249-1273.
- [14] De Silva, B. *et al.* Recommendations for the Bioanalytical Method Validation of Ligand-binding Assays to Support Pharmacokinetic Assessments of Macromolecules. *Pharmaceut. Res.* 20 (2003) 1885-1900.
- [15] Boqué R. y Rius F. X. Avances en Quimiometría Práctica. *Servicio de Publicaciones e Intercambio científico de la Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela (1994).*
- [16] Hawe A. *et al.* Reviews. Forced Degradation of Therapeutic Proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 101, N°. 3, March 2012.
- [17] Parti R. *et al.* In vitro stability of recombinant human factor VIII (recombinate). *Haemophilia.* 2000. 6(5):513–522.
- [18] Kim H.H *et al.* Photodegradation mechanism and reaction kinetics of recombinant human interferon-alpha2a. *Photochem Photobiol Sci.* 2007. 6(2):171–180.
- [19] Qi P. *et al.* Characterization of the photodegradation of a human IgG1 monoclonal antibody formulated as a high-concentration liquid dosage form. *J Pharm Sci.* 2009. 98(9):3117–3130.
- [20] Barrueco N. Estabilidad de medicamentos en la práctica clínica. De la seguridad a la eficiencia. *Farm Hosp.* 2013;37(3):175-177.
- [21] Bardin C. *et al.* Guidelines for the practical stability studies of anticancer drugs: A European consensus conference. *Ann Pharm Fr.* 2011;69:221-31.
- [22] Agencia Europea de Medicamentos (EMA). Ficha técnica de Remicade® (Infliximab). <http://www.ema.europa.eu>



CAPÍTULO IV

DETERMINACIÓN DE LA
ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE
BEVACIZUMAB (AVASTIN®)
MEDIANTE ELISA INDIRECTO

BVZ (Avastin[®]) es un mAb IgG1 recombinante humanizado que reconoce y neutraliza la actividad biológica de todas las isoformas del VEGF humano (anti-VEGF), capaz de prevenir la angiogénesis mediante la unión a VEGF extracelular-A impidiendo su unión a los receptores en las superficies de células endoteliales e inhibiendo, por tanto, la vía de señalización celular mediada por VEGF-A. Es empleado en el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico (CCRm), cáncer de mama metastásico (CMM), cáncer de pulmón no microcítico avanzado no resecable, metastásico o recidivante, cáncer de células renales avanzado y/o metastásico, cáncer avanzado de ovario epitelial, trompa de Falopio o peritoneal primario y como terapia de segunda línea para el glioblastoma multiforme y glioblastoma recurrente. Fuera de indicación autorizada se emplea en el tratamiento de la DMAE, retinopatía diabética proliferativa, edema macular diabético y oclusión venosa retiniana [1].

1. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE BEVACIZUMAB

La estabilidad de BVZ, en sus diferentes formas de administración, es la más estudiada de todos los mAbs comerciales. Esto es debido al amplio uso que se hace del medicamento, i.e Avastin[®], fuera de indicación autorizada (uso “out label”). Este hecho ha promovido la realización de estudios de estabilidad, sobre todo, considerando la evaluación de la actividad biológica en las nuevas formas de administración que se requieren para los nuevos usos (usos compasivos en muchos de los casos).

Además, al tratarse de uno de los mAbs empleados con mayor frecuencia y en mayor número de indicaciones terapéuticas, los estudios realizados en relación con el mismo son múltiples. Así, la actividad de BVZ ha sido evaluada desde su aprobación mediante diversas técnicas analíticas. Estos estudios tienen como objetivo: la realización de un seguimiento clínico de pacientes (monitorización) [2-5]; seguimiento y descubrimiento de nuevas indicaciones [6] [7] [8] [9]; determinación de la contaminación

Capítulo IV

microbiana sufrida a lo largo del tiempo de almacenamiento y durante su preparación y administración [10] [11]; determinación de las posibles modificaciones que puede sufrir BVZ en cuanto a eficacia, seguridad y estabilidad se refiere, una vez administrado [12]; observación de los efectos tanto beneficiosos como adversos a los que dan lugar los tratamientos en los que está implicado BVZ [13] [10-17]; descubrimiento de nuevas indicaciones del fármaco o nuevas pautas de administración que puedan suponer un beneficio tanto clínico como económico, debido al alto coste de estas terapias biológicas [18] [19]; comparación entre BVZ y otros fármacos indicados para las mismas situaciones patológicas [20-26], entre otros.

Pero, tal y como quedó descrito en la Introducción de la presente Tesis Doctoral, a pesar de que los mAbs como BVZ tienen una buena estabilidad comparados a otras proteínas, este tipo de fármacos (que son también proteínas) requieren unas condiciones específicas de conservación para asegurar su estabilidad tanto físico-química como biológica y su pureza. Sin embargo, su exposición a condiciones diferentes a las óptimas se suele dar de forma frecuente en el uso habitual de los mismos [27]. Este hecho hace necesaria la determinación de la estabilidad en el tiempo de este tipo de fármacos en condiciones de conservación diferentes a las indicadas por el fabricante, con objeto de determinar tanto la estabilidad en condiciones normales de uso, como optimizar el uso del mismo y reducir los costes que supone su empleo [28].

La bibliografía consultada muestra que las investigaciones dirigidas a determinar la estabilidad de BVZ, se centran en el estudio de sus propiedades físico-químicas y microbiológicas en diferentes condiciones de conservación y mediante el empleo de múltiples técnicas analíticas, siendo los estudios de estabilidad biológica muy poco comunes en la literatura. Algunos de los ensayos de estabilidad realizados con BVZ son los mostrados a continuación.

La vida media de BVZ *in vivo* es de unas 3 semanas, por eso es razonable asumir que un vial no abierto de BVZ conservado por error o accidentalmente durante 1-2 días a temperatura ambiente, no se alterará

significativamente. Sin embargo, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, los stocks deben ser desechados si se ha interrumpido la cadena de frío, o en el caso de una refrigeración insuficiente durante un fin de semana, y esto supone un residuo muy caro. De ahí, que durante los últimos años, sean varios los ensayos realizados que intentan demostrar la estabilidad de muestras de BVZ estudiadas en diferentes formulaciones, envases y condiciones de conservación.

Así, M. Paul *et al.* [29] apoyan el uso fuera de indicación de BVZ reenvasado para administración intravítrea, al menos desde un punto de vista farmacéutico, con una estabilidad validada de 3 meses. En dicho estudio, fueron usados varios métodos analíticos complementarios indicadores de la estabilidad para evaluar en detalle la estructura primaria, secundaria y terciaria del Ab durante su conservación. Para ello se empleó: la cromatografía iónica y de exclusión por tamaño, mapeo peptídico, espectroscopia UV y de IR, turbidimetría, espectroscopia de difracción láser, estudio de desnaturalización térmica, examen microscópico y análisis de imágenes. Con este estudio demuestran que la disolución de BVZ puede ser reenvasada en jeringas de polipropileno de forma segura durante 3 meses a 4°C sin sufrir alteraciones de su estructura primaria, secundaria y terciaria. La única diferencia que se observó fue la contaminación del contenido de la jeringa por microgotitas de aceite de silicona, la cual no cambia significativamente durante el almacenamiento en términos de número y tamaño [29]. Sin embargo, a pesar de ser este un estudio amplio de la estabilidad de BVZ, no fue considerada en el mismo la actividad biológica del mAb, la cual podría verse afectada en esas condiciones y durante ese periodo de almacenamiento.

Y.H. Chen *et al.* también realizaron estudios de esterilidad, estabilidad y eficacia en muestras de BVZ comercial conservado en viales multidosis a 4°C. Los ensayos se llevaron a cabo durante diferentes días de control. Realizaron ensayos de crecimiento bacteriano para determinar la esterilidad, y analizaron la estabilidad mediante MALDI-TOF MS. La eficacia fue analizada mediante ELISA del que no se aportan datos de validación. En cada período de tiempo evaluado, se mezcló BVZ con VEGF-165 y se dejó en reposo durante 3 horas. La eficacia de BVZ se

Capítulo IV

evaluó después midiendo la concentración de VEGF-165 libre de residuos. Como resultado observaron que no hubo crecimiento bacteriano en ninguna de las muestras analizadas, indicando que BVZ conservado a 4°C tras perforar los viales multidosis permanece estéril. El análisis MALDI-TOF MS reveló que las muestras conservadas 1, 3 y 6 meses permanecen estables y no hay cambios de peso molecular que pueda ser detectado por la técnica de masas empleada. Los resultados del ELISA mostraron una degradación menor del 10 % durante todos los periodos de tiempo ensayados. Por tanto, este estudio sugiere que si durante el uso de BVZ se siguen las precauciones asépticas adecuadas, el contenido de los viales multidosis conservados a 4°C permanece estéril y estable [30].

K. Ornek *et al.* demuestran la esterilidad de BVZ cultivado a 37°C durante 10 y 15 días y empleado en múltiples dosis de viales de un solo uso. En ninguna de las muestras ensayadas se observó crecimiento bacteriano en los diferentes medios de cultivo empleados [31].

Otra de las investigaciones llevadas a cabo por L. Signorello *et al.* tenía como objetivo evaluar la estabilidad de BVZ reenvasado en jeringas individuales de un solo uso de 1 ml, almacenadas a diferentes condiciones, considerando tres aspectos diferentes: la actividad anti-VEGF, la contaminación microbiana y las propiedades fisicoquímicas. Particularmente, la estabilidad de BVZ fue analizada tras la exposición de las jeringas a luz UV a 37°C mediante su cuantificación usando un método ELISA indirecto basado en la reacción enzimática BVZ-VEGF y del que no se aportan datos de validación y un estudio dinámico de dispersión de luz (DLS). La estabilidad térmica de BVZ fue evaluada mediante un estudio calorimétrico. Además, para determinar la contaminación bacteriológica o fúngica, fueron analizadas todas las jeringas mediante el estudio del crecimiento microbiano o fúngico en medios selectivos. Como resultado, se detectó una disminución significativa de la actividad anti-VEGF cuando las jeringas fueron expuestas a la luz UV a 37°C. En estas condiciones, el DLS mostró un aumento del tamaño medio de BVZ; probablemente debido a agregación. BVZ se encontró que era estable, en condiciones estériles, durante 3 meses a 4°C y durante 7 días a temperatura ambiente, expuesto a fuentes

de luz indirectas, mientras que una breve exposición del fármaco a la radiación UV directa resultó perjudicial para la estabilidad [32].

S.J. Bakri *et al.* [33] confirmaron en su estudio la estabilidad en la capacidad de unión de BVZ al VEGF durante seis meses, tras la refrigeración o congelación (-10°C) de muestras del mismo en jeringas de tuberculina de plástico. Se midió la concentración de BVZ, a través de su unión a VEGF-165, sin embargo, no se ofrecen datos de una validación rigurosa del método empleado. BVZ en la jeringa y conservado a 4°C se degrada en un 1,6 % a la semana, 0 % a las 3 semanas, 8,8 % a los 3 meses, y 15,9 % a los 6 meses. El BVZ congelado en una jeringa a -10°C se degrada un 12 % a los 6 meses. Por tanto, según este estudio, la actividad anti-VEGF de BVZ puede disminuir mínimamente cuando es conservado en las condiciones estudiadas [33].

La estabilidad de BVZ almacenado en jeringas de policarbonato (PC) y jeringas de polipropileno (PP) también ha sido estudiada. BVZ almacenado en las jeringas se analizó de forma mensual durante un período de 6 meses y los datos obtenidos se compararon con los de BVZ procedente de un vial recién abierto en cada momento de control. Para observar la agregación y la degradación fueron utilizadas la electroforesis en SDS-PAGE y la SEC. La DLS proporcionó la información sobre el tamaño y la distribución de tamaños de partícula hidrodinámica de BVZ en solución. La unión de VEGF y la concentración activa de BVZ fueron determinadas por resonancia de plasmón superficial (SPR) utilizando el sistema Biacore. En un período de 6 meses no se observaron diferencias significativas en la calidad de BVZ reenvasado en jeringas precargadas de PC y PP cuando se comparó con BVZ que se suministra desde el vial recién abierto [34].

Las preocupaciones con respecto a la estabilidad de Avastin[®] tras su dilución y almacenamiento prolongado en contenedores estándar utilizados para la administración de fármacos, tales como botellas de polietileno de alta densidad, han impedido un uso clínico del mismo más extendido. Su compatibilidad con el conservante cloruro de benzalconio era también desconocida. Mediante un análisis electroforético detallado (electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)) y bioquímico (ELISA

Capítulo IV

punto isoeléctrico (IEF)) de Avastin[®] tras su dilución y almacenamiento, conteniendo cloruro de benzalconio como conservante, Simon Kaja *et al.* no detectaron ninguna evidencia de degeneración o agregación después de la dilución y almacenamiento prolongado de BVZ a -60°C y 4°C comparado con un vial fresco de Avastin[®] no diluido. Esto permitió la consideración de nuevas formulaciones de Avastin[®], incluyendo su uso en un spray nasal de dosis medida para el tratamiento de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT) y otra aplicaciones [35].

Para cuantificar los niveles de partículas subvisibles y agregados de proteínas en BVZ reenvasado, así como en muestras de BVZ probadas en experimentos controlados de laboratorio y un placebo, varias muestras del mAb fueron conservadas en jeringas de plástico e incubadas a 4°C, 20°C y temperatura ambiente (con y sin exposición a la luz) durante 12 semanas. Además, se simularon los golpes mecánicos que ocurren durante el transporte de las jeringas que contienen el fármaco. La cuantificación de la distribución y tamaño de partícula se hizo por técnicas de caracterización de partículas. Los niveles de monómero y agregados solubles de BVZ se determinaron mediante SE-HPLC. Como conclusión se determinó que BVZ reenvasado en jeringas de plástico podría contener agregados de proteínas y estar contaminado por microgotas de aceite de silicona. Por tanto, la congelación-descongelación, así como otro mal manejo del fármaco puede aumentar aún más los niveles de contaminantes en partículas [36].

En este contexto, hay que indicar que BVZ junto a otros mAbs, ha sido también estudiado dentro de la línea de investigación en la que se enmarca esta Tesis, desde el punto de vista de sus agregados, habiéndose detectado la presencia de dímeros naturales en el medicamento -Avastín[®]-, hecho que se justifica dada la alta concentración del mismo (25 mg/ml) [37].

En resumen, hay que indicar que a pesar de que algunos de los estudios descritos anteriormente han demostrado, mediante diferentes técnicas analíticas, la estabilidad y esterilidad de BVZ a 4°C, hasta 15 días o incluso 6 meses conservado en diferentes envases y dispositivos, los inmunoensayos empleados para los estudios de la funcionalidad, en el caso de que se hayan realizado, no han sido validados de forma rigurosa.

De ahí, que en la presente Tesis Doctoral se lleve a cabo el estudio de estabilidad biológica de BVZ mediante el empleo de un ELISA específico para este mAb, desarrollado y validado según las indicaciones de las ICHs, y cuyos datos vendrán a aportar información sobre la estabilidad y posibilidad de reutilización del mismo, ampliamente utilizado tanto para lo indicado en su aprobación como para usos fuera de indicación.

2. OBJETIVO

Con objeto de contribuir a establecer la estabilidad en el tiempo de BVZ conservado en condiciones habituales de uso hospitalario, en el presente trabajo se ha desarrollado y validado un ELISA para determinar la evolución de la actividad biológica de BVZ. Mediante esta investigación, se contribuirá a determinar si BVZ conserva su actividad anti-VEGF para poder ser empleado después del tiempo indicado por el fabricante una vez abierto el vial, manteniendo la seguridad para el paciente y permitiendo el importante beneficio económico que supondría este hecho.

3. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ELISA

Para la puesta a punto del método ELISA para la determinación cuantitativa de la actividad biológica del mAb BVZ, se procedió a la selección y optimización de las variables que afectan a dicho método y que son las que se exponen a continuación.

Tanto la selección como la optimización de las diferentes variables fue llevada a cabo basándose en los resultados previos obtenidos en los ELISAs anteriormente puestos a punto y validados.

3.1. *Selección de la modalidad ELISA*

Dada la similitud en el problema a abordar con el estudio presentado en el Capítulo anterior, en este caso también se optó por desarrollar un **ELISA indirecto no competitivo**, ya que esta modalidad ELISA permite realizar

Capítulo IV

una evaluación directa de la reacción en la cual basa el mAb, BVZ en este caso particular, su mecanismo de acción.

3.2. Selección de las placas de microtitulación

Considerando los resultados satisfactorios previamente obtenidos tras el uso de las **placas de microtitulación Nunc Maxisorp® de 96 pocillos no desmontables**, empleadas para el ELISA indirecto desarrollado y validado para determinar cuantitativamente la actividad de IFX en presencia de su Ag TNF- α , este ELISA fue desarrollado en el mismo tipo de placas, obteniéndose una sensibilización adecuada de las mismas con VEGF.

3.3. Selección del anticuerpo secundario (conjugado)

Debido a que BVZ es un mAb humanizado constituido por un 93 % humano y un 7 % murino, fue seleccionado como conjugado para la reacción Ag-Ab estudiada, un Ab secundario IgG antihumano marcado con peroxidasa.

Los datos obtenidos anteriormente para el mAb IFX (véase Capítulo II), indican que el uso de un Ab secundario IgG antiratón marcado con peroxidasa da lugar a señales analíticas más bajas, de forma que el método es más sensible con el uso de un Ab secundario IgG antihumano marcado con su correspondiente enzima.

Por tanto, y debido a la mayor sensibilidad mostrada en ensayos previos, se seleccionó como conjugado el Ab IgG antihumano conjugado.

3.4. Selección de la concentración óptima de conjugado

La selección de la concentración de conjugado óptima, para la cual se obtenga una señal analítica adecuada, se ha basado en los estudios

previamente realizados y descritos en los capítulos anteriores. Dada la similitud estructural de los mAbs estudiados, se seleccionó la concentración optimizada en los ELISAs anteriormente descritos. Esta concentración es **5 µg/ml de conjugado IgG antihumano**.

3.5. *Optimización del proceso de sensibilización de las placas ELISA*

El procedimiento para la sensibilización de las placas ELISA fue establecido a partir del estudio de una serie de variables que influyen en el mismo. Estas variables han sido: el *tampón diluyente*, la *concentración de antígeno (VEGF)* y el *intervalo de concentración de BVZ* empleados para desarrollar el ELISA.

La disolución tampón empleada para preparar las disoluciones de las proteínas (tanto Abs como el VEGF) así como las correspondientes diluciones de las mismas, ha sido una **disolución tampón de carbonato 0,1 M pH 9.6**. La concentración óptima de esta disolución se estableció en el desarrollo del ELISA previamente descrito en el Capítulo III y la adecuación de su empleo en este ELISA fue verificada mediante el desarrollo del mismo en varios ensayos.

La optimización de la concentración a emplear para la sensibilización de las placas ELISA con el Ag de BVZ, esto es, con VEGF, se realizó a partir del estudio de la señal de absorbancia correspondiente a la reacción Ag/Ab obtenida con concentraciones crecientes de VEGF y empleando una alta concentración de BVZ, de tal manera que se garantizase la reacción de todo el Ag ensayado. La concentración óptima para sensibilizar las placas es aquella a partir de la cual la señal de absorbancia permanece constante (sin saturar el detector). Las concentraciones de VEGF ensayadas fueron 0,25 µg/ml y 1 µg/ml. La máxima concentración empleada de BVZ fue 50 µg/ml. Dado que en las pruebas realizadas las señales de absorbancia obtenidas mediante la sensibilización de las placas con VEGF a una concentración de 0,25 µg/ml indicaban la reacción del Ag dando lugar a una saturación de la señal, se seleccionó **0,25 µg/ml de**

Capítulo IV

disolución de VEGF como concentración óptima para la sensibilización de las placas ELISA.

El intervalo de concentraciones de BVZ estudiado para la aplicación del ELISA fue entre 50 y 0,001 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados obtenidos mostraron que concentraciones por debajo de 0,01 $\mu\text{g/ml}$, como las concentraciones ensayadas de 0,005 y 0,001 $\mu\text{g/ml}$ daban lugar a señales analíticas similares a la de un blanco, con valores de absorbancia alrededor de 0,065; mientras que concentraciones por encima de 25 $\mu\text{g/ml}$ daban valores de absorbancia saturados. Así, la concentración ensayada de 50 $\mu\text{g/ml}$ dio señales analíticas próximas a 1,5. Por tanto, se estableció como intervalo de **concentraciones de trabajo** para estudiar el modelo de calibración, el comprendido entre **0,01 y 25 $\mu\text{g/ml}$ de BVZ**.

3.6. Selección del volumen de disoluciones a adicionar en la placa ELISA

Se ha comprobado que la adición de un volumen de **100 μl por pocillo** de las **disoluciones** empleadas para llevar a cabo el ELISA, esto es - **disolución de Ag (VEGF), disolución bloqueante, disolución de Ab primario y disolución de Ab secundario conjugado y disolución sustrato de la reacción** - es adecuada para el desarrollo del método propuesto.

Sin embargo, para llevar a cabo la parada de la reacción enzimática es suficiente con la adición de **50 μl por pocillo** del **reactivo de parada**, es decir, de **H_2SO_4 1 M**.

3.7. Selección de las variables restantes

Tal y como se ha indicado ya en capítulos anteriores, la selección del tampón de bloqueo, disolución de lavado de las placas ELISA, número de ciclos de lavado y aspiración, temperatura y tiempos de incubación, enzima de marcaje, sustrato para dicha enzima y reactivo de parada de la reacción enzimática, se realizó a partir de la bibliografía consultada,

siendo seleccionadas las variables más comúnmente empleadas, y que son las que se muestran de forma abreviada en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Parámetros y variables seleccionadas para el desarrollo del ELISA específico para BVZ.

Parámetro/variable	Parámetro/variable seleccionado
Disolución tampón de bloqueo	Leche en polvo 2% (w/v) + PBS 0,15 M pH 7,4 – Tween 20 0,3 % (v/v)
Disolución tampón de lavado	PBS 0,15 M pH 7,4 – Tween 20 0,3 % (v/v)
Nº ciclos de lavado/aspiración tras cada etapa	4
Enzima de marcaje	Peroxidasa
Sustrato de la reacción enzimática	OPD Sigmafast™
Reactivo de parada de la reacción enzimática	H ₂ SO ₄ 1 M
Temperatura y tiempos de incubación tras adición de los distintos reactivos	
Reactivo adicionado	Temperatura y tiempo de incubación
Tras adición de VEGF a la placa	Incubación a 4°C durante 18 horas (“overnight”). Placas cubiertas con parafilm
Tras adición de disolución bloqueante	Incubación a 37°C durante 2 horas. Placa cubierta con parafilm
Tras adición del Ab primario BVZ	Incubación a 37°C durante 45 minutos. Placas cubiertas con parafilm
Tras adición del Ab secundario conjugado (IgG antihumano + peroxidasa)	Incubación a 37 °C durante 30 minutos. Placas cubiertas con parafilm
Tras adición del sustrato OPD	Incubación a temperatura ambiente, en oscuridad, durante 20 minutos. Placas sin cubrir
Tras adición del reactivo de parada de la reacción enzimática (H ₂ SO ₄ 1 M)	Lectura inmediata

4. DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS DEL ELISA DESARROLLADO

A continuación se describen las etapas en las que se lleva a cabo el ELISA indirecto no competitivo propuesto y que quedan esquematizadas en la figura 4.1.

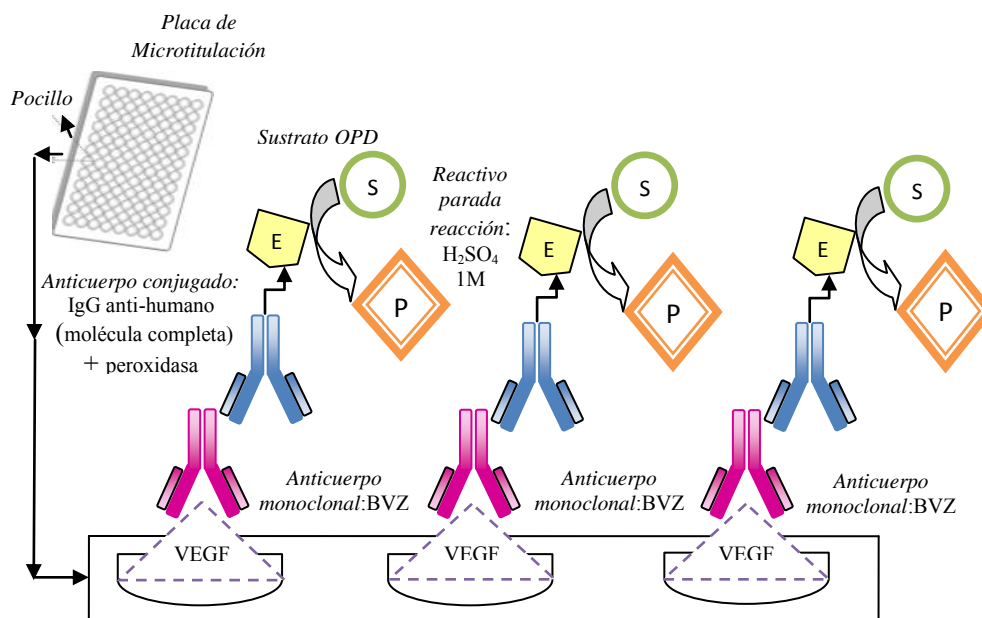


Figura 4.1. Descripción del método ELISA desarrollado para la cuantificación de BVZ. Fuente: elaboración propia.

Las etapas de las que se compone el ELISA indirecto propuesto para BVZ son, al igual que para el ELISA indirecto descrito en el Capítulo anterior para IFX, 15 etapas. Sin embargo, en este Capítulo, y con objeto de simplificar la descripción del mismo (ya dada en el Capítulo III) y que esta sea clara y concisa, se han unificado las diferentes etapas, quedando abreviada la descripción del inmunoensayo en tres etapas principales, que engloban el resto de las fases constituyentes del ELISA propuesto. De tal manera, la descripción del método es la mostrada a continuación:

ETAPA 1. SENSIBILIZACIÓN DE LA PLACA ELISA CON VEGF

Este inmunoensayo se basó en el uso de placas ELISA Nunc Maxisorp® de 96 pocillos sensibilizadas con VEGF. Las placas fueron incubadas durante 18 horas (overnight) a 4°C usando 100 µl de VEGF de concentración 0,25 µg/ml en tampón carbonato 0,1 M de pH 9,6. A continuación, y tras realizar cuatro lavados con el correspondiente tampón de lavado PBS 0,15 M (pH 7,4) - Tween 20 (0,3 % v/v) alternados con cuatro aspiraciones, se adicionó el tampón de bloqueo [leche en polvo 2 % (w/v) diluida en PBS 0,15 M (pH 7,4) - Tween 20 (0,3 % v/v)] y se incubó durante 2 horas a 37°C. Tras finalizar la incubación, las placas fueron lavadas de nuevo cuatro veces con el mismo tampón de lavado citado anteriormente y cada lavado fue alternado con su correspondiente aspiración.

ETAPA 2. REACCIÓN Ag/Ab

El siguiente paso consiste en la adición de 100 µl de la correspondiente disolución de BVZ diluido en tampón carbonato 0,1 M, ajustado a pH 9,6, en un intervalo de concentraciones entre 0,01-25 µg/ml. Tras la adición del monoclonal objeto de estudio, las placas se incuban durante 45 minutos a 37°C, periodo durante el que se lleva a cabo la reacción Ag/Ab objeto de estudio. Después del tiempo requerido para la incubación, se realizan los correspondientes lavados y aspiraciones, dejando la placa ELISA preparada para realizar la siguiente etapa.

ETAPA 3. REVELADO DE LA REACCIÓN VEGF/BVZ

Para poner de manifiesto la extensión de la reacción VEGF/BVZ (reacción Ag/Ab) se adicionan 100 µl de la disolución del Ab de detección, esto es, IgG anti-humano (molécula completa) marcado con peroxidasa y preparado a una concentración de 5 µg/ml en tampón carbonato 0,1 M de pH 9,6. A continuación, las placas se incuban durante 30 minutos a 37°C. Tras este periodo en el que se establece la reacción entre los dos Abs, el BVZ y el conjugado, las placas fueron sometidas de nuevo a cuatro ciclos de lavado y aspiración y finalmente se dispensa en cada pocillo 100 µl de disolución de o-fenilendiamina (OPD), sustrato de

Capítulo IV

la reacción enzimática del conjugado. A continuación, las placas se incuban sin cubrir, en oscuridad y a temperatura ambiente (24°C aproximadamente) durante 20 minutos, finalizando la reacción enzimática mediante la adición de 50 µl/pocillo de ácido sulfúrico 1 M. Por último, la absorbancia fue medida a dos longitudes de onda diferentes, 450 y 620 nm, siendo la señal analítica la diferencia entre los dos valores obtenidos.

5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ELISA

5.1. *Validación del método ELISA propuesto*

Como se ha comentado en el Capítulo anterior, la validación del ELISA indirecto no competitivo específico para cuantificar BVZ, ha sido llevada a cabo siguiendo las recomendaciones descritas tanto en estudios de validación específicos de inmunoensayos [38-40] como en las guías ICH, principalmente las guías ICH Q1A (R2) (Stability Testing of New Drug Substances and Products) [41], Q2 (R1) (Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology) [42] y Q1B (Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products) [43]. Así, se ha estudiado:

- Función de calibrado.
- Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).
- Intervalo de detección (ID) e intervalo de cuantificación (IC).
- Precisión, evaluada estudiando la precisión intra-día y la precisión inter-día (repetibilidad y reproducibilidad respectivamente).
- Exactitud/veracidad como porcentaje de recuperación.
- Especificidad/selectividad evaluada mediante un estudio de reacciones cruzadas.

5.1.1. **Función de calibrado**

Tanto la selección como la caracterización del modelo matemático al que mejor se ajusten los datos experimentales del ELISA desarrollado, fueron llevadas a cabo una vez determinado el intervalo de concentraciones en

las que la señal de absorbancia está relacionada con la concentración de las muestras de BVZ empleadas.

Mediante el análisis de disoluciones estándar de BVZ, preparadas a partir del medicamento Avastin[®], se establece el modelo matemático para este ELISA indirecto no competitivo. Las concentraciones empleadas de dichas disoluciones fueron: 0,01 µg/ml; 0,025 µg/ml; 0,3 µg/ml; 0,5 µg/ml; 5 µg/ml; 10 µg/ml y 25 µg/ml, preparadas por triplicado y aplicando el ELISA propuesto. Partiendo de los datos de absorbancia resultantes para cada disolución y mediante el empleo del método de mínimos cuadrados parciales, se establece el modelo matemático que mejor se ajuste a los datos experimentales, es decir, la relación entre la concentración de BVZ en el intervalo de concentraciones estudiado frente a la señal de absorbancia, siendo en este caso un modelo matemático logarítmico neperiano, cuya ecuación es la siguiente:

$$y (\textit{Absorbancia}) = 0,180 \ln [x (\textit{Concentración})] + 0,91$$

El coeficiente de correlación (r) obtenido fue 0,991 (Figura 4.2), lo cual indica que hay una fuerte relación entre las variables.

Capítulo IV

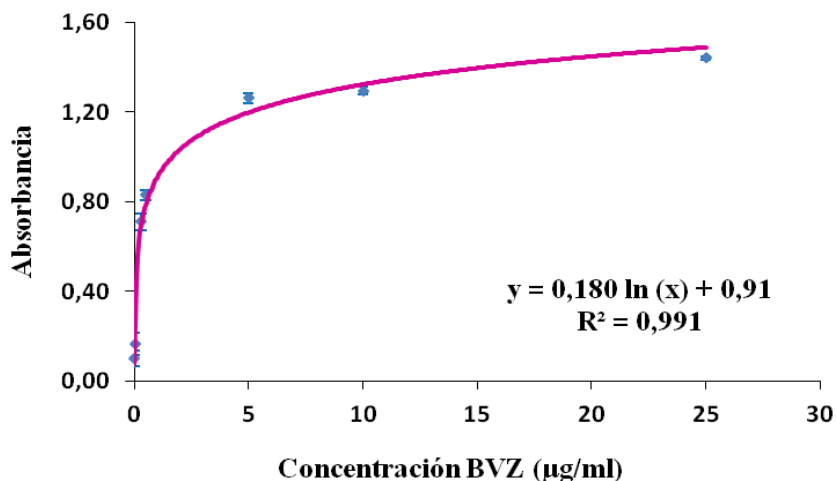


Figura 4.2. Función de calibrado VEGF-BVZ mediante ELISA indirecto no competitivo.

En la tabla 4.2 se muestran los parámetros estadísticos de la función de calibrado obtenida.

Ya que, el P-Valor de la pendiente y de la ordenada en el origen son inferiores a 0,05, se puede concluir que la relación entre absorbancia y concentración es estadísticamente significativa para un nivel de confianza del 95 %, y por tanto su valor es el establecido en el modelo.

Dado que los datos experimentales obtenidos en el intervalo de concentraciones estudiado de BVZ, se ajustan a un modelo logarítmico, mediante su representación gráfica se puede observar que, concentraciones por encima de 15 µg/ml no dan lugar a cambios en las señales analíticas, por lo que se fijó esta concentración como la concentración máxima de la aplicabilidad de la función de calibrado.

Tabla 4.2. Parámetros estadísticos de la función logarítmica de calibrado de BVZ.

Parámetro		Valor
Función		$A = 0,180 \ln [BVZ] + 0,91$
s (a) ⁽¹⁾		0,01
s (b) ⁽²⁾		0,005
Error estándar del estadístico		0,06
R ² (%) ⁽³⁾		99,1
P-Valor	ordenada	0,000
	pendiente	0,000
Intervalo de aplicabilidad		0,01-15 (µg/ml)

1. Desviación estándar del intercepto.
2. Desviación estándar de la pendiente.
3. Coeficiente de correlación en porcentaje.

Con la finalidad de evaluar la homogeneidad de varianzas y la presencia de valores atípicos, se lleva a cabo el análisis gráfico de los residuos [44], representando gráficamente los mismos frente a la concentración y mostrándose dicha gráfica en la figura 4.3.

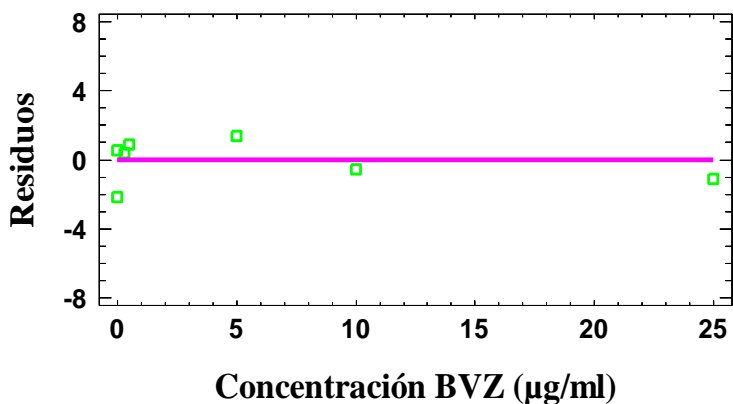


Figura 4.3. Gráfico de residuos de BVZ

El análisis gráfico de los residuos frente a la concentración indica que se cumple la homogeneidad de varianzas, estando los residuos aleatoriamente distribuidos alrededor de cero.

Por tanto, es posible afirmar que, a partir de los resultados obtenidos tanto en el análisis gráfico de los residuos como en el coeficiente de regresión, la respuesta de la señal obtenida con la concentración de BVZ, en el intervalo de concentraciones estudiado, es logarítmica, y que su comportamiento se ajusta a la función que se muestra en la tabla 4.2.

5.1.2. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

La determinación de la concentración más baja de BVZ que puede ser detectada, así como la menor concentración del mAb que puede ser cuantificada con apropiada precisión y exactitud en una muestra, se estableció mediante el cálculo del límite de detección y el límite de cuantificación respectivamente. Ambos parámetros fueron obtenidos aplicando las ecuaciones ya descritas en el Capítulo anterior y que son las siguientes:

$$LD = S_c \times K = S_c \times 3 \quad (1)$$

$$LC = S_c \times K = S_c \times 10 \quad (2)$$

donde s_c es la desviación estándar de diez muestras blanco y K es un factor numérico cuyo valor es 3 para el cálculo del límite de detección y 10 para el cálculo del límite de cuantificación, valores que suponen un nivel de confianza del 99,86 %.

El **límite de detección y de cuantificación** obtenidos mediante el ELISA propuesto son **0,008 µg/ml** y **0,01 µg/ml**, respectivamente.

5.1.3. Intervalo de detección (ID) e intervalo de cuantificación (IC)

El intervalo de detección (ID) se estableció a partir de los datos obtenidos de límite de detección y límite de cuantificación.

De igual forma, se estableció el **intervalo de cuantificación** (IC) del método, definido desde el límite de cuantificación hasta la máxima concentración ensayada para la cual continúa existiendo variación de la señal analítica con la concentración, siendo en este caso, tal y como se ha indicado anteriormente, **hasta 15 µg/ml**.

En la tabla 4.3 se muestra el valor de ambos intervalos.

Tabla 4.3. ID e IC del modelo establecido para BVZ.

ID	0,008-0,01 µg/ml
IC	0,01-15 µg/ml

Capítulo IV

El límite de detección y límite de cuantificación resultantes, 0,008 $\mu\text{g/ml}$ y 0,01 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, indican que, para el intervalo de concentraciones establecido, el ELISA propuesto es sensible. El intervalo de detección del método queda establecido entre 0,008 y 0,01 $\mu\text{g/ml}$ y el intervalo de cuantificación entre 0,01 y 15 $\mu\text{g/ml}$.

5.1.4. Precisión

A través del estudio tanto de la precisión intra-día (repetibilidad) como inter-día (reproducibilidad), fue evaluada la precisión del método propuesto.

Así, y mediante el análisis de 10 muestras de trabajo estándar preparadas a la misma concentración, el mismo día y bajo las mismas condiciones experimentales fue calculada la repetibilidad, mientras que la reproducibilidad fue evaluada mediante el análisis de 10 muestras patrón a la misma concentración, durante 4 días y bajo las mismas condiciones experimentales. Ambas, tanto repetibilidad como reproducibilidad, fueron expresadas como la DER (%) de las concentraciones calculadas a partir de las señales analíticas obtenidas usando la función de calibrado estándar.

Los dos parámetros evaluados, esto es -repetibilidad y reproducibilidad-, fueron establecidos para tres concentraciones diferentes: 2,5; 0,5 y 0,01 $\mu\text{g/ml}$.

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 4.4 y 4.5.

Tabla 4.4. Precisión intra-día (repetibilidad) de BVZ.

BVZ concentración (µg/ml)	Promedio concentración 10 réplicas (µg/ml)	Desviación estándar (DE) (µg/ml)	DER (%)
2,5	2,1	0,03	1,2
0,5	0,49	0,006	1,3
0,01	0,011	0,0008	7,4

Tabla 4.5. Precisión inter-día (reproducibilidad) de BVZ.

BVZ concentración (µg/ml)	Día control	Promedio concentración 10 réplicas/día	Promedio concentración (4 días)	Desviación estándar (DE) (µg/ml)	DER (%)
2,5	1	2,49	2,4	0,2	6,5
	2	2,19			
	3	2,49			
	4	2,29			
0,5	1	0,49	0,49	0,04	8
	2	0,49			
	3	0,44			
	4	0,54			
0,01	1	0,013	0,0130	0,0007	5,6
	2	0,013			
	3	0,013			
	4	0,012			

Capítulo IV

Ya que los resultados obtenidos muestran que la precisión intra-día e inter-día de las concentraciones estudiadas de BVZ (2,5, 0,5 y 0,01 µg/ml), fue menor al 10 % en todos los casos, podemos afirmar que **el método ELISA propuesto es repetitivo y reproducible** para las condiciones de trabajo seleccionadas, por lo que el método **es preciso**.

5.1.5. Exactitud/veracidad

Para llevar a cabo la evaluación de la exactitud (veracidad) del método propuesto, se realizó un estudio de recuperación, mediante el análisis de 10 muestras de trabajo estándar. Dicha exactitud fue estimada mediante el porcentaje de recuperación de la concentración calculada de disolución estándar. El estudio de la exactitud fue realizado a tres concentraciones diferentes: 2,5 µg/ml, 0,5 µg/ml y 0,01 µg/ml.

Tal y como quedó descrito tanto en el Capítulo I, como en el Capítulo II y III de esta Tesis Doctoral, el porcentaje de recuperación fue calculado mediante la ecuación:

$$\frac{\text{Concentración obtenida } (\mu\text{g/ml})}{\text{Concentración ensayada } (\mu\text{g/ml})} \times 100 = \text{Porcentaje de recuperación}$$

La tabla 4.6 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 4.6. Estudio de recuperación.

BVZ concentración (µg/ml)	Promedio concentración 10 réplicas (µg/ml)	Recuperación (%)
2,5	2,46	98,7
0,5	0,49	98,2
0,01	0,01	99,8

Dado que el porcentaje de **recuperación** obtenido fue mayor del **98 %** para las tres concentraciones ensayadas, se cumple la premisa de aceptación fijada previamente ($\pm 10 \%$) con respecto a la concentración inicial. De tal manera se puede afirmar que **el método ELISA propuesto es exacto para la finalidad que se propone, la determinación de la concentración de BVZ en medicamentos y/o preparaciones farmacéuticas.**

Tanto precisión como exactitud cumplen con los criterios de aceptación indicados para la validación de inmunoensayos y que recomiendan que la DER (%) sea $\leq 20 \%$ [40].

5.1.6. Especificidad/selectividad

Al igual que en el Capítulo anterior, la especificidad/selectividad del método fue estimada mediante un estudio de reacciones cruzadas en el que se analizaron diversas disoluciones estándar de trabajo de diferentes mAbs, usando el método ELISA indirecto no competitivo desarrollado para BVZ y no específico para ellos.

Capítulo IV

→ *Estudio de reacciones cruzadas*

Con la finalidad de determinar una probable producción de interferencia dada por mAbs similares a BVZ en el método ELISA propuesto y específico para éste, se ensaya la aplicabilidad de dicho método para la evaluación de otros mAbs. Así, para determinar la posibilidad o no de que se produzca reacción específica VEGF/mAbs diferente al BVZ, las placas de microtitulación sensibilizadas con VEGF son sometidas a la acción de otros mAbs no específicos para este inmunoensayo, para los cuales su Ag es diferente. Los mAbs ensayados fueron: CTX, IFX, RTX y TTZ.

Para poder realizar una comparación posterior de los resultados obtenidos, la concentración a la que fueron evaluados los mAbs fue la misma en todos los casos, tanto para BVZ como para el resto de mAbs no específicos. Esta concentración fue de 0,5 µg/ml, valor que se encuentra dentro de la función de calibrado establecida para cada uno de los FBIO ensayados. La tabla 4.7 muestra los resultados obtenidos en este estudio.

Tabla 4.7. Estudio de reacciones cruzadas. ELISA específico para BVZ.

mAb específico	Concentración VEGF (µg/ml)	mAb no específico	Concentración mAbs no específico (µg/ml)	Concentración obtenida mAb específico (µg/ml)	Promedio concentración obtenida mAb no específico (µg/ml)
BVZ	0,25	CTX	0,5	0,49	0,07
		IFX			0,07
		RTX			0,08
		TTZ			0,08

A partir de los resultados obtenidos tras la aplicación del ELISA específico de BVZ, se puede concluir que las señales analíticas resultantes para los cuatro mAbs no específicos, se corresponden con valores de concentraciones muy por debajo de la ensayada (0,5 µg/ml), es decir, valores de absorbancia correspondientes a concentraciones que oscilan entre 0,07-0,08 µg/ml frente a los 0,5 µg/ml ensayados. Por tanto, se puede declarar que no se originan reacciones cruzadas entre los cuatro

IgG1 estudiados y que, por ello, el ELISA indirecto propuesto es específico para la cuantificación de BVZ y no de otros FBIOs.

5.2. *Estudios de degradación acelerada*

Varias muestras tomadas de un mismo vial de Avastin[®] 25 mg/ml fueron sometidas a diferentes tipos de degradación y posteriormente analizadas mediante el método ELISA desarrollado. De esta forma se comprobó la pérdida de actividad sufrida por el MB tras someterlo durante un tiempo determinado a dichas condiciones de estrés.

Las condiciones de estrés investigadas fueron la temperatura (50 y 70°C), exposición a la luz (cámara de envejecimiento), fuerza iónica (NaCl 1,5 M), adición de un ácido (HCl 0,1 M) y una base (NaOH 0,1 M) y adición de un oxidante (H₂O₂ 1 % v/v; H₂O₂ 10 % v/v).

Para llevar a cabo los estudios, y en los casos en que era necesario, a 0,5 ml de la disolución del MB se le adicionaron 50 µl de agente estresante, de forma que la concentración final del mismo era del 10 % (v/v). Para la degradación acelerada por acción de la temperatura o la acción de la luz, las muestras se sometieron al factor de estrés directamente.

Todas las muestras fueron analizadas a las 24 horas de la exposición y por triplicado.

Transcurridas estas 24 horas, las muestras de MB estresadas fueron diluidas a una concentración de 2,5 µg/ml con tampón carbonato 0,1 M pH 9,6 (concentración dentro del intervalo de aplicación del método). Y, tal y como ha sido ya indicado en esta Tesis, se calculó la actividad biológica de las mismas, expresada como porcentaje de actividad remanente tras realizar el análisis mediante el método ELISA desarrollado.

Los resultados de actividad remanente obtenidos para cada una de las muestras de Avastin[®] sometidas a estrés, fueron comparados con la actividad biológica correspondiente a una muestra estándar del MB,

Capítulo IV

preparada en el momento de realizar el análisis y que no había sido sometida a ningún tratamiento de degradación.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.8.

Tabla 4.8. Estudios de degradación forzada de Avastin[®] 25 mg/ml

AGENTE ESTRÉS	CONCENTRACIÓN OBTENIDA TRAS DEGRADACIÓN (mg/ml)	ACTIVIDAD REMANENTE (%)	PÉRDIDA DE ACTIVIDAD (%)
NaOH 0,1M ⁽¹⁾	6,2	24,7	75,3
HCl 0,1M ⁽¹⁾	7,2	28,7	71,3
H ₂ O ₂ 1 % ⁽¹⁾	16,3	65,1	34,9
H ₂ O ₂ 10 % ⁽¹⁾	16,2	64,6	35,4
NaCl 1,5 M	17,1	68,3	31,7
T (50°C)	16,9	67,5	32,5
T (70°C)	1,4	5,8	94,2
VISIBLE	13,7	54,8	45,2

* Concentración inicial de Avastin[®]: 25 mg/ml

(1) Concentración de agente estresante: 10 % (v/v) (50 µl de agente estresante añadidos a 0,5 ml de Avastin[®]).

Como se puede observar en la tabla 4.8, en todas las muestras sometidas a estrés, BVZ presenta actividad biológica remanente, excepto en las muestras sometidas a 70°C, donde queda totalmente degradado, dado que el despliegue térmico sufrido por la proteína es irreversible y va acompañado o seguido por la agregación de la misma, lo cual puede provocar esa pérdida de la funcionalidad de la proteína. La disminución de actividad en Avastin[®] es menor cuando se somete a una temperatura de

50°C, ya que el despliegue térmico es menor conforme más baja sea la temperatura a la que es expuesta la proteína.

En cuanto a la exposición a la luz, se puede observar que esto promueve una reducción de su actividad biológica inicial a la mitad aproximadamente, reducción causada probablemente por la oxidación de la proteína o por los cambios sufridos tanto en su estructura como en su conformación, así como en la composición de su formulación ante dicha exposición.

La pérdida de actividad biológica en el medicamento ante su exposición a dos pH extremos es muy pronunciada, lo cual es incluso lógico y esperable. Así, mediante la adición de un ácido, la pérdida de actividad biológica sufrida por el MB con respecto a su actividad biológica inicial es próxima a un 72 %, siendo ligeramente mayor cuando el agente estresante es una base, y alcanzando dicha pérdida de actividad un valor del 75 %. Es muy probable que la causa de esta pérdida de funcionalidad sea debida a la desamidación producida en la proteína ante tal exposición a dos pH extremos, así como a hidrólisis ácidas y básicas que distorsionan químicamente la proteína.

La exposición de Avastin[®] a un medio oxidante (tanto en alta como en baja concentración) supone una pérdida de la actividad inicial del MB del 35-36 %. Esto puede ser debido a que los productos resultantes de la oxidación pueden mostrar una bioactividad y conformación alteradas, que dará lugar a esa pérdida de funcionalidad del MB con respecto a su actividad inicial [45].

En cuanto a la exposición del MB a un aumento de fuerza iónica, la pérdida de actividad sufrida por el mismo es de un 32 % con respecto a su actividad inicial, lo cual puede ser atribuido a cambios conformacionales desnaturizantes de la proteína, provocados por su exposición a un medio con mayor fuerza iónica, como la introducida mediante el empleo de NaCl 1,5 M, agente desnaturizante común.

Capítulo IV

5.3. *Aplicación del método ELISA propuesto. Evaluación de la actividad biológica en el tiempo de BVZ (Avastin®)*

El método ELISA indirecto no competitivo desarrollado y validado se empleó en un estudio de estabilidad en el tiempo en el que fueron utilizados dos viales de Avastin® pertenecientes al mismo lote. Estos se almacenaron en condiciones hospitalarias habituales, es decir, alícuotas del propio medicamento (25 mg/ml) fueron guardadas protegidas de la luz a 4°C (refrigeradas) y a -20°C (congeladas).

Una alícuota de cada vial de Avastin® recién abierto, fue analizada mediante el método ELISA propuesto. El resto de alícuotas de cada uno de los viales fueron conservadas a 4°C y -20°C en viales de congelación topacio de 2 ml. Para obtener una concentración de ensayo adecuada, las muestras conservadas bajo las condiciones descritas anteriormente (y tras su descongelación a temperatura ambiente en el caso de las muestras conservadas a -20°C) fueron diluidas los días de control en tampón carbonato 0,1 M pH 9,6, justo en el momento de realizar el ensayo. Fueron analizadas tres réplicas de cada una de las muestras conservadas.

Uno de los viales de Avastin® fue analizado durante 57 días y el otro vial fue analizado durante un día más, concretamente durante 58 días, ambos conservados en las dos condiciones mencionadas anteriormente, esto es, refrigeradas a 4°C y congeladas a -20°C.

Como en estudios similares anteriores, la actividad biológica fue expresada como porcentaje de actividad biológica remanente en comparación con la actividad inicial del mAb BVZ en cada momento de control, siendo la actividad biológica inicial la obtenida desde el análisis realizado durante el primer día control (Día 0) y recién abiertos los viales de Avastin®.

El cálculo de la actividad biológica remanente y de la pérdida de actividad sufrida por Avastin® se llevó a cabo siguiendo las mismas operaciones empleadas para establecer la estabilidad biológica del mAb IFX, y que ya quedaron descritas en el Capítulo anterior.

La tabla 4.9 muestra los resultados de actividad remanente y de pérdida de actividad obtenidos en los diferentes días de control para los dos viales de Avastin[®] ensayados y conservados refrigerados a 4°C, siendo representados gráficamente en la figura 4.4.

Tabla 4.9. Estabilidad de dos viales de Avastin[®] 25 mg/ml conservados a 4°C.

Nº VIAL	DIA CONTROL	PROMEDIO CONCENTRACIÓN (mg/ml)	ACTIVIDAD REMANENTE (%)	ACTIVIDAD PERDIDA (%)
1 (14.05.14)	0	25,0	100	0
	1	24,2	96,8	3,2
	2	23,4	93,7	6,3
	8	20,4	81,4	18,6
	29	18,3	73,3	26,7
	57	20,9	83,5	16,5
2 (13.05.14)	0	25,0	100	0
	1	28,5	113,9	0
	2	26,6	106,5	0
	3	22,0	87,9	12,1
	9	19,2	76,8	23,2
	58	20,1	80,4	19,6

Capítulo IV

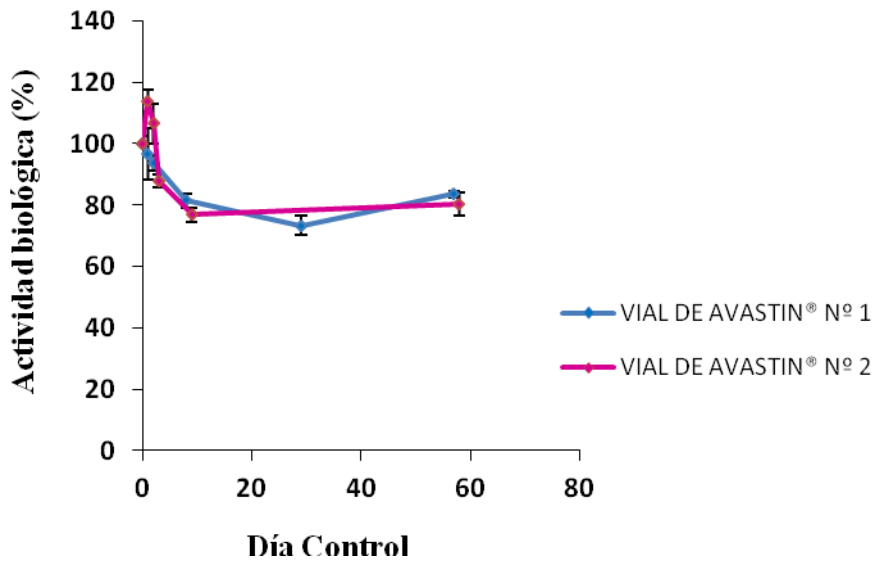


Figura 4.4. Estabilidad de dos viales de Avastin® 25 mg/ml conservados a 4°C.

En cuanto a los resultados obtenidos para las muestras de Avastin® congeladas, son mostrados en la tabla 4.10, siendo representados gráficamente en la figura 4.5.

Tabla 4.10. Estabilidad de dos viales de Avastin® 25 mg/ml conservados a -20°C.

Nº VIAL	DIA CONTROL	PROMEDIO CONCENTRACIÓN (mg/ml)	ACTIVIDAD REMANENTE (%)	ACTIVIDAD PERDIDA (%)
1 (14.05.14)	0	25,0	100	0
	1	25,9	103,7	0
	2	23,4	93,6	6,4
	8	18,9	75,7	24,3
	29	24,9	99,4	0,6
	57	19,1	76,5	23,5
2 (13.05.14)	0	25,0	100	0
	1	26,1	104,4	0
	2	21,5	86,0	14,0
	3	20,9	83,6	16,4
	9	18,2	72,8	27,2
	58	18,0	71,8	28,2

Capítulo IV

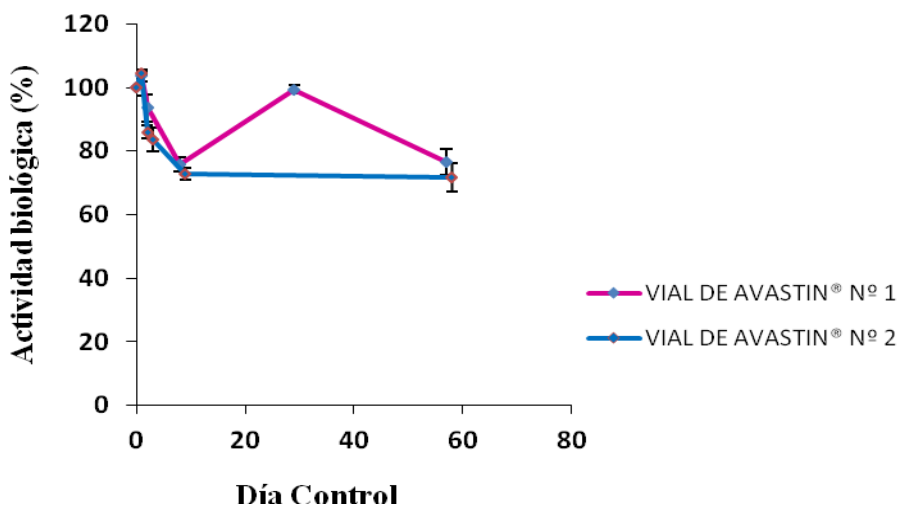


Figura 4.5. Estabilidad de dos viales de Avastin® 25 mg/ml conservados a -20°C.

De los resultados obtenidos se observa que para las muestras conservadas a 4°C, la actividad biológica de Avastin® en los dos viales ensayados es mayor del 96 % a día 1 y entre 93-100 % a día 2.

Las muestras de Avastin® procedentes del vial número 1, sufren una pérdida de su actividad biológica inicial, próxima al 19 % el día 8 de ensayo. Este valor de actividad se mantiene durante los siguientes días de estudio y hasta la finalización del mismo, mostrando un valor por encima del 83 % a día 57.

El segundo vial de Avastin® analizado (vial número 2), muestra una pérdida de actividad próxima al 13 % tras tres días de conservación a 4°C, viéndose incrementada el día 9 de ensayo esta pérdida por encima de un 20 % con respecto a la actividad que presentaba el MB inicialmente, y manteniéndose tal valor el último día del estudio, es decir, el día 58. De forma que este vial de Avastin® mantiene una actividad biológica próxima al 80 % a la fecha de conclusión del estudio.

En cuanto a las muestras procedentes de los dos viales de Avastin[®] ensayados y conservadas a -20°C, ambas mantienen íntegra su actividad biológica el primer día de análisis (D1).

El primer vial de Avastin[®] estudiado, es decir, el vial número 1, muestra una pérdida de actividad aproximadamente del 6,5 % el segundo día de ensayo; pérdida de actividad biológica que se va incrementando en el tiempo, de forma que el día 8 de control, la pérdida de actividad alcanza un 24 %. Este valor se mantiene durante el resto del estudio, presentando una actividad biológica remanente superior al 75 % el día de finalización del mismo (D57).

En cuanto al vial número 2 de Avastin[®], este muestra una pérdida de actividad ligeramente superior a la sufrida por la muestra procedente del primer vial (vial número 1) estudiado. Así, la pérdida de actividad biológica de este segundo vial (vial número 2), tras ser conservado durante 48 horas, es del 14 % con respecto a su actividad inicial y próxima a un 17 % a las 72 horas. El día 9 de control la muestra del MB ha perdido algo más de un 27 % de su actividad, valor que aumenta hasta un 28 % aproximadamente el último día de ensayo, es decir, el día 58.

Mediante los resultados obtenidos en este estudio, y teniendo en cuenta el límite de ± 10 % usado en los estudios de estabilidad práctica [46] [47] empleados habitualmente para determinar, en condiciones de uso hospitalario, la estabilidad de los excedentes de medicamentos y otras elaboraciones farmacéuticas, se puede concluir que la actividad biológica de Avastin[®] se mantiene, una vez abierto el vial, durante dos días en las condiciones de conservación estudiadas (refrigerado a 4°C protegido de la luz y congelado a -20°C protegido de la luz). A pesar que a partir del día 3 se estima una disminución de la actividad superior al 12 % en ambas condiciones de almacenamiento ensayadas, dada la complejidad de este compuesto, puede ser considerado también estable durante este tercer día de conservación.

6. CONCLUSIONES

En este capítulo se ha desarrollado y validado un ELISA específico para BVZ (Avastin[®]), en el cual se hace reaccionar dicho mAb con su Ag correspondiente VEGF. Ya que la determinación de la actividad biológica de este tipo de MB es de gran importancia, la finalidad de este estudio es definir la estabilidad funcional del MB Avastin[®] en las condiciones de uso hospitalario empleadas habitualmente.

La validación del ELISA propuesto se ha realizado siguiendo las recomendaciones de organismos internacionales (ICHs), siendo los datos resultantes satisfactorios para todos los parámetros estudiados: modelo de calibración, intervalo de concentraciones de aplicación del método, límites de detección y cuantificación, precisión, exactitud/veracidad y especificidad/selectividad. Se trata por lo tanto de un método de análisis apropiado para la determinación cuantitativa, de forma sencilla y rápida, de la actividad biológica de BVZ, contenido en el medicamento Avastin[®] 25 mg/ml, en estudios en los que sea de interés la evaluación de esta propiedad.

El ELISA desarrollado se ha aplicado en un estudio de estabilidad en el tiempo empleando dos viales del medicamento Avastin[®], y realizando controles periódicos de la actividad biológica durante 57 y 58 días respectivamente. Para ello, una vez abiertos los viales de Avastin[®], fueron conservados a 4°C y -20°C protegidos de la luz, y fueron analizados en diferentes días control para cuantificar la actividad biológica remanente del MB. De los resultados obtenidos se concluyó que no hay diferencias apreciables entre las dos condiciones de conservación ensayadas. Además, los datos de actividad biológica resultantes del estudio, indican una gran estabilidad de Avastin[®] después de la fecha de uso indicada por el fabricante, en concordancia con otros estudios relacionados y descritos en esta Tesis.

Por tanto, el ELISA propuesto ha demostrado su aplicabilidad en estudios de estabilidad en el tiempo de BVZ, realizados con objeto de aportar datos para evaluar la posible reutilización de los excedentes creados diariamente

de este MB en los servicios de farmacia hospitalaria, debido al elevado coste que suponen los tratamientos en los que está implicado este mAb.

Capítulo IV

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Agencia Europea de Medicamentos (EMA). Ficha técnica de Avastin® (Bevacizumab). <http://www.ema.europa.eu>
- [2] Min-Yen Hsu *et al.* Monitoring the VEGF level in aqueous humor of patients with ophthalmologically relevant diseases via ultrahigh sensitive paper-based ELISA. *Biomaterials* 35 (2014) 3729-3735.
- [3] Danny S. Ng. *et al.* Intravitreal bevacizumab: safety of multiple doses from a single vial for consecutive patients. *Hong Kong Med J* 2012;18:488-95.
- [4] Achala Bhaskara *et al.* Bevacizumab in the Treatment of a Patient with Metastatic Colorectal Carcinoma with Brain Metastases. *Clinical Colorectal Cancer, Vol. 7, No. 1, 65-68, 2008.*
- [5] Donghyun Wang *et al.* Serum Concentration of Vascular Endothelial Growth Factor after Bilateral Intravitreal Injection of Bevacizumab. *Korean J Ophthalmol Vol.28, No.1, 2014.*
- [6] Giannis Mountzios *et al.* Bevacizumab and micrometastases: Revisiting the preclinical and clinical rollercoaster. *Pharmacology & Therapeutics* 141 (2014) 117–124.
- [7] Heinzerling J.H. *et al.* Bowel Perforation from Bevacizumab for the Treatment of Metastatic Colon Cancer: Incidence, Etiology, and Management. *Current Surgery. Volume 63/Number 5 • September/October 2006.*
- [8] Herbert B. Newton. Bevacizumab: Review of Development, Pharmacology, and Application to Brain Tumors. *Clinical Medicine: Therapeutics* 2009;1 1577–1597.
- [9] Hung Huynh *et al.* Bevacizumab and rapamycin induce growth suppression in mouse models of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* 49 (2008) 52–60.
- [10] Falavarjani K.G. *et al.* Adverse events and complications associated with intravitreal injection of anti-VEGF agents: a review of literature. *Eye.* 2013; 27:787–94.
- [11] Poku E. *et al.* The safety of intravitreal bevacizumab monotherapy in adult ophthalmic conditions: systematic review. *BMJ Open.* 2014;4:e005244.

- [12] Yoshitaka Narita. Drug Review: Safety and Efficacy of Bevacizumab for Glioblastoma and Other Brain Tumors. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 2013; 43(6):587–595.
- [13] Ferry ALM Eskens and Stefan Sleijfer. The use of bevacizumab in colorectal, lung, breast, renal and ovarian cancer: Where does it fit?. *European Journal of Cancer* 44 (2008) 2350-2356.
- [14] Simin Dashti-Khavidaki *et al.* Intravitreal administration of bevacizumab: pros and cons. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015.23:27.
- [15] Arevalo J.F. *et al.* Intravitreal bevacizumab (Avastin) for diabetic retinopathy: The 2010 GLADAOF lecture. *J. Ophthalmol.* 2011; 2011:584238.
- [16] Angelos K. Koutras *et al.* Bevacizumab in the treatment of breast cancer. *Cancer Treatment Reviews* 36 (2010) 75–82.
- [17] David Miles. Management of toxicity in patients receiving therapy with bevacizumab *EJC Supplements* 6, N° 6 (2008) 29–39.
- [18] Mackey T.K. *et al.* After counterfeit avastin®-What have we learned and what can be done. *Nature Reviews Clinical Oncology* 12, 302–308 (2015).
- [19] Hashemi S. *et al.* Bevacizumab for choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration and pathological myopia. *Expert Opin Biol Ther.* 2014; 14:1837–48.
- [20] Meredith T.A. *et al.* Postinjection endophthalmitis in the comparison of age-related macular degeneration treatment trial (CATT). *Ophthalmology.* 2015; 122:817–21.
- [21] Kodjikian L. *et al.* Ranibizumab versus bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration: results from the GEFAL noninferiority randomized trial. *Ophthalmology.* 2013; 120:2300–9.
- [22] Veurink M. *et al.* Association of ranibizumab (Lucentis®) or bevacizumab (Avastin®) with dexamethasone and triamcinolone acetonide: An in vitro stability assessment. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 78 (2011) 271–277.
- [23] Lanlan Yu *et al.* Comparing protein VEGF inhibitors: In vitro biological studies. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 408 (2011) 276–281.

Capítulo IV

[24] CATT Research Group *et al.* The Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatment Trial (CATT) Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med.* 2011; 364:1897–908.

[25] Carneiro A. *et al.* Comparative effects of bevacizumab, ranibizumab and pegaptanib at intravitreal dose range on endothelial cells. *Experimental Eye Research* 88 (2009) 522–527.

[26] Alfaro C. *et al.* Influence of bevacizumab, sunitinib and sorafenib as single agents or in combination on the inhibitory effects of VEGF on human dendritic cell differentiation from monocytes. *British Journal of Cancer* (2009) 100, 1111-1119.

[27] Huang M. *et al.* Impact of extractables/leachables from filters on stability of proteins formulations. *J Pharm Sci* 2011; 100:4617–30.

[28] Alain Astier. Practical stability studies: a powerful approach for reducing the cost of monoclonal antibodies. *European Journal of Oncology Pharmacy (EJOP)* 01/2012; 2012(6):4-6.

[29] Paul M. *et al.* Long-term stability of bevacizumab repackaged in 1 mL polypropylene syringes for intravitreal administration. *Ann Pharm Fr.* 2012; 70(3):139-54.

[30] Chen Y.H *et al.* Evaluation of the sterility, stability, and efficacy of bevacizumab stored in multiple-dose vials for 6 months. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 2009 Feb; 25(1):65-9.

[31] Ornek K. *et al.* Bevacizumab sterility in multiple doses from a single-use vial. *The Annals of pharmacotherapy* 42:10 2008 Oct pg 1425-8.

[32] Signorello L. *et al.* “Quantification, Microbial Contamination, Physico-chemical Stability of Repackaged Bevacizumab Stored Under Different Conditions”. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, June 2014, 15, 000-000.

[33] Bakri S.J. *et al.* Six-month stability of bevacizumab (Avastin) binding to vascular endothelial growth factor after withdrawal into a syringe and refrigeration or freezing. *Retina.* 2006 May-Jun; 26(5):519-22.

[34] Khalili H. *et al.* Storage stability of bevacizumab in polycarbonate and polypropylene syringes. *Eye* 29, 820-827 (June 2015).

[35] Simon Kaja *et al.* Effects of dilution and prolonged storage with preservative in a polyethylene container on Bevacizumab (Avastin™) for topical delivery as a nasal

spray in anti-hereditary hemorrhagic telangiectasia and related therapies. *Hum Antibodies*. 2011; 20(3-4): 95–101.

[36] Lu Liu *et al.* Silicone Oil Microdroplets and Protein Aggregates in Repackaged Bevacizumab and Ranibizumab: Effects of Long-term Storage and Product Mishandling. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, February 2011, Vol. 52, No. 2.

[37] Hernández-Jiménez J. *et al.* The Effects of Light-Accelerated Degradation on the Aggregation of Marketed Therapeutic Monoclonal Antibodies Evaluated by Size-Exclusion Chromatography With Diode Array Detection. *J Pharm Sci*. 2016 Apr; 105(4):1405-18.

[38] Lipton, C.R. *et al.* Guidelines for the validation and use of immunoassays for determination of introduced proteins in biotechnology enhanced crops and derived food ingredients. *Food Agric. Immunol*. 12 (2000)153-164.

[39] Findlay, J.W.A. *et al.* Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *J Pharm. Biomed. Anal*. 21 (2000) 1249-1273.

[40] De Silva, B. *et al.* Recommendations for the Bioanalytical Method Validation of Ligand-binding Assays to Support Pharmacokinetic Assessments of Macromolecules. *Pharmaceut. Res*. 20 (2003) 1885-1900.

[41] International Conference on Harmonization (ICH) guidelines ICH Q1A (R2), Stability Testing of New Drug Substances and Products.

[42] International Conference on Harmonization (ICH) guidelines ICH Q2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.

[43] International Conference on Harmonization (ICH) guidelines ICH Q1B, Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products.

[44] Boqué R. y Rius F. X. Avances en Quimiometría Práctica. *Servicio de Publicaciones e Intercambio científico de la Universidad de Santiago de Compostela*. Santiago de Compostela (1994).

[45] Hawe A. *et al.* Reviews. Forced Degradation of Therapeutic Proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 101, N° 3, March 2012.

Capítulo IV

[46] Bardin C. *et al.* Guidelines for the practical stability studies of anti-cancer drugs: a European consensus conference. *Ann Pharm Fr.* 2011; 69:221-31.

[47] Barrueco N. Estabilidad de medicamentos en la práctica clínica. De la seguridad a la eficiencia. *Farm Hosp.* 2013;37(3):175-177.



CAPÍTULO V

DETERMINACIÓN DE LA
ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE
CETUXIMAB (ERBITUX®)
MEDIANTE ELISA INDIRECTO

CTX es un fármaco anticanceroso de naturaleza proteica. Concretamente, es un Ab IgG1 monoclonal quimérico que actúa bloqueando el EGFR y, por consiguiente, su función, inhibiendo de esta manera la proliferación y favoreciendo la apoptosis celular. La primera indicación aprobada para CTX fue en combinación con Irinotecan para el tratamiento de pacientes con cáncer colorrectal metastásico (CCRm) que exprese el EGFR después del fracaso de un tratamiento citotóxico que haya incluido Irinotecan. Actualmente, también está indicado en el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello (CCECC) asociado a radioterapia (RT). Sin embargo, su empleo habitual puede ser diferente al recogido en la ficha técnica. En la literatura médica aparecen referencias al tratamiento de pacientes en primera línea de CCRm que no expresen el EFGR o de utilización conjunta con fármacos distintos a Irinotecan [1].

1. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE CETUXIMAB

Según indicaciones del fabricante, los viales de Erbitux[®] deben conservarse refrigerados entre 2-8°C, no congelados. Se trata de un MB que no contiene ningún conservante antimicrobiano ni agente bacteriostático. Desde el punto de vista microbiológico, el medicamento debe usarse inmediatamente después de su apertura. Si no se utiliza inmediatamente, los tiempos y las condiciones de almacenamiento previas a su uso son responsabilidad del usuario y normalmente no deberían superar las 24 horas a una temperatura entre 2 y 8°C [2].

Dado que es un medicamento ampliamente usado, la bibliografía consultada muestra que existen muchos estudios basados en el empleo de CTX, bien realizados para determinar su comportamiento farmacocinético en los pacientes tratados con el mismo [3] [4]; sus efectos sobre la regulación del EGFR [5]; determinación de la expresión del EGFR en el tejido tumoral [6]; estudios de los mecanismos de resistencia a la terapia

Capítulo V

con anti-EGFR [7-9]; detección de reacciones de hipersensibilidad [10-12]; búsqueda de menor número de efectos secundarios derivados del uso de CTX solo o en combinación con otros fármacos; búsqueda de nuevas indicaciones y mejora de las ya autorizadas [13-15]; descubrimiento de nuevas moléculas anti-EGFR [3] [16] [17] y de nuevas formulaciones de CTX [18] [19]; determinación de la compatibilidad del mAb con prototipos de contenedores hechos de materiales diferentes al vidrio “ready to use” (listos para usar) [20]; o bien para estudiar su estabilidad físico-química, entre otras finalidades.

Los estudios relacionados con el comportamiento farmacocinético y biológico de CTX suelen ser llevados a cabo mediante el empleo de diversas técnicas, entre las que destacan por mayor frecuencia de uso la técnica inmunoblot [21], inmunohistoquímica [22], western blot [23], citometría de flujo [21] y ELISA [3] [6] [11] [12] [23]. De nuevo, entre todas estas técnicas, el método ELISA es el más empleado para llevar a cabo este tipo de estudios [24].

De tal manera, y a modo de ejemplo, se pueden citar los estudios realizados por Nicolas Cézé *et al.* [24] los cuales, con objeto de monitorizar CTX en suero, desarrollaron un ELISA basado en el empleo de placas de microtitulación sensibilizadas con EGFR recombinante según la concentración esperada en suero. La validación del inmunoensayo se llevó a cabo mediante la obtención de la curva de calibrado, límites de detección y cuantificación, determinación de la reproducibilidad intra-día en inter-día y especificidad [24].

La aparición de nuevas moléculas anti-EGFR y de CTX conjugado, ha dado lugar al incremento en la necesidad de detectar, con gran selectividad, CTX a concentraciones bajas en suero humano. Por ello, es importante el desarrollo de nuevos métodos específicos para determinar CTX. Así, y debido a esta necesidad, en 2009 J. Hantash *et al.* [25] desarrollaron y validaron bajo las regulaciones FDA-GLP, un ELISA para la detección de CTX altamente selectivo y con un bajo límite de cuantificación. El ELISA se basó en la sensibilización de las placas con EGFR, sobre el cual eran adicionadas las muestras diluidas de suero

humano de pacientes tratados con CTX. Como Ab secundario se empleó una mezcla de HRP antihumano conjugado y Ab antihumano no conjugado (1:5 v/v) y TMB como sustrato de la reacción. Las muestras resultaron estables durante cinco ciclos de congelación-descongelación y durante 24 horas a temperatura ambiente (20–25°C) o a 2-8°C. CTX, además fue estable en la disolución patrón más concentrada, conservado a temperatura ambiente durante aproximadamente 6 horas. La disolución estándar de trabajo (200 mg/ml CTX en PBS + 1 % BSA) conservada a temperatura ambiente, también fue estable durante aproximadamente 6 horas [25].

La propia ficha técnica del medicamento Erbitux[®] (5 mg/ml) indica una estabilidad físico-química demostrada durante 48 horas a 25°C si la solución es preparada como se describe en las instrucciones de uso. Para reducir el riesgo microbiológico, se debe usar tan pronto como sea posible tras su preparación. Si no es usado inmediatamente y su conservación es necesaria, se debe mantener refrigerado entre 2-8°C no más de 24 horas [2].

Debido a su naturaleza proteica, es habitual que la caracterización físico-química de CTX se lleve a cabo mediante diversas técnicas: cromatografía, turbidimetría y DLS entre otras. Dentro de este tipo de caracterización se incluyen, de forma muy frecuente, los estudios relacionados con la formación de agregados mediante la exposición del MB a diferentes condiciones de estrés. Así, este tipo de estudios han sido llevados a cabo por S.A. Charman *et al.* mediante el empleo del vortex como condición estresante [26] o Y.F. Maa *et al.* mediante el uso de técnicas de cizallamiento [27], entre otros, como por ejemplo, A. Lahlou *et al.* [28], cuyo grupo de investigación realizó un estudio de la formación de agregados en CTX, por estrés mecánicamente inducido (agitación) y comparó su mecanismo en dos formulaciones de CTX comercialmente disponibles. La agregación de CTX bajo agitación fue seguida durante 24 horas y varios métodos fueron usados para describir la cinética de agregación: análisis turbidimétrico; SEC-HPLC; IEC-HPLC; DLS y mapeo peptídico. Concluyeron que la formación de agregados se puede conseguir fácilmente en CTX mediante el empleo de mecanismos de

Capítulo V

estrés y que la mejora de la estabilidad del mismo mediante una nueva formulación, parece estar relacionada con la dimerización de CTX mediante el empleo de una concentración elevada de proteína y la presencia de excipientes estabilizantes [28].

Sin embargo, y a pesar de los estudios descritos anteriormente, el análisis de la estabilidad de CTX, en cuanto a estabilidad biológica se refiere, es muy limitado. El empleo de ELISAs para el análisis de CTX es usado de forma habitual para determinar la concentración sérica del mismo mediante el empleo de distintos tipos de muestras: sangre, suero, plasma. Además, este inmunoensayo es empleado para la realización de estudios dirigidos a aumentar los conocimientos sobre el comportamiento de CTX en los pacientes tratados, los efectos biológicos a los que da lugar dicho Ab y la mejora de los mismos mediante su uso, solo o en combinación con otros fármacos. También se encuentran comercializados varios kits ELISA para la determinación cuantitativa de CTX en suero humano, plasma y sobrenadante de cultivos celulares. La mayoría de bibliografía consultada indica que los ELISAs empleados en las distintas investigaciones basadas en el uso de CTX, son kits ya comercializados [23]. De ahí el interés de desarrollar y validar un ELISA específico para CTX, que permita determinar su actividad biológica en el tiempo en el propio medicamento (Erbix[®]).

Los escasos trabajos encontrados en bibliografía basados en el estudio de la estabilidad de CTX como tal principio activo de un medicamento, antes de ser infundido en el paciente, son los citados a continuación:

H. Ikesue *et al.* [29] estudiaron la estabilidad de CTX y panitumumab (PNT) conservando ambos MB en viales de vidrio y bolsas de cloruro de polivinilo (PVC) a 4°C durante 14 días. Las muestras fueron analizadas inmediatamente después de su preparación y tras su conservación a 4°C durante 7 y 14 días. Las concentraciones de CTX y PNT fueron medidas usando una modificación de un ensayo ELISA previamente descrito. La estabilidad fue definida como la concentración media de las disoluciones ensayadas con respecto a la concentración inicial. La apariencia de las disoluciones y su color fueron ensayados mediante la observación de las

muestras sobre un fondo blanco y negro. El porcentaje de la concentración de CTX y PNT con respecto a la concentración inicial fue de alrededor del 90 % conservados a 4°C durante 14 días. No se observaron cambios de color o turbidez en ninguno de los viales y las disoluciones preparadas. Por tanto, los autores de este trabajo indicaron que CTX 2 mg/ml fue estable conservado durante 14 días en viales de vidrio y bolsas de PVC a 4°C. Las muestras de PNT 20 mg/ml en viales de vidrio y PNT 2,5 mg/ml en cloruro sódico al 0,9 % inyectado en bolsas de PVC a 4°C, también fueron estables durante 14 días [29].

A. Astier *et al.* [30] también estudiaron la estabilidad física y química de diferentes mAbs, entre ellos CTX, mediante el empleo de varios métodos analíticos complementarios: SEC, EIC, mapeo peptídico, espectroscopía UV y de fluorescencia, turbidimetría y DLS. Los análisis se realizaron antes y después de ser sometidos los mAbs a estrés térmico, tras su dilución y conservación en bolsas de poliolefina [30]. No se realizaron estudios de la actividad biológica.

2. OBJETIVO

La finalidad de los estudios de estabilidad descritos anteriormente, es determinar la estabilidad de CTX conservado en envases diferentes al original. Para llevar a cabo estos estudios, son empleados frecuentemente kits ELISA comercializados y específicos para determinar CTX en muestras de suero, sangre o plasma.

Por tanto, y dada esta particularidad, en esta Tesis Doctoral se decidió determinar la evolución de la actividad biológica de CTX, conservado en condiciones habituales de uso hospitalario y en su envase original (vial de vidrio). Para ello ha sido desarrollado y validado un ELISA específico para este FBIO.

Mediante esta investigación, se pretende determinar si CTX conserva su actividad anti-EGFR para poder ser empleado durante más tiempo que el indicado por el fabricante una vez abierto el vial, manteniendo su

Capítulo V

seguridad clínica y permitiendo un ahorro del gasto sanitario que puede ser significativo.

3. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ELISA

Nuevamente, para desarrollar el método ELISA específico para la determinación cuantitativa de la actividad biológica del mAb CTX, se procedió a la selección y optimización de las variables que afectan a dicho método y que son las que se exponen a continuación.

La selección y la optimización de las diferentes variables, fue llevada a cabo basándose en los resultados obtenidos para los dos ELISAs desarrollados y validados para determinar la cantidad total así como la actividad biológica del mAb IFX, descritos en los Capítulos II y III de la presente Tesis Doctoral, y en el ELISA realizado para determinar la actividad biológica de BVZ, descrito en el Capítulo anterior.

3.1. *Selección de la modalidad ELISA*

Teniendo en cuenta que el problema que se pretende tratar en el presente Capítulo es análogo al tratado en los dos Capítulos anteriores, se seleccionó igualmente como modalidad ELISA a desarrollar, un **ELISA indirecto no competitivo**, mediante el cual se puede llevar a cabo un estudio directo de la reacción CTX-EGFR en la que este mAb basa su mecanismo de acción.

3.2. *Selección de las placas de microtitulación*

La selección de las placas de microtitulación es crucial para que se produzca una adecuada fijación del Ag del CTX. No todos los materiales poliméricos de los que están hechas estas placas permiten la fijación de los compuestos proteicos. Las **placas de microtitulación Nunc**

Maxisorp[®] de 96 pocillos no desmontables han demostrado ser idóneas para la fijación de las proteínas que actúan como Ags de los mAbs IFX y BVZ, el TNF- α y el VEGF respectivamente. Por tanto, ante los resultados obtenidos en el desarrollo de los anteriores ELISAs, se seleccionan nuevamente estas placas de microtitulación.

3.3. *Selección del anticuerpo secundario (conjugado)*

Al igual que el mAb IFX, CTX es un mAb quimérico constituido por un 75 % humano y un 25 % murino. Por tanto, es de esperar un similar comportamiento ante Abs secundarios. En base a esto y a los resultados preliminares, fue **seleccionado** en este caso el **Ab secundario IgG antihumano marcado con peroxidasa** como conjugado para poner de manifiesto la reacción EGFR-CTX.

3.4. *Selección de la concentración óptima de conjugado*

Al igual que en los ELISAs anteriores, y dada de nuevo la similitud entre los mAbs estudiados, se seleccionó en un principio la misma concentración de la disolución del conjugado, esto es 5 $\mu\text{g/ml}$, para poner de manifiesto la extensión de la reacción inmunitaria entre el EGFR y el CTX.

Sin embargo, tras las realización del ELISA empleando el intervalo de concentraciones entre 0,001-50 $\mu\text{g/ml}$ de CTX (establecido como óptimo a continuación), la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ de Ab secundario o conjugado inicialmente seleccionada, y empleando la concentración de EGFR optimizada 1 $\mu\text{g/ml}$ (se discutirá a continuación), se observó que las señales analíticas obtenidas eran similares para todas las concentraciones ensayadas, oscilando todos los valores de absorbancia entre 0,19-0,20. Estos resultados pusieron de manifiesto que la concentración de Ab conjugado empleada era insuficiente para poner de manifiesto la extensión de la reacción EGFR/CTX. Por tanto, fue necesario el empleo de concentraciones mayores del Ab secundario. Se

Capítulo V

estudiaron 10; 15 y 20 $\mu\text{g/ml}$. de IgG antihumano conjugado. Los resultados indicaron que era suficiente una concentración de Ab secundario de **10 $\mu\text{g/ml}$** en las condiciones de trabajo establecidas para poner de manifiesto la extensión de la reacción inmunológica, por lo que fue seleccionada esta como **concentración óptima de conjugado IgG antihumano**.

3.5. *Optimización del proceso de sensibilización de las placas ELISA*

El estudio de las condiciones a emplear para la sensibilización de las placas ELISA con el EGFR se lleva a cabo, tal y como ha sido indicado en los capítulos anteriores, mediante la selección del *tampón diluyente*, la selección de la *concentración de antígeno (EGFR)* y el establecimiento del *intervalo de concentración de CTX* en el cual el ELISA es susceptible de ser aplicado.

La disolución tampón seleccionada para preparar las disoluciones tanto de CTX, como del conjugado y del EGFR, ha sido una **disolución tampón de carbonato 0,1 M pH 9,6**. La selección del mismo se ha basado en los resultados previamente obtenidos para los ELISAs desarrollados y validados para el mAbs IFX (Capítulos II, III), ELISAs para los cuales fue optimizada la concentración de esta disolución. La idoneidad de esta disolución tampón en este ELISA específico para CTX, fue verificada mediante el desarrollo del mismo en varios ensayos con resultados satisfactorios.

Dada la similitud entre IFX y CTX (ambos mAbs quiméricos), para determinar la concentración óptima de Ag de CTX, esto es, de EGFR, a emplear para la sensibilización de las placas ELISA, fue usada una concentración similar a la utilizada de TNF- α en el ELISA indirecto no competitivo propuesto para IFX (Capítulo III), es decir, 1 $\mu\text{g/ml}$ de EGFR. La realización del ensayo sensibilizando las placas con EGFR a dicha concentración, dio lugar a señales de absorbancia que indicaban la reacción del Ag con saturación de la señal de absorbancia, y por tanto, los

resultados eran satisfactorios para el desarrollo del ensayo. De forma que, la **concentración óptima de EGFR** para la sensibilización de las placas ELISA fue establecida en **1 µg/ml**.

El intervalo de concentraciones de CTX estudiado para la aplicación del ELISA, fue entre 50 y 0,001 µg/ml. Los resultados obtenidos mostraron que concentraciones por debajo de 0,1 µg/ml, como las concentraciones ensayadas de 0,075; 0,05; 0,025; 0,017; 0,010; 0,005 y 0,001 µg/ml dan lugar a señales analíticas muy bajas, con valores de absorbancia alrededor de 0,067 y, además, similares entre sí para todas las concentraciones, indicando tales resultados, la necesidad de emplear concentraciones mayores de CTX.

Por tanto, se estableció como intervalo de **concentraciones de trabajo** para estudiar el modelo de calibración en las condiciones seleccionadas, el comprendido entre **0,1 y 50 µg/ml de CTX**.

3.6. Selección del volumen de disoluciones a adicionar en la placa ELISA

Mediante las experiencias anteriores, a partir de los valores de absorbancias obtenidos (entre 0 y 1) se corroboró que los volúmenes empleados a las concentraciones optimizadas eran los adecuados. Estos volúmenes adicionados de **todas las disoluciones** empleadas fueron de **100 µl por pocillo**, excepto en el caso del **reactivo de parada** de la reacción que solo fueron empleados **50 µl por pocillo**.

3.7. Selección de las variables restantes

De nuevo, la selección del resto de variables que influyen en el desarrollo del ELISA se realizó a partir de la bibliografía consultada, eligiéndose aquellas establecidas como habituales. Estas variables son el tampón de bloqueo, la disolución de lavado de las placas ELISA, el número de ciclos de lavado y aspiración, la temperatura y los tiempos de incubación, la

Capítulo V

enzima de marcaje y su sustrato y su reactivo de parada. La tabla 5.1 recoge los parámetros y valores seleccionados.

Tabla 5.1. Parámetros y variables seleccionadas para el desarrollo del ELISA específico para CTX.

Parámetro/variable	Parámetro/variable seleccionado
Disolución tampón de bloqueo	Leche en polvo 2% (w/v) + PBS 0,15 M pH 7,4 – Tween 20 0,3 % (v/v)
Disolución tampón de lavado	PBS 0,15 M pH 7,4 – Tween 20 0,3 % (v/v)
Nº ciclos de lavado/aspiración tras cada etapa	4
Enzima de marcaje	Peroxidasa
Sustrato de la reacción enzimática	OPD Sigmafast™
Reactivo de parada de la reacción enzimática	H ₂ SO ₄ 1 M
Temperatura y tiempos de incubación tras adición de los distintos reactivos	
Reactivo adicionado	Temperatura y tiempo de incubación
Tras adición de EGFR a la placa	Incubación a 4°C durante 18 horas (“overnight”). Placas cubiertas con parafilm
Tras adición de disolución bloqueante	Incubación a 37°C durante 2 horas. Placa cubierta con parafilm
Tras adición del Ab primario CTX	Incubación a 37°C durante 45 minutos. Placas cubiertas con parafilm
Tras adición del Ab secundario conjugado	Incubación a 37 °C durante 30 minutos. Placas cubiertas con parafilm
Tras adición del sustrato	Incubación a temperatura ambiente, en oscuridad, durante 20 minutos. Placas sin cubrir
Tras adición del reactivo de parada de la reacción enzimática (H ₂ SO ₄ 1 M)	Lectura inmediata

4. DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS DEL ELISA DESARROLLADO

A continuación se describen las diferentes etapas y pasos en los que se desarrolla el ELISA indirecto no competitivo para determinar la actividad biológica de CTX, el cual se presenta esquematizado en la figura 5.1. Al igual que en el capítulo anterior, en este también se ha optado por agrupar las etapas en tres etapas principales, constituidas cada una de ellas por diferentes pasos.

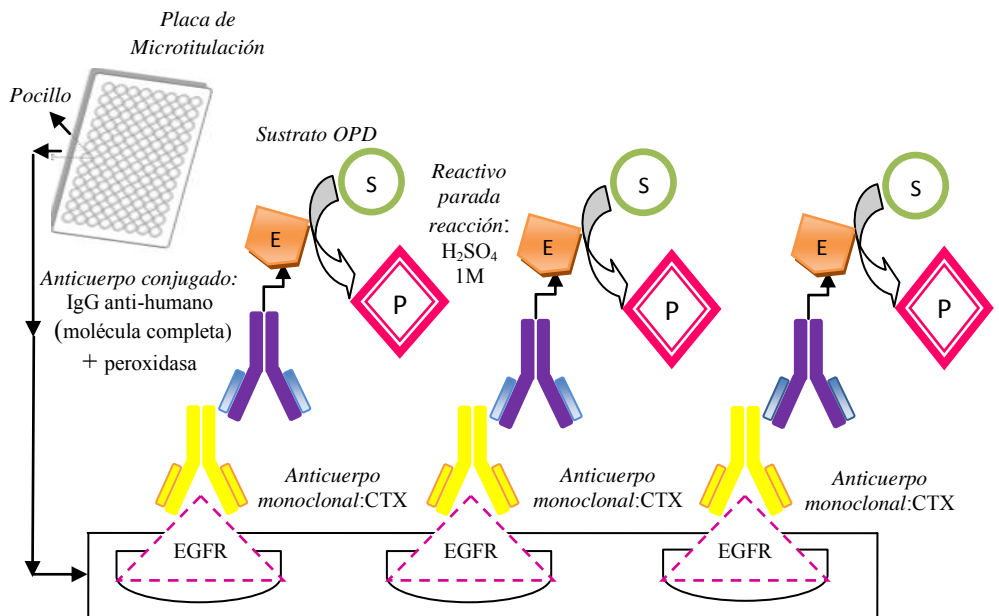


Figura 5.1. Descripción del método ELISA desarrollado para la cuantificación de CTX. Fuente: elaboración propia.

ETAPA 1. SENSIBILIZACIÓN DE LA PLACA ELISA CON EGFR

El ELISA desarrollado en este Capítulo, se basa en el empleo de placas ELISA Nunc Maxisorp® de 96 pocillos sensibilizadas con EGFR. Estas

Capítulo V

placas fueron incubadas durante 18 horas (overnight) a 4°C usando 100 µl de EGFR preparado a una concentración de 1 µg/ml con tampón carbonato 0,1 M de pH 9,6. A continuación, y tras realizar cuatro lavados con el correspondiente tampón de lavado PBS 0,15 M (pH 7,4) - Tween 20 (0,3 % v/v) alternados con cuatro aspiraciones, se adicionó el tampón de bloqueo, consistente en leche en polvo 2 % (w/v) diluida en PBS 0,15 M (pH 7,4) - Tween 20 (0,3 % v/v) y se incubó durante 2 horas a 37°C. Tras finalizar la incubación, las placas fueron lavadas de nuevo cuatro veces con el mismo tampón de lavado citado anteriormente y cada lavado fue alternado con su correspondiente aspiración.

ETAPA 2. REACCIÓN Ag/Ab

A continuación se lleva a cabo la adición de 100 µl de la correspondiente disolución de CTX diluido en tampón carbonato 0,1 M, ajustado a pH 9,6, en un intervalo de concentraciones entre 50 - 0,1 µg/ml. Tras la adición del mAb CTX, las placas se incuban durante 45 minutos a 37°C, periodo durante el que se lleva a cabo la reacción Ag/Ab objeto de estudio. Después del tiempo requerido para la incubación, se realizan los correspondientes lavados y aspiraciones, dejando la placa ELISA preparada para realizar la siguiente etapa.

ETAPA 3. REVELADO DE LA REACCIÓN VEFG/BVZ

Posteriormente, y con la finalidad de desvelar el desarrollo de la reacción que tiene lugar entre el Ag EGFR y el mAb CTX, se adicionan 100 µl de la disolución del Ab secundario de detección, es decir, de IgG anti-humano (molécula completa) marcado con peroxidasa y preparado a una concentración de 10 µg/ml en tampón carbonato 0,1 M de pH 9,6. A continuación, las placas se incuban durante 30 minutos a 37°C. Tras este periodo, en el que se establece la reacción entre los dos Abs, el CTX y el conjugado, las placas fueron sometidas de nuevo a cuatro ciclos de lavado y aspiración y finalmente se dispensa en cada pocillo 100 µl de disolución de OPD, sustrato de la reacción enzimática del conjugado. A continuación, las placas se incuban sin cubrir, en oscuridad y a temperatura ambiente (24°C aproximadamente) durante 20 minutos,

finalizando la reacción enzimática mediante la adición de 50 µl/pocillo de ácido sulfúrico 1M. Por último, la absorbancia es medida a dos longitudes de onda diferentes, 450 y 620 nm, siendo la señal analítica la diferencia entre los dos valores obtenidos.

5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ELISA

5.1. *Validación del método ELISA propuesto*

La validación del método ELISA propuesto ha sido llevada a cabo tal y como se describe en el Capítulo I., siguiendo principalmente las recomendaciones descritas en las guías ICH para productos biotecnológicos [31-33] y en estudios de validación específicos de inmunoensayos [34-36]. Así, se ha abordado el estudio de:

- Función de calibrado.
- Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).
- Intervalo de detección (ID) e intervalo de cuantificación (IC).
- Precisión, evaluada estudiando la precisión intra-día y la precisión inter-día (repetibilidad y reproducibilidad respectivamente).
- Exactitud/veracidad como porcentaje de recuperación.
- Especificidad/selectividad evaluada mediante un estudio de reacciones cruzadas.

5.1.1. **Función de calibrado**

Establecido el intervalo de concentraciones de las muestras de CTX en el que la señal analítica de absorbancia está relacionada con la concentración, se procedió a seleccionar y caracterizar el modelo matemático al que mejor se ajusten los datos experimentales en este ELISA indirecto no competitivo. Para ello, se partió de disoluciones estándar de CTX, preparadas a partir del medicamento Erbitux[®] 5 mg/ml, considerando para este estudio dicho medicamento como patrón, como ya fue comentado en el Capítulo I.

Capítulo V

Las concentraciones de CTX empleadas fueron: 0,1 µg/ml; 0,25 µg/ml; 1 µg/ml; 5 µg/ml; 10 µg/ml; 15 µg/ml; 25 µg/ml y 50 µg/ml, preparadas por triplicado y aplicando el método ELISA propuesto. Los datos de absorbancia obtenidos para cada disolución, fueron usados para determinar el modelo matemático que mejor se ajuste a dichos datos experimentales mediante el empleo del método de mínimos cuadrados parciales. Al igual que ocurrió en los anteriores ELISAs basados en la reacción inmunitaria, también en este ELISA la relación entre la concentración de CTX y la absorbancia no es lineal. De los diferentes modelos matemáticos que se evaluaron, los datos de regresión sugirieron una relación logarítmica neperiana entre ambas variables, cuya ecuación es la siguiente:

$$y (\text{Absorbancia}) = 0,066 \ln [x (\text{Concentración})] + 0,404$$

El coeficiente de correlación (r) para esta función de calibrado fue 0,9671 (Figura 5.2), lo cual indica que hay una fuerte relación entre las variables. El resto de modelos matemáticos evaluados (polinómicos y logarítmico decimal) presentaban un valor menor de este coeficiente y un peor ajuste.

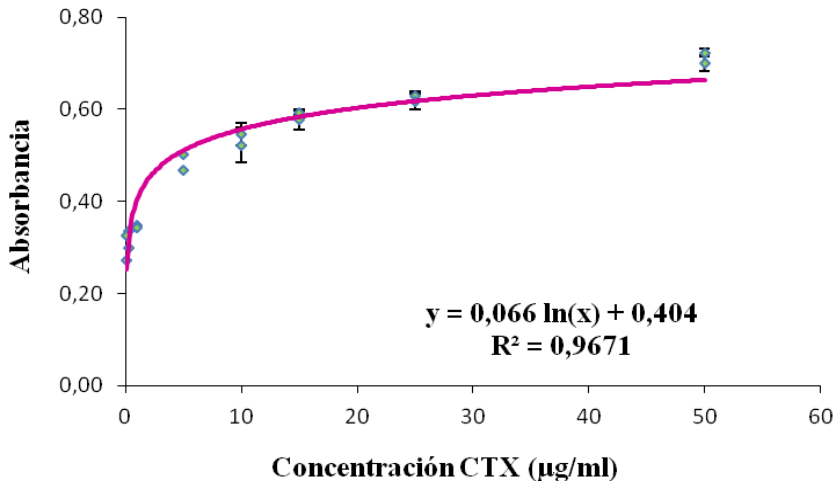


Figura 5.2. Función de calibrado EGFR-CTX mediante ELISA indirecto no competitivo.

Los parámetros estadísticos correspondientes a la función de calibrado seleccionada se recogen en la tabla 5.2.

El P-Valor de la pendiente y de la ordenada en el origen es inferior a 0,05, lo cual indica que ambos valores son los aceptados para dichos coeficientes de regresión.

Puede observarse en la gráfica, que a partir de la concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ la absorbancia no sufre mucho cambio con la concentración al tratarse de un modelo de comportamiento logarítmico, por tanto, se fijó en este valor de concentración el valor máximo de la aplicabilidad de la función de calibrado.

Tabla 5.2. Parámetros estadísticos de la función logarítmica de calibrado de CTX.

Parámetro		Valor
Función		$A = 0,066 \ln [\text{CTX}] + 0,404$
s (a) ⁽¹⁾		0,001
s (b) ⁽²⁾		0,005
Error estándar del estadístico		0,0393
R ² (%) ⁽³⁾		96,71
P-Valor	Ordenada	0,0000
	Pendiente	0,0000
Intervalo de aplicabilidad		0,1 - 25 (µg/ml)

1. Desviación estándar del intercepto.
2. Desviación estándar de la pendiente.
3. Coeficiente de correlación en porcentaje.

Para el estudio de la homogeneidad de varianzas y la detección de valores atípicos, se representaron los residuos frente a las concentraciones [37] tal y como se muestra en la Figura 5.3, donde puede también ser observada la homogeneidad de varianzas en los resultados (residuos distribuidos aleatoriamente alrededor de cero).

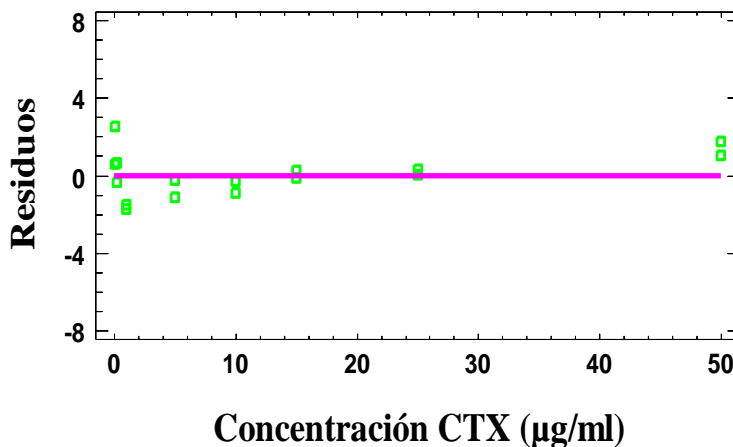


Figura 5.3. Gráfico de residuos de CTX

De los resultados obtenidos mediante el coeficiente de regresión así como del análisis gráfico de los residuos, se puede afirmar que, la respuesta de la señal obtenida con la concentración de CTX es logarítmica en el intervalo de concentraciones estudiado, y que su comportamiento se ajusta a la función que se muestra en la tabla 5.2.

5.1.2. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

Tal y como se indicó en el Capítulo II de Metodología, se obtienen los **límites de detección y de cuantificación** de CTX mediante el ELISA propuesto. Estos límites son **0,01 µg/ml** y **0,1 µg/ml respectivamente**.

5.1.3. Intervalo de detección (ID) e intervalo de cuantificación (IC)

Los datos obtenidos de límite de detección y límite de cuantificación permiten establecer el intervalo de detección (ID) del método.

Así mismo, se define el **intervalo de cuantificación** del método desde el

Capítulo V

límite de cuantificación hasta la concentración máxima ensayada en donde existe variación de la señal analítica con la concentración, en este caso, como ha sido indicado anteriormente, **hasta 25 µg/ml**.

En la tabla 5.3 se recogen estos intervalos.

Tabla 5.3. ID e IC del modelo establecido para CTX.

ID	0,01-0,1 µg/ml
IC	0,1-25 µg/ml

Los resultados obtenidos para el límite de detección y el límite de cuantificación, 0,01 µg/ml y 0,1 µg/ml respectivamente, indican que el método propuesto es sensible para el intervalo de concentraciones propuesto. Además se establece un intervalo de detección comprendido entre 0,01 y 0,1 µg/ml.

5.1.4. Precisión

La precisión del método ELISA indirecto no competitivo propuesto, fue evaluada estudiando la precisión intra-día (repetibilidad) e inter-día (reproducibilidad) (4 días).

Tanto el cálculo de la repetibilidad como el de la reproducibilidad se hizo mediante el análisis de 10 muestras patrón preparadas a la misma concentración y bajo las mismas condiciones experimentales. Para determinar la repetibilidad, dichas muestras fueron ensayadas el mismo día, mientras que para la determinación de la reproducibilidad, las muestras patrón fueron ensayadas durante 4 días.

Tanto la repetibilidad como la reproducibilidad fueron expresadas como la DER (%) de las concentraciones calculadas a partir de las señales analíticas obtenidas usando la función de calibrado estándar.

La evaluación de dicha repetibilidad y reproducibilidad fue establecida para tres concentraciones diferentes: 25; 5 y 0,1 µg/ml.

Las tablas 5.4 y 5.5 muestran los resultados obtenidos.

Tabla 5.4. Precisión intra-día (repetibilidad) de CTX.

CTX concentración (µg/ml)	Promedio concentración 10 réplicas (µg/ml)	Desviación estándar (DE) (µg/ml)	DER (%)
25	22,6	0,4	1,8
5	4,3	0,1	2,9
0,1	0,097	0,005	5,0

Capítulo V

Tabla 5.5. Precisión inter-día (reproducibilidad) de CTX.

CTX concentración (µg/ml)	Día control	Promedio concentración 10 réplicas/día	Promedio concentración (4 días)	Desviación estándar (DE) (µg/ml)	DER (%)
25	1	24,5	24,4	0,7	3,0
	2	23,5			
	3	24,5			
	4	25,3			
5	1	5,0	5,0	0,1	2,6
	2	5,0			
	3	5,0			
	4	5,0			
0,1	1	0,095	0,096	0,006	6,4
	2	0,089			
	3	0,104			
	4	0,097			

La precisión intra-día e inter-día de las concentraciones estudiadas de CTX de 25, 5 y 0,1 µg/ml fueron menores del 10 %, por tanto, se puede concluir que **el método es repetitivo y reproducible** para las condiciones de trabajo seleccionadas, por lo que el método ELISA propuesto es **preciso**.

5.1.5. Exactitud/veracidad

La exactitud (veracidad) fue evaluada a partir de un estudio de recuperación, en el que se emplearon 10 muestras estándar de CTX a tres concentraciones diferentes, esto es, a 25 µg/ml, 5 µg/ml y 0,1 µg/ml.

Al igual que en los FBIOS estudiados previamente, IFX y BVZ, el porcentaje de recuperación fue calculado mediante la ecuación:

$$\frac{\text{Concentración obtenida } (\mu\text{g/ml})}{\text{Concentración ensayada } (\mu\text{g/ml})} \times 100 = \text{Porcentaje de recuperación}$$

La tabla 5.6 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 5.6. Estudio de recuperación.

CTX concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Promedio concentración 10 réplicas ($\mu\text{g/ml}$)	Recuperación (%)
25	19,5	77,9
5	4,9	97,3
0,1	0,104	103,7

Exceptuando el valor del porcentaje de recuperación obtenido para la concentración ensayada de 25 $\mu\text{g/ml}$ de CTX, el resto de porcentajes de **recuperación** cumplen el criterio previo establecido de aceptación, $\pm 10\%$ con respecto a la concentración inicial, por tanto se puede afirmar que **el método ELISA propuesto es exacto para determinar la concentración de CTX en medicamentos y/o preparaciones farmacéuticas.**

Los resultados obtenidos de precisión y exactitud muestran que en ambos la DER (%) es $\leq 20\%$, por lo que se cumplen los criterios de aceptación indicados para la validación de inmunoensayos [36].

Capítulo V

5.1.6. Especificidad/selectividad

Al igual que en los Capítulos anteriores, la especificidad/selectividad del método fue evaluada mediante un estudio de reacciones cruzadas.

→ *Estudio de reacciones cruzadas*

El estudio de reacciones cruzadas fue llevado a cabo mediante el desarrollo del ELISA indirecto no competitivo propuesto para CTX, con otros mAbs, de forma que las placas de microtitulación sensibilizadas con el Ag específico de CTX, es decir, EGFR, son sometidas a la acción de otros mAbs no específicos, para los cuales su Ag es diferente. Así se estima la posible interferencia producida por mAbs similares en el análisis de CTX, quedando establecida la aplicabilidad del método para el análisis de mAbs no específicos. Los mAbs ensayados fueron: BVZ, IFX, RTX y TTZ.

La concentración seleccionada para dichos mAbs fue la misma en todos los casos, con objeto de poder realizar una posterior comparación de los resultados obtenidos. Así, la concentración a la que fueron ensayados BVZ, IFX, RTX y TTZ fue 5 $\mu\text{g/ml}$, valor que se encuentra dentro de la función de calibrado establecida para cada uno de ellos. La tabla 5.7 muestra los resultados obtenidos en este estudio.

Tabla 5.7. Estudio de reacciones cruzadas. ELISA específico para CTX.

mAb específico	Concentración EGFR ($\mu\text{g/ml}$)	mAb no específico	Concentración mAbs no específico ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración obtenida mAb específico ($\mu\text{g/ml}$)	Promedio concentración obtenida mAb no específico ($\mu\text{g/ml}$)
CTX	1	BVZ	5	4,2	1,4
		IFX			1,2
		RTX			1,3
		TTZ			1,4

Las señales analíticas obtenidas para los cuatro mAbs no específicos analizados mediante el método ELISA desarrollado para CTX dan lugar a valores de concentración alrededor de un 20 % de la concentración ensayada. Esto indica que en este caso sí que debe de existir una cierta afinidad entre el EGFR y los otros mAbs comerciales ensayados. Este hecho debe de ser considerado en caso de que este método ELISA pudiera ser aplicado en muestras en las que pudieran estar presentes otros mAbs.

5.2. *Estudios de degradación acelerada*

Para el estudio de degradación acelerada del medicamento Erbitux[®] 5 mg/ml se empleó un vial del mismo del que se tomaron alícuotas que fueron sometidas a las condiciones de estrés ya descritas en esta Tesis, y posteriormente analizadas mediante el método ELISA desarrollado. El procedimiento seguido para llevar a cabo el estudio fue el mismo que el empleado para someter los FBIO previamente estudiados, IFX y BVZ, a las diferentes condiciones de estrés y descrito en los Capítulos anteriores.

De tal forma que, en aquellos casos que el agente estresante se adiciona, se emplearon 50 µl del que fueron añadidos a 0,5 ml del medicamento, por lo que la concentración de agente estresante fue del 10 % (v/v); las muestras fueron analizadas 24 horas después de la adición del agente estresante.

Igualmente, las condiciones de estrés investigadas fueron la temperatura (50 y 70°C), exposición a la luz (cámara de envejecimiento), fuerza iónica (NaCl 1,5 M), adición de un ácido (HCl 0,1M) y una base (NaOH 0,1M) y adición de un oxidante (H₂O₂ 1 % v/v; H₂O₂ 10 % v/v).

Antes de llevar a cabo el análisis, las muestras sometidas a estrés fueron diluidas a una concentración de 25 µg/ml con tampón carbonato 0,1 M pH 9,6. La actividad biológica de estas muestras fue comparada con la actividad biológica correspondiente a una muestra estándar, preparada en el momento de realizar el análisis y que no había sido sometida a ningún

Capítulo V

tratamiento de degradación. Dicha actividad fue expresada como porcentaje de actividad remanente tras realizar el análisis mediante el método ELISA desarrollado. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.8.

Tabla 5.8. Estudios de degradación forzada de Erbitux[®] 5 mg/ml

AGENTE ESTRÉS	CONCENTRACIÓN OBTENIDA TRAS DEGRADACIÓN (mg/ml)	ACTIVIDAD REMANENTE (%)	PÉRDIDA DE ACTIVIDAD (%)
NaOH 0,1M ⁽¹⁾	1,8	36,9	63,1
HCl 0,1M ⁽¹⁾	1,3	26,0	74,0
H ₂ O ₂ 1 % ⁽¹⁾	4,9	97,3	2,7
H ₂ O ₂ 10 % ⁽¹⁾	3,8	75,9	24,1
NaCl 1,5 M	3,7	74,9	25,1
T (50°C)	2,2	44,2	55,8
T (70°C)	0,1	2,7	97,3
LUZ VISIBLE	8,2	Valor erróneo: se excede con respecto al valor de referencia inicial	-----

* Concentración inicial de Erbitux[®]: 5 mg/ml

(1) Concentración de agente estresante: 10 % (v/v) (50 µl de agente estresante añadidos a 0,5 ml de Erbitux[®]).

Los resultados indican que todas las muestras sometidas a estrés presentan actividad biológica remanente, menos las muestras calentadas a 70°C, donde se produce una pérdida total de la actividad biológica medida

mediante ELISA. La temperatura de 50°C también provoca una pérdida importante, aunque no total, de esta actividad biológica (del 56 % aproximadamente).

Sorprendentemente, la exposición de la proteína a un medio oxidante (tanto en alta como en baja concentración) supone una pérdida de actividad no muy pronunciada, siendo esta mayor, a mayor porcentaje de medio oxidante.

Las muestras de CTX sometidas a fuerza iónica presentan una elevada actividad remanente (75 %), lo cual es un buen dato, ya que este medicamento se administra por vía parenteral diluido en NaCl.

Ante la acción de agente estresante ácido o básico, la actividad biológica se vio muy afectada (disminución entre un 74 y 63 %), lo cual es lógico dada la naturaleza proteica del CTX.

En cuanto a la acción ejercida por la luz visible en el medicamento, indicar que la señal analítica de absorbancia obtenida tras la exposición del mismo a la luz visible, fue mayor que el valor de absorbancia correspondiente a la misma muestra y sin degradar, por lo que se descarta este dato y se supone erróneo.

A modo de resumen se puede destacar que de los resultados obtenidos se puede deducir que la exposición de Erbitux[®] 5 mg/ml a elevadas temperaturas supone el despliegue térmico de la proteína de forma irreversible, lo cual provoca una disminución en la funcionalidad de la proteína superior al 50 % ya a 50°C. La exposición del mismo a pH extremos supone una pérdida de actividad muy pronunciada, probablemente debida a la desamidación del mAb ante dicha situación, así como a procesos de hidrólisis tanto ácida como básica de aminoácidos. Por otra parte, y de forma un poco sorprendente, tras someter a degradación oxidativa al medicamento, este conserva gran parte de su actividad biológica. Y el medicamento, parece resistente a la fuerza iónica del medio, evaluada en este caso mediante la adición de NaCl.

Capítulo V

5.3. *Aplicación del método ELISA propuesto. Evaluación de la actividad biológica en el tiempo de CTX (Erbitux®)*

Se llevó a cabo un estudio de estabilidad en el tiempo empleando un vial del medicamento Erbitux® 5 mg/ml. Para ello se almacenaron alícuotas del mismo en viales topacio (protección frente a luz), refrigeradas a 4°C y congeladas a -20°C. Estas alícuotas fueron analizadas periódicamente durante 30 días empleando el ELISA desarrollado y validado. También se analizó el medicamento recién abierto, teniendo este resultado como valor de referencia para evaluar la disminución de la actividad biológica.

Con objeto de obtener una concentración de ensayo adecuada, las muestras fueron diluidas en tampón carbonato 0,1 M pH 9,6. Fueron analizadas tres réplicas de cada una de las muestras conservadas. Los días de control de las alícuotas refrigeradas fueron los días 0, 1, 2, 7, 14, 22 y 30; y para las alícuotas congeladas, los días 0, 1, 2, 3, 7, 14, 22 y 30.

Al igual que en los estudios previamente descritos para los MB Remicade® y Avastin®, en este estudio, la actividad biológica fue expresada como porcentaje de actividad biológica remanente en comparación con la actividad inicial del mAb CTX en cada momento de control, siendo la actividad biológica inicial la obtenida del análisis realizado durante el primer día control (Día 0) y recién abierto el vial de Erbitux®.

De igual forma, el cálculo de la actividad biológica remanente y de la pérdida de actividad sufrida por Erbitux® se llevó a cabo siguiendo las mismas operaciones empleadas para establecer la estabilidad biológica de Remicade® y Avastin®, y que ya quedaron descritas en los Capítulos III y IV del presente trabajo.

La tabla 5.9 muestra los resultados para las alícuotas almacenadas refrigeradas a 4°C, y la figura 5.4 muestra los resultados de la disminución de la actividad biológica.

Tabla 5.9. Estabilidad de un vial de Erbitux® 5 mg/ml conservado a 4°C.

N° VIAL	DIA CONTROL	PROMEDIO CONCENTRACIÓN (mg/ml)	ACTIVIDAD REMANENTE (%)	ACTIVIDAD PERDIDA (%)
1 (14.01.14)	0	5,0	100	0
	1	4,8	95,6	4,4
	2	3,8	76,0	24,0
	7	3,4	67,9	32,1
	14	2,9	58,2	41,8
	22	2,1	42,2	57,8
	30	0,9	18,0	82,0

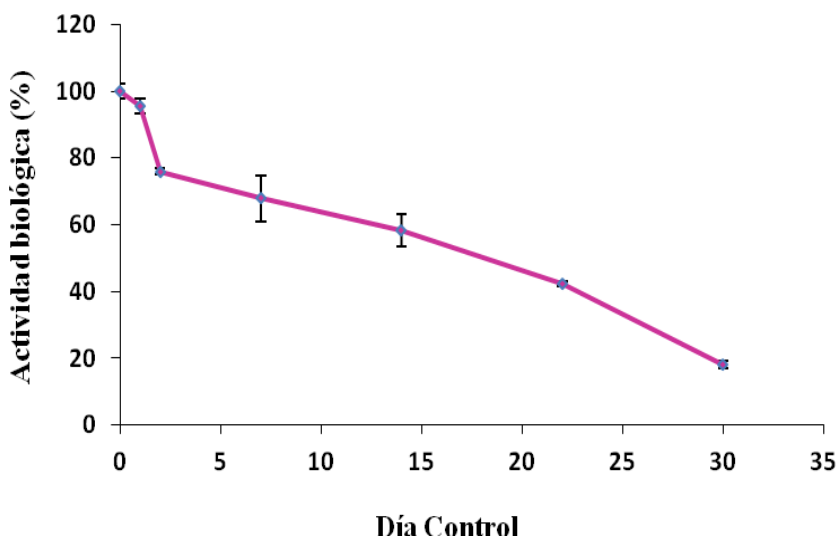


Figura 5.4. Estabilidad de un vial de Erbitux® 5 mg/ml conservado a 4°C.

Capítulo V

De forma análoga, la tabla 5.10 muestra los resultados para las alícuotas congeladas, y la figura 5.5, los resultados de disminución de la actividad biológica de las alícuotas congeladas.

Tabla 5.9. Estabilidad de un vial de Erbitux[®] 5 mg/ml conservado a -20°C.

N° VIAL	DIA CONTROL	PROMEDIO CONCENTRACIÓN (mg/ml)	ACTIVIDAD REMANENTE (%)	ACTIVIDAD PERDIDA (%)
1 (14.01.14)	0	5,0	100	0
	1	3,2	64,8	35,2
	2	2,9	58,4	41,6
	3	3,3	65,9	34,1
	7	2,2	43,1	56,9
	14	2,4	47,7	52,3
	22	1,3	25,2	74,8
	30	0,6	11,9	88,1

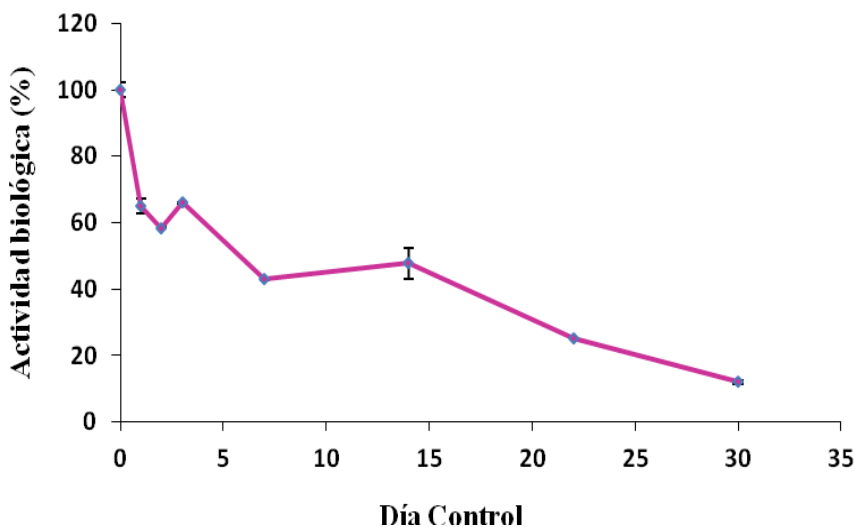


Figura 5.5. Estabilidad de un vial de Erbitux[®] 5 mg/ml conservados a -20°C.

De los resultados obtenidos se observa que la actividad biológica de Erbitux[®] 5 mg/ml conservado a 4°C decrece continuamente desde el día dos de ensayo, no siendo muy pronunciada dicha pérdida de funcionalidad durante este día (24 %). A partir del tercer día de control, en el que la pérdida de actividad es de un 32 %, el decrecimiento se va haciendo más pronunciado, llegando a perder el 41,8 % de su actividad biológica a las dos semanas, y la mitad de la misma el día 22 de control. Se observa que a los 30 días de análisis, la muestra conservada a 4°C ha perdido su actividad en un 82 %, dando por lo tanto finalizado el estudio de estabilidad.

Para el vial de Erbitux[®] conservado a -20°C, sorprendentemente la pérdida de actividad se produce de forma más acelerada, habiendo perdido un 35 % aproximadamente de su actividad tras 24 horas después de ser abierto el vial y ser congelado, cerca de un 42 % a los dos días, un 57 % a la semana de ensayo y aproximadamente un 75 % a los veintidós días, incrementándose dicha pérdida de actividad en un 13 % el último día de control (88 %).

Capítulo V

A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio, y considerando el límite de $\pm 10\%$ usado en los estudios de estabilidad práctica [38] [39] comúnmente empleados para determinar la estabilidad en condiciones de uso hospitalario de los sobrantes de medicamentos y preparaciones farmacéuticas entre otros, se puede concluir que, la actividad biológica de Erbitux[®] se mantiene, una vez abierto el vial, durante 24 horas conservado refrigerado a 4°C. Sin embargo, Erbitux[®] conservado a -20°C muestra una pérdida de actividad de un 35 % tras las primeras 24 horas, por tanto no podría considerarse estable bajo esta condición de temperatura ensayada. Indicar que es frecuente que se produzcan modificaciones en las conformaciones de las proteínas por el propio proceso de congelación/descongelación, haciendo en muchos casos este proceso irreversible y conllevando pérdida de funcionalidad, como podría ocurrir en el caso de este medicamento, con el CTX.

6. CONCLUSIONES

Dado el gasto sanitario que supone el empleo del FBIO CTX y su importancia como tratamiento contra el cáncer, con objeto de establecer la estabilidad del mismo desde el punto de vista de su funcionalidad en condiciones habituales de uso hospitalario, fue desarrollado y validado un ELISA específico para CTX mediante el cual se hace reaccionar el mAb con su Ag correspondiente EGFR.

El ELISA propuesto ha sido validado siguiendo las recomendaciones de organismos internacionales (ICHs) para la cuantificación de la actividad biológica del mAb CTX, mostrando unos valores satisfactorios para todos los parámetros estudiados, los cuales han sido: modelo de calibración, intervalo de concentraciones de aplicación, límites de detección y cuantificación, precisión, exactitud/veracidad y especificidad/selectividad. Esto hace que sea un método de análisis adecuado para la determinación cuantitativa de la actividad biológica del mAb CTX, principio activo del medicamento Erbitux[®] 5 mg/ml, en estudios relacionados con el mismo en los que esta propiedad deba de ser evaluada.

Se trata además, de un método que permite evaluar la funcionalidad del FBIO CTX de forma sencilla y rápida.

El método desarrollado fue aplicado en un estudio de estabilidad en el tiempo de un vial de Erbitux[®] durante 30 días. Una vez abierto el vial, Erbitux[®] fue conservado a 4°C y -20°C protegido de la luz y fue analizado durante un mes, en diferentes días control para cuantificar la actividad biológica remanente. Los resultados obtenidos mostraron que la pérdida de actividad biológica sufrida por el MB se produce de forma ligeramente más pronunciada en las muestras conservadas congeladas. Sin embargo, de los resultados obtenidos para la muestra de Erbitux[®] conservada a 4°C, se puede concluir que el MB presenta una estabilidad, desde el punto de vista de su actividad biológica, de 24 horas tras la apertura del vial, siendo la pérdida de la misma aproximadamente un 5 %.

Por tanto, el ELISA indirecto no competitivo propuesto, ha demostrado su aplicabilidad en estudios de estabilidad en el tiempo de CTX, realizados con objeto de aportar datos para evaluar la posible reutilización de los excedentes creados diariamente de este medicamento en los servicios de farmacia hospitalaria, debido a los elevados costes que suponen los tratamientos en los que está implicado este mAb.

Capítulo V

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Marín Pozo J.F. *et al.* Estudio de utilización de cetuximab en cáncer colorrectal metastásico en un hospital de tercer nivel. Servicio de Farmacia, Complejo Hospitalario Jaén, Jaén, España. *Farm Hosp.* 2009; 33(2):72-9.
- [2] Agencia Europea de Medicamentos (EMA). Ficha técnica de Erbitux® (Cetuximab). <http://www.ema.europa.eu>
- [3] Xuanming Yang *et al.* Cetuximab-mediated Tumor Regression Depends on Innate and Adaptive Immune Responses. *Molecular Therapy* vol. 21 no. 1, 91–100 jan. 2013.
- [4] Azzopardi N. *et al.* Cetuximab Pharmacokinetics Influences Progression-Free Survival of Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 2011;17: 6329-6337.
- [5] Berger C. *et al.* Cetuximab in combination with anti-human IgG antibodies efficiently down-regulates the EGF receptor by macropinocytosis. *Experimental Cell Research* (2012).
- [6] Jedlinsk A. *et al.* EGFR status and EGFR ligand expression influence the treatment response of head and neck cancer cell lines. *J Oral Pathol Med* (2013) 42: 26–36.
- [7] Misale S. *et al.* Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 486, 532–536 (28 June 2012).
- [8] Agnieszka Weinandy *et al.* Cetuximab Induces Emel1-Mediated DNA Repair: a Novel Mechanism for Cetuximab Resistance. *Neoplasia* (2014) 16 (3), 207–220.
- [9] Mirone G. *et al.* Review. Signaling mechanisms of resistance to EGFR- and Anti-Angiogenic Inhibitors cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.08.012>.
- [10] Chung C.H. *et al.* Cetuximab-Induced Anaphylaxis and IgE Specific for Galactose- α -1,3-Galactose. *N Engl J Med.* 2008 March 13; 358(11): 1109–1117.
- [11] Mariotte D. *et al.* Anti-cetuximab IgE ELISA for identification of patients at a high risk of cetuximab-induced anaphylaxis. *mAbs* .Volume 3, Issue 4, 396-401; July/August 2011.

- [12] Takuya Iwamoto *et al.* A novel approach to predict cetuximab-induced hypersensitivity reaction: detection of drug-specific IgE on basophils. *Cancer Medicine* 2016; 5(6):1004–1012.
- [13] Baselga J. The EGFR as a target for anticancer therapy-focus on cetuximab. *European Journal of Cancer* 37(2001) S16–S22.
- [14] Santos Ramos B. *et al.* Use of monoclonal antibodies for metastatic colorectal cancer in the andalusian public health system. *Int. J. Clin. Pharm.* (2013) 35: 550-553.
- [15] Yang Z.Y. *et al.* Chemotherapy with cetuximab versus chemotherapy alone for chemotherapy-naïve advanced non-small cell lung cancer (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2014, Issue 11. Art. No.: CD009948. DOI: 10.1002/14651858.CD009948.pub2.
- [16] Ryutaro Asano *et al.* Humanization of the Bispecific Epidermal Growth Factor Receptor CD3 Diabody and Its Efficacy as a Potential Clinical Reagent. *Clin Cancer Res* 2006;12(13) July 1, 2006.
- [17] Kwang-Won Hong *et al.* A novel anti-EGFR monoclonal antibody inhibiting tumor cell growth by recognizing different epitopes from cetuximab. *Journal of Biotechnology* 145 (2010) 84–91.
- [18] Itay Barnea *et al.* Targeting EGFR-positive cancer cells with cetuximab–ZZ-PE38: Results of in vitro and in vivo studies. *Head & Neck-DOI 10.1002/HED.2012*. Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).
- [19] Mato E. *et al.* Selective Antitumoral Effect of Sorafenib Loaded PLGA Nanoparticles Conjugated with Cetuximab on Undifferentiated/Anaplastic Thyroid Carcinoma Cells. *J Nanomed Nanotechnol* 2015, Volume 6, Issue 3.
- [20] Shawn F. *et al.* Assays for Assessing the Compatibility of Therapeutic Proteins with Flexible Drug Containers, Trends in Immunolabelled and Related Techniques. Baxter Healthcare Corporation, USA. (2012). Dr. Eltayb Abuelzein (Ed.), ISBN: 978-953-51-0570-1, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/trends-in-immunolabelled-and-related-techniques/assays-for-assessing-the-compatibility-of-therapeutic-proteins-with-flexible-drug-containers>.
- [21] Luedke E. *et al.* Cetuximab therapy in head and neck cancer: Immune modulation with interleukin-12 and other natural killer cell-activating cytokines. *Surgery* (2012); 152:431-40.

Capítulo V

- [22] Huertas Fernández M. J. Tratamiento con cetuximab en pacientes con cáncer colorrectal metastásico que no expresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico. *Farm. Hosp. Vol. 31. N° 5, pp. 264-269, 2007.*
- [23] Yong-Feng Yu *et al.* The Effects of Cetuximab Alone and in Combination With Endostatin on Vascular Endothelial Growth Factor and Interleukin-8 Expression in Human Lung Adenocarcinoma Cells. *Current Therapeutic Research. Volume 70, Number 2, April 2009.*
- [24] Nicolas Cézé MD. *et al.* An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Therapeutic Drug Monitoring of Cetuximab. *Ther Drug Monit 2009; 31 (5):597-601.*
- [25] Hantash J. *et al.* The development, optimization and validation of an ELISA bioanalytical method for the determination of Cetuximab in human serum. *Anal. Methods, 2009, 1, 144–148.*
- [26] Charman S.A. *et al.* Techniques for assessing the effects of pharmaceutical excipients on the aggregation of porcine growth hormone. *Pharm Res 1993; 10:954-62.*
- [27] Maa Y.F. *et al.* Effect of high shear on proteins. *Biotechnol Bioeng 1996; 51:458-65.*
- [28] Lahlou A. *et al.* Mechanically-induced aggregation of the monoclonal antibody cetuximab. *Annales Pharmaceutiques Françaises (2009) 67, 340-352.*
- [29] Ikesue H. *et al.* Stability of cetuximab and panitumumab in glass vials and polyvinyl chloride bags. *Am J Health Syst Pharm. 2010 Feb 1; 67 (3): 223-6.*
- [30] Astier Alain *et al.* Long-term stability of diluted solutions of the monoclonal antibody Rituximab. *International Journal of Pharmaceutics.436 (2012)282-290.*
- [31] International Conference on Harmonization (ICH) guidelines ICH Q1A (R2), Stability Testing of New Drug Substances and Products.
- [32] International Conference on Harmonization (ICH) guidelines ICH Q2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.
- [33] International Conference on Harmonization (ICH) guidelines ICH Q1B, Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products.

[34] Lipton, C.R. *et al.* Guidelines for the validation and use of immunoassays for determination of introduced proteins in biotechnology enhanced crops and derived food ingredients. *Food Agric. Immunol.* 12 (2000)153-164.

[35] Findlay, J.W.A. *et al.* Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *J Pharm. Biomed. Anal.* 21 (2000) 1249-1273.

[36] De Silva, B. *et al.* Recommendations for the Bioanalytical Method Validation of Ligand-binding Assays to Support Pharmacokinetic Assessments of Macromolecules. *Pharmaceut. Res.* 20 (2003) 1885-1900.

[37] Boqué R. y Rius F. X. Avances en Quimiometría Práctica. *Servicio de Publicaciones e Intercambio científico de la Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela (1994).*

[38] Bardin C. *et al.* Guidelines for the practical stability studies of anti-cancer drugs: a European consensus conference. *Ann Pharm Fr.* 2011; 69:221-31.

[39] Barrueco N. Estabilidad de medicamentos en la práctica clínica. De la seguridad a la eficiencia. *Farm Hosp.* 2013;37(3):175-177.



CAPÍTULO VI

DETERMINACIÓN DE LA
ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE
TRASTUZUMAB (HERCEPTIN®)
MEDIANTE ELISA INDIRECTO

TTZ (Herceptin[®]) es un mAb humanizado dirigido contra el dominio extracelular de HER-2 y comercializado desde el año 2000. Está indicado para el tratamiento de pacientes adultos con cáncer de mama metastásico (CMM) y cáncer de mama precoz (CMP) HER-2 positivos, en monoterapia o en combinación con otros fármacos. También está indicado en el tratamiento del cáncer gástrico metastásico en combinación con capecitabina o 5-fluoracilo y cisplatino en pacientes adultos HER-2 positivo que no hayan recibido un tratamiento previo para metástasis [1-3]. Su mecanismo de acción aun no está muy claro, ya que muestra diferencias *in vivo* e *in vitro*, a pesar de que los datos indican claramente que TTZ produce una marcada inhibición del crecimiento de los tumores de mama e incluso puede erradicar los tumores bien establecidos [2]. Por ello, tanto los protocolos establecidos como los nuevos regímenes de uso clínico, deben ser optimizados y cuantificados y son necesarios métodos para obtener más datos farmacocinéticos de TTZ [4].

1. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE TRASTUZUMAB

Al igual que ocurre con los anteriores mAbs estudiados (IFX, BVZ y CTX), la bibliografía consultada muestra que la mayoría de estudios basados en el uso de TTZ van dirigidos a aclarar cuestiones surgidas del empleo del mismo, tales como aquellas relacionadas con su mecanismo de acción y resistencias [5] [6]; con la optimización de su administración [7] [8]; determinación de su eficacia clínica [6] [9-12] y comparación de la misma con nuevos fármacos administrados para el tratamiento de las mismas patologías, como el caso por ejemplo de lapatinib [13] [14] y pertuzumab entre otros [6] [12] [13]; su toxicidad [12]; su perfil de glicosilación [15]; sus perspectivas futuras [16]; desarrollo de nuevas formulaciones [17] como el conjugado TTZ-Emtansina (T-DM1) [13] [18] [19] entre otros [20] [21]; la creación de nuevos mAbs anti-HER-2 [22] y de biosimilares de TTZ como Hercules (Myl 1401O), nombre

Capítulo VI

comercial del biosimilar de Herceptin[®] desarrollado por Mylan y Herzuma, desarrollado por la compañía biotecnológica Celltrion.

Sin embargo, los estudios de estabilidad realizados sobre el propio mAb son escasos, estando la mayoría de ellos dirigidos a evaluar la estabilidad físico-química de TTZ reconstituido y conservado bajo diferentes condiciones y en diferentes tipos de envases, pero no así su estabilidad biológica.

Con referencia a su estabilidad y según indicaciones del fabricante, la *disolución reconstituida* de Herceptin[®] ha de utilizarse inmediatamente. Si la disolución es aséptica, puede conservarse 24 horas (aunque sin conservar por encima de 30°C) y no debe congelarse reconstituida [1]. En el caso de la *disolución* de Herceptin[®] *para infusión*: una vez transferido el medicamento del vial a la jeringa, es física y químicamente estable durante 48 horas a 2-8°C y posteriormente 6 horas a temperatura ambiente (máx. 30°C) con luz natural difusa [1]. Desde el punto de vista microbiológico, como Herceptin[®] no contiene ningún conservante antimicrobiano, el medicamento debe usarse inmediatamente. Dado que las disoluciones de Herceptin[®] no contienen conservante en cantidad efectiva, las disoluciones reconstituidas y diluidas deben conservarse refrigeradas a 2-8°C. El producto no está diseñado para ser almacenado tras la dilución y no deberá utilizarse después de la fecha de caducidad. Por tanto, Herceptin[®] se debe conservar en nevera (entre 2°C y 8°C) y no debe congelarse. Se ha de conservar el vial en el embalaje exterior para protegerlo de la luz y una vez fuera de la nevera, la formulación de Herceptin[®] subcutáneo se debe administrar dentro de las 6 horas y no se debe conservar por encima de 30°C [1]. Sin embargo, para el vial multiuso (450 mg) comercializado fuera de Europa, el fabricante indica que es estable durante un mes si se reconstituye con agua bacteriostática, pero solo 48 horas si es usado el complejo remodelador del nucleosoma de levaduras, SWI (de sus siglas en inglés "*SWItch Non Fermentable*"). Por lo tanto, esto indica que estos tiempos de estabilidad están establecidos en función del riesgo de contaminación microbiana y no de la estabilidad físico-química real.

Por el momento, los métodos de análisis para cuantificar TTZ son limitados y no son fáciles de realizar en cada laboratorio. Así, por ejemplo, Maple *et al.* desarrollaron un ensayo ELISA con reactivos comerciales [23], pero el método es laborioso y complejo de ejecutar. Posteriormente, Damen *et al.* también diseñaron un ELISA [24], pero requería la producción interna y la purificación de un Ab anti-idiotipo que no es comercialmente disponible [4].

El análisis de TTZ en muestras de suero y plasma humanos [25] es realizado en la mayor parte de los casos mediante ELISA, sin embargo, existen diferentes estudios destinados a desarrollar otras técnicas analíticas para cuantificar TTZ.

Así, por ejemplo, fue desarrollado un método para cuantificar TTZ usando HPLC acoplado con detección fluorescente [26], siendo este ensayo el primero mediante HPLC publicado con este fin.

Damen, C.W. *et al.* [27] también desarrollaron un nuevo inmunoensayo enzimático con péptidos (PEIA, del inglés *peptide enzyme immunoassay*) con detección elipsométrica para la determinación de TTZ en muestras de suero. Esta técnica sigue el procedimiento estándar de un ELISA, pero en lugar de un sustrato cromogénico, es usado un sustrato formador de precipitados y la cantidad de precipitados formada es medida por un elipsómetro [27]. El mismo grupo de investigación desarrolló y validó un ELISA sándwich para llevar a cabo el estudio farmacocinético de TTZ en muestras de suero y plasma humano diluidas usando para ello un Ab anti-idiotipo en conejos. Tras la purificación del material de conejo, los Abs anti-idiotipo fueron usados como Abs de captura en las placas ELISA. Después TTZ era enlazado al Ab de captura y el desarrollo del ELISA continuó mediante la adición de Abs anti-idiotipo biotinilados, que pueden unirse a TTZ. La detección era realizada mediante el uso del conjugado estreptavidina-poli peroxidasa de rábano picante y el sustrato (3,5, 30,50)-tetrametilbencidina (TMB). Como reactivo de parada de la reacción emplearon ácido sulfúrico y la absorbancia fue medida a 450 nm. [28]. Este grupo de investigación estudió además, las posibilidades analíticas de cuantificar TTZ intacto mediante HPLC acoplada con MS

Capítulo VI

electrospray (HPLC–ESI-MS). Su método MS resultó ser menos sensible que los métodos ELISA publicados con el mismo fin, sin embargo usando ESI-MS la cuantificación era más específica, pudiendo ser confirmada la masa molecular mediante el empleo de los programas bioinformáticos de deconvolución específica de proteínas [29].

Por su parte, M. P. Piechocki *et al.* [30] establecieron y compararon dos métodos para medir Abs anti-ErbB-2 (HER-2) mediante citometría de flujo y ELISA. En el ensayo de citometría de flujo el Ab fue medido mediante su enlace a una línea celular SKBR3 de cáncer de mama humano y el resultado obtenido mediante microscopía fluorescente, expresado como canal de fluorescencia media (MFC). En el ELISA, el Ab fue determinado a través de su unión a ErbB-2 recombinante humano secretado conteniendo el aminoácido 505 N-terminal fusionado a una proteína de fusión que fue producida en el sobrenadante de un cultivo de células D2F2 transfectadas (secE2/myc/His or secE2). El Ab de captura anti-Myc secE2 del sobrenadante del cultivo celular concentrado, fue usado como Ag diana en el ELISA y el resultado expresado como densidad óptica a 405 nm. Un mAb antihumano de ratón, denominado 9G6 fue usado como estándar. Como resultado, los investigadores concluyeron que el ELISA permitía medir concentraciones de Ab más bajas y un mayor número de muestras de forma simultánea, mientras que mediante citometría de flujo se podían medir concentraciones más elevadas de Ab y menor número de muestras, pero en menos tiempo, ya que no requería la preparación de proteína recombinante. Sin embargo, y dado que la concentración de Ab anti-ErbB-2 suele ser baja, recomiendan el uso del ELISA [30].

Recientemente Barbara Cardinali *et al.* desarrollaron un ELISA para realizar estudios clínicos y farmacocinéticos de TTZ con objeto de optimizar la terapia con el mismo. El método se realizó sensibilizando placas ELISA de 96 pocillos con alta capacidad de enlace de estreptavidina con una solución de péptido antigénico en PBS. Como Ab de detección usaron un IgG antihumano de cabra conjugado con fosfatasa alcalina, y la señal analítica fue obtenida a 405 nm. La secuencia peptídica sintetizada por ellos mismos, mimetizaba la porción extracelular del

receptor HER-2 que es reconocido por TTZ. Los resultados de validación del método demostraron que TTZ puede ser cuantificado de forma exacta y precisa en muestras de suero humano mediante el uso de este ensayo. El procedimiento podía además ser llevado a cabo con muestras de suero obtenidas de pacientes con cáncer de mama para evaluar los niveles séricos de TTZ. Por tanto, los autores indicaron que se podía tratar de un método útil para ser usado de forma rutinaria o diariamente en el laboratorio [4].

El grupo de investigación de David Jamieson *et al.* [25] también desarrolló y validó un método ELISA con células para medir TTZ en plasma humano. Este ensayo medía específicamente la interacción entre TTZ y HER-2. Tras someter a 5 ciclos de congelación/descongelación las muestras de TTZ, conservadas a -20°C durante 10 semanas y a 4°C durante 72 horas, no hubo pérdida de señal, fueron estables. Los controles de calidad también fueron estables al menos 6 meses a -80°C . Además midieron las concentraciones de TTZ en plasma de 30 pacientes tratados de metástasis o enfermedad temprana con Herceptin[®], resultando el método adecuado para este fin [25].

Todos estos trabajos de investigación demuestran que la técnica ELISA sigue siendo la más empleada para cuantificar y también para determinar la actividad biológica de TTZ. Sin embargo, el estudio de su estabilidad biológica como tal, en el propio vial y antes de ser administrado, ha sido poco estudiado hasta el momento, siendo muy escasos los trabajos realizados sobre esta. No ocurre así con los estudios de estabilidad fisicoquímica de TTZ, los cuales cada vez son más frecuentes y se encuentran en bibliografía. Algunos de estos estudios de estabilidad de TTZ quedan descritos a continuación.

Mediante el empleo de diferentes técnicas analíticas complementarias: SEC, CEX, mapeo péptidico, DLS, turbidimetría, espectrofotometría UV de segunda derivada, espectrometría FTIR y curvas de agregación termal, Muriel Paul *et al.* demostraron que TTZ diluido en cloruro sódico 0,9 % puede ser conservado en bolsas de infusión de poliolefina a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ o a temperatura ambiente ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 6 meses, sin evidencia de

Capítulo VI

inestabilidad física o química. No observaron agregación y su estructura tridimensional permaneció inalterada. Las muestras fueron analizadas los días 0, 14, 30, 90 y 180. Su resultado mostró la posibilidad de preparar baños estandarizados de TTZ diluido “listos para usar” y de minimizar costes, ya que su estabilidad en bolsas para pacientes durante varios días, hace que no tengan que ser administrados inmediatamente [31].

También Kaiser y Kramer [32] determinaron la estabilidad fisicoquímica de disoluciones de infusión de TTZ reconstituido listas para administrar, en solución de cloruro sódico al 0,9 % como vehículo, durante un período prolongado de 28 días y conservado a 2°C, 4°C, 8°C y a temperatura ambiente, bajo la protección de la luz y también bajo exposición a la misma, en bolsas de infusión de polipropileno. La estabilidad de estas disoluciones de infusión de TTZ se determinó mediante SEC, espectrometría UV-V, y SDS-PAGE. Los valores de pH se midieron semanalmente durante el período de almacenamiento, y las disoluciones de ensayo se examinaron visualmente para observar posibles cambios de color, turbidez o material particulado. Las pruebas de estabilidad utilizadas revelaron que las concentraciones de las disoluciones de infusión de TTZ, se mantuvieron por encima del 90 % de las concentraciones iniciales, independiente de las condiciones de almacenamiento. No se observaron productos de degradación y la exposición a la luz del día no afectó a la estabilidad de las disoluciones. Por tanto, concluyeron que las disoluciones de infusión de TTZ preparadas con solución de cloruro sódico al 0,9 % en bolsas de polipropileno listas para administrarse, se podrían almacenar durante un período de cuatro semanas, incluso cuando se almacenan a temperatura ambiente, sin protección de la luz. Sin embargo, por razones microbiológicas, los autores recomiendan el almacenamiento bajo refrigeración [32].

En otro estudio llevado a cabo por Pabari *et al.* se investigó la influencia del cizallamiento como factor estresante sobre la estabilidad de TTZ. El mAb en concentraciones de 0,4 a 4,0 mg/ml, se sometió a sonicación, congelación-descongelación, liofilización, secado por pulverización y fue encapsulado en micro y nanopartículas. Las muestras estresadas se

analizaron para determinar su integridad estructural mediante electroforesis en gel SDS-PAGE; el tamaño se determinó mediante SEC y la integridad conformacional se analizó por dicroísmo circular (CD). Además, se investigó la actividad biológica de TTZ midiendo la inhibición de la proliferación celular de líneas celulares que expresan HER-2. Los resultados mostraron que TTZ fue resistente a los procesos de tensión que fueron aplicados sobre el mismo y a los procesos de microencapsulación. A la concentración más baja (0,4 mg/ml), se formó un % bajo (< 9 %) de agregados solubles/reversibles. No se observó pérdida de la integridad estructural, de la conformación y tampoco ningún cambio significativo en la actividad biológica. Los resultados de este estudio concluyeron que TTZ puede ser resistente a diversas tensiones de procesamiento [33].

El mismo grupo de investigación evaluó de forma similar a la anterior, la estabilidad de disoluciones de TTZ intravenoso a diferentes concentraciones y conservado a 2-8°C durante 28 días. El valor del pH de las disoluciones de TTZ intravenoso permaneció estable todo el tiempo. Mediante el análisis con SEC-HPLC no observaron cambios en la concentración de monómero de TTZ, el ensayo realizado con SDS-PAGE mostró solo una banda de monómeros correspondiente al peso molecular de TTZ y el espectro obtenido mediante CD demostró la integridad de la conformación de la estructura secundaria de TTZ durante los 28 días. También demostraron su estabilidad sometiendo el mAb a condiciones de estrés térmico y agitación similares a las que puede sufrir en la práctica clínica diaria. Así, los resultados de este estudio mostraron que las disoluciones de TTZ intravenoso permanecen física y estructuralmente estables conservadas durante 28 días a 2-8°C [34].

Dashnor Nebija *et al.* [35] estudiaron la idoneidad de la electroforesis en gel para la evaluación de la heterogeneidad de carga, las modificaciones post-traduccionales y la estabilidad de TTZ sometido a degradación mediante estrés acelerado y conservado a largo plazo. Los datos experimentales mostraron que la electroforesis en gel 1D y 2D representa un método rápido y sencillo para evaluar la calidad de los MB y parámetros de estabilidad importantes, tales como la agregación termal de

Capítulo VI

proteínas y otras condiciones severas (temperatura, oxidación y pH bajo). En el caso de TTZ, establecieron que la influencia de la temperatura es notable solamente durante el periodo de almacenamiento más largo. Así, en las muestras almacenadas 45 días a 37°C, se observó una posible agregación de la molécula de Ab, agregación no observada en las muestras almacenadas durante un tiempo más corto, incluso a 37°C. Por otro lado, observaron diferencias significativas en el punto isoelectrico y la masa molecular de TTZ almacenado durante 7 días en una solución de ácido trifluoroacético al 1 % y una solución de peróxido de hidrógeno al 3 %, a temperatura ambiente. Determinaron, además, que bajo estas condiciones y elevadas temperaturas, la degradación se aceleraba sustancialmente, para finalmente darse la degradación completa y la desnaturalización de la muestra. Las muestras almacenadas a temperatura ambiente mostraban mayor agregación que las muestras almacenadas a 4-8°C. En las muestras de TTZ almacenadas en condiciones oxidantes y ácidas, durante 19 días a 37°C, también se observó agregación. TTZ almacenado a 4-8°C durante 31 días, mostró la misma masa molecular que almacenado a temperatura ambiente durante el mismo periodo de tiempo [35].

2. OBJETIVO

Tal y como ha quedado descrito anteriormente, la técnica ELISA para determinar TTZ es la empleada con mayor frecuencia. Sin embargo, habitualmente se utiliza para llevar a cabo estudios farmacocinéticos o de eficacia del mAb.

La ausencia de métodos publicados para la evaluación de la estabilidad biológica de TTZ como tal principio activo en medicamentos y en sus preparaciones farmacéuticas, motivó el desarrollo y validación de un ELISA específico para tal fin. Así, podrá ser determinada su funcionalidad biológica en el tiempo, es decir, su capacidad de unión a HER-2, en el propio medicamento y en las condiciones de uso hospitalario habituales; evaluando mediante este estudio la posibilidad de

ampliar su tiempo de validez con respecto a lo indicado por el fabricante, hecho que supondría un importante descenso del gasto sanitario.

3. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ELISA

Como habitual en el desarrollo de cualquier método de análisis, el primer paso consistió en la selección y optimización de las múltiples variables que pueden afectar al ELISA.

Al igual que para los mAbs estudiados anteriormente -BVZ y CTX-, la selección y la optimización de las diferentes variables, estuvo basada en los datos resultantes del ensayo previamente desarrollado y validado para determinar la actividad biológica del mAb IFX, y descrito en el Capítulo III de esta Tesis Doctoral.

3.1. *Selección de la modalidad ELISA*

El desarrollo y validación de inmunoensayos previos para poner de manifiesto la reacción Ag/Ab producida entre diferentes mAbs y sus correspondientes Ags, llevó a seleccionar la misma modalidad ELISA empleada en estos, siendo por lo tanto desarrollado en este Capítulo, un **ELISA indirecto no competitivo** para evaluar de forma directa la reacción HER-2-TTZ.

3.2. *Selección de las placas de microtitulación*

Las placas empleadas para el desarrollo del inmunoensayo fueron las placas de microtitulación de la marca Nunc Maxisorp[®]. Dado que en los ELISAs descritos en los capítulos anteriores, la sensibilización de estas placas con los Ags específicos de los diferentes mAbs ensayados fue óptima, y que este mAb es similar estructuralmente a los anteriores mAbs estudiados, se optó por el uso del mismo tipo de placas ELISA.

Capítulo VI

3.3. *Selección del anticuerpo secundario (conjugado)*

Debido a que TTZ es un mAb humanizado constituido por un 90 % humano, fue **seleccionado** como conjugado para llevar a cabo la reacción HER-2-TTZ, un **Ab secundario IgG antihumano marcado con peroxidasa**.

Estudios previos para el desarrollo de los ELISAs específicos de IFX, BVZ y CTX descritos en los Capítulos III, IV y V respectivamente, demuestran que el uso de este Ab conjugado permite revelar la reacción Ag/Ab de forma adecuada, de ahí la elección del mismo para llevar a cabo el desarrollo de este ELISA, específico para cuantificar TTZ.

3.4. *Selección de la concentración óptima de conjugado*

El desarrollo de este ELISA indirecto no competitivo, específico para TTZ, se llevó a cabo empleando una concentración de conjugado similar a la utilizada en el desarrollo de los inmunoensayos anteriormente descritos para IFX y BVZ, siendo dicha concentración de **5 µg/ml**. Mediante la aplicación del ELISA se comprobó que esta concentración de conjugado era adecuada para poner de manifiesto la reacción enzimática producida por TTZ y su correspondiente Ag, HER-2, siendo por lo tanto, la concentración de Ab secundario seleccionada.

3.5. *Optimización del proceso de sensibilización de las placas ELISA*

El desarrollo de esta técnica ELISA comienza por la sensibilización adecuada de las placas de microtitulación, de ahí la importancia de llevar a cabo la optimización de este proceso mediante la selección de diversas variables, como son la selección del *tampón diluyente*, la *concentración de antígeno (HER-2)* y el *intervalo de concentración de TTZ* empleados para desarrollar el ELISA.

La selección del diluyente a emplear, tanto para las muestras de TTZ como para el Ab conjugado y el Ag HER-2, se fundamentó en los resultados obtenidos con anterioridad en los ELISAs desarrollados y validados para el mAb IFX. De acuerdo a estos datos, fue seleccionada una **disolución tampón de carbonato 0,1 M de pH 9,6** como diluyente de estas proteínas, cuya concentración quedó optimizada en dichos inmunoensayos previos y su adecuación a este ELISA, verificada mediante el desarrollo del mismo en varios ensayos.

La concentración de HER-2 empleada para sensibilizar las placas ELISA fue similar a la utilizada de TNF- α para llevar a cabo el ELISA con IFX, esto es, **1 $\mu\text{g/ml}$ de disolución de HER-2**. Mediante el desarrollo del ensayo, se comprobó que esta concentración de Ag era adecuada para dar lugar a la obtención de señales analíticas para las cuales la reacción del Ag daba lugar a una saturación de la señal, por lo que finalmente, esta fue la concentración de Ag seleccionada para dar lugar a una óptima sensibilización de las placas.

Para aplicar el ELISA propuesto fue empleado un intervalo de concentraciones de TTZ entre 500 y 0,0005 $\mu\text{g/ml}$. A partir de los resultados obtenidos, se observó que para una concentración de TTZ igual a 1 $\mu\text{g/ml}$ y para concentraciones ensayadas superiores a esta (hasta 500 $\mu\text{g/ml}$), las señales analíticas de absorbancia oscilaban entre 1,20 y 2, (Figura 6.1) siendo dichas señales indicativas de saturación. Por tanto, y con objeto de determinar la concentración de TTZ para la cual las señales analíticas de absorbancia no mostrasen saturación, se desarrolló el inmunoensayo limitando la concentración máxima ensayada a 0,5 $\mu\text{g/ml}$, de forma que los valores de absorbancia obtenidos no superaron en ningún caso un valor de 0,80. Concentraciones por debajo de 0,0025 $\mu\text{g/ml}$ mostraron valores de absorbancia muy similares a los obtenidos con un blanco (Figura 6.2). Por tanto, el intervalo de concentraciones de trabajo seleccionado para establecer el modelo de calibración, fue el comprendido entre 0,0025 $\mu\text{g/ml}$ y 0,5 $\mu\text{g/ml}$, o lo que es lo mismo, entre **2,5 ng/ml y 500 ng/ml de TTZ**.

Capítulo VI

3.6. *Selección del volumen de disoluciones a adicionar en la placa ELISA*

Los datos experimentales recabados mediante el desarrollo y validación de los ELISAs previamente descritos en esta Tesis Doctoral, indican que la adición de un volumen de 100 μl por pocillo tanto de la **disolución de Ag**, como de la **disolución bloqueante**, así como de las **disoluciones del Ab primario, Ab secundario y del sustrato de la reacción enzimática**, es apropiado para el desarrollo de estos. De forma que, basándonos en estos resultados previos, para el desarrollo del ELISA específico de TTZ, dichas disoluciones también fueron adicionadas en un volumen igual a **100 μl por pocillo**.

Así mismo, los datos obtenidos en ensayos previos, establecen que para llevar a cabo la parada de la reacción enzimática, es suficiente la adición de **50 μl de disolución de parada**, siendo por tanto seleccionado este volumen como el apropiado para la parada de la reacción enzimática que tiene lugar en el ELISA descrito en el presente Capítulo.

3.7. *Selección de las variables restantes*

Al igual que quedó descrito en Capítulos anteriores, la selección del resto de variables que influyen en el correcto desarrollo del ELISA aquí propuesto, se llevó a cabo mediante consulta bibliográfica, optando por el empleo de las variables usadas con mayor frecuencia. Dichas variables seleccionadas se muestran de forma abreviada en la siguiente tabla 6.1.

Tabla 6.1. Parámetros y variables seleccionadas para el desarrollo del ELISA específico para TTZ.

Parámetro/variable	Parámetro/variable seleccionado
Disolución tampón de bloqueo	Leche en polvo 2% (w/v) + PBS 0,15 M pH 7,4 – Tween 20 0,3 % (v/v)
Disolución tampón de lavado	PBS 0,15 M pH 7,4 – Tween 20 0,3 % (v/v)
Nº ciclos de lavado/aspiración tras cada etapa	4
Enzima de marcaje	Peroxidasa
Sustrato de la reacción enzimática	OPD Sigmafast TM
Reactivo de parada de la reacción enzimática	H ₂ SO ₄ 1 M
Temperatura y tiempos de incubación tras adición de los distintos reactivos	
Reactivo adicionado	Temperatura y tiempo de incubación
Tras adición de HER-2 a la placa	Incubación a 4°C durante 18 horas (“overnight”). Placas cubiertas con parafilm
Tras adición de disolución bloqueante	Incubación a 37°C durante 2 horas. Placa cubierta con parafilm
Tras adición del Ab primario TTZ	Incubación a 37°C durante 45 minutos. Placas cubiertas con parafilm
Tras adición del Ab secundario conjugado	Incubación a 37 °C durante 30 minutos. Placas cubiertas con parafilm
Tras adición del sustrato	Incubación a temperatura ambiente, en oscuridad, durante 20 minutos. Placas sin cubrir
Tras adición del reactivo de parada de la reacción enzimática (H ₂ SO ₄ 1 M)	Lectura inmediata

4. DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS DEL ELISA DESARROLLADO

Una vez optimizadas y seleccionadas las variables del método ELISA indirecto no competitivo desarrollado, a continuación se describen las etapas de las que consta el mismo, y que son resumidas en tres etapas principales, las cuales engloban el conjunto de pasos a seguir para el desarrollo del ensayo. Estas etapas quedan esquematizadas en la figura 6.1.

Capítulo VI

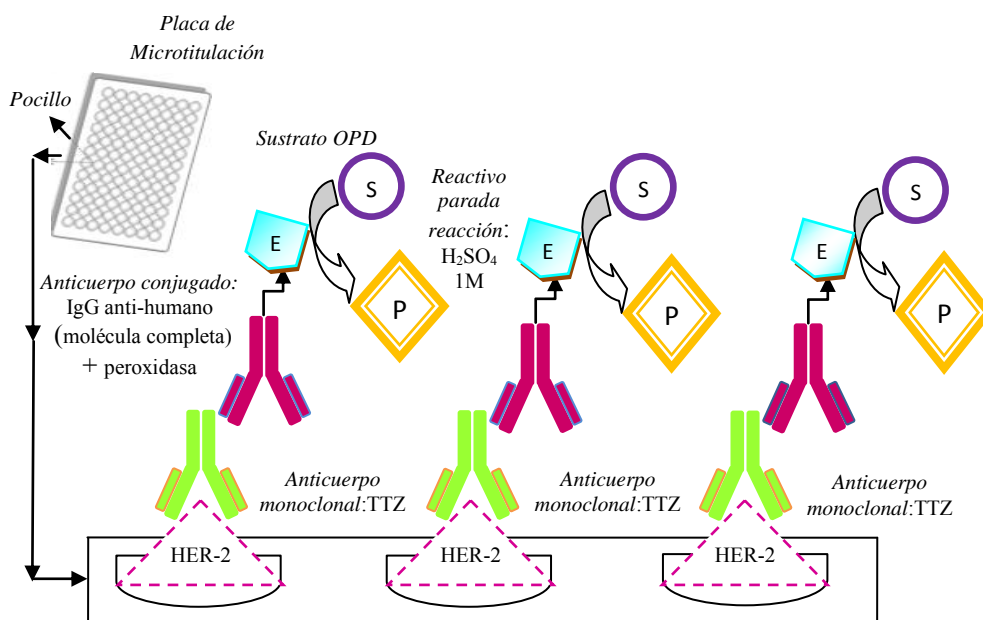


Figura 6.1. Descripción del método ELISA desarrollado para la cuantificación de TTZ. Fuente: elaboración propia.

ETAPA 1. SENSIBILIZACIÓN DE LA PLACA ELISA CON HER-2

El primer paso para el desarrollo de este ELISA es clave, ya que la correcta aplicación del mismo está fundamentada en este. Consiste en la sensibilización de las placas de microtitulación con el Ag específico de TTZ, es decir, con HER-2. Para ello las placas ELISA Nunc Maxisorp[®] de 96 pocillos fueron sensibilizadas con HER-2. e incubadas durante 18 horas a 4°C (overnight) usando 100 μ l de HER-2 preparado a una concentración de 1 μ g/ml con tampón carbonato 0,1 M de pH 9,6. A continuación se realizaron cuatro lavados con el correspondiente tampón de lavado PBS 0,15 M (pH 7,4) - Tween 20 (0,3 % v/v) alternados con cuatro aspiraciones, tras los cuales se adicionó el tampón de bloqueo, consistente en leche en polvo 2 % (w/v) diluida en el tampón de lavado y se incubó durante 2 horas a 37°C. Tras finalizar la incubación, las placas fueron lavadas de nuevo cuatro veces con el mismo tampón de lavado

citado anteriormente y cada lavado fue alternado con su correspondiente aspiración.

ETAPA 2. REACCIÓN Ag/Ab

El ELISA continua mediante la ejecución del siguiente paso, consistente en la adición de 100 μ l de TTZ diluido en tampón carbonato 0,1 M, de pH 9,6, en un intervalo de concentraciones comprendido entre 2,5 y 500 ng/ml. Estas placas fueron entonces incubadas durante 45 minutos a 37°C, periodo en el que tiene lugar la reacción HER-2/TTZ evaluada. Seguidamente, se vuelven a realizar cuatro ciclos de lavado alternados con aspiraciones, quedando la placa lista para ser sometida a la siguiente etapa.

ETAPA 3. REVELADO DE LA REACCIÓN HER-2/TTZ

Tras los lavados y aspiraciones con los que finalizó la etapa anterior, a continuación se procedió a desvelar la reacción producida entre el Ag y el mAb estudiado, esto es, entre HER-2 y TTZ. Para ello, fueron adicionados 100 μ l del IgG anti-humano (molécula completa) marcado con peroxidasa (Ab secundario de detección) y diluido a una concentración de 5 μ g/ml en tampón carbonato 0,1 M de pH 9,6. Seguidamente, estas placas fueron incubadas durante 30 minutos a 37°C. Tras este periodo de incubación en el que tiene lugar la reacción entre el Ab primario TTZ y el Ab secundario conjugado, las placas fueron sometidas de nuevo a cuatro ciclos de lavado y aspiración. Finalmente se adicionó sobre las placas el sustrato de la reacción, el OPD, dispensando en cada pocillo 100 μ l de disolución del mismo. A continuación, las placas fueron incubadas sin cubrir, en oscuridad y a temperatura ambiente (24°C aproximadamente) durante 20 minutos, tras los cuales se paralizó la reacción enzimática mediante la adición de 50 μ l/pocillo de ácido sulfúrico 1 M. Como último paso para el desarrollo del ELISA, se realizó la lectura inmediata de las placas, midiendo la absorbancia a dos longitudes de onda diferentes, 450 y 620 nm, y siendo la señal analítica la diferencia entre los dos valores obtenidos.

5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ELISA

5.1. *Validación del método ELISA propuesto*

Siguiendo las recomendaciones descritas tanto en estudios de validación específicos de inmunoensayos [36-38] como en las guías ICH, referidas a productos biotecnológicos [39-41], ha sido realizada la validación del ELISA propuesto en este Capítulo y específico para el mAb TTZ. De tal forma, se ha evaluado:

- Función de calibrado.
- Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).
- Intervalo de detección (ID) e intervalo de cuantificación (IC).
- Precisión, evaluada estudiando la precisión intra-día y la precisión inter-día (repetibilidad y reproducibilidad respectivamente).
- Exactitud/veracidad como porcentaje de recuperación.
- Especificidad/selectividad evaluada mediante un estudio de reacciones cruzadas.

5.1.1. **Función de calibrado**

La función de calibrado a la cual se ajustan los datos experimentales de este ELISA, fue establecida a partir de los resultados obtenidos para el intervalo de concentraciones de trabajo de TTZ ensayado, en el cual las señales analíticas de absorbancia se relacionan con la concentración de mAb evaluada. Para ello, se partió de disoluciones estándar de TTZ, preparadas a partir del medicamento Herceptin® 15 mg/ml, MB considerado como patrón para este estudio, y cuyas concentraciones fueron: 2,5 ng/ml; 5 ng/ml; 10 ng/ml; 25 ng/ml; 50 ng/ml; 75 ng/ml; 200 ng/ml; 300 ng/ml y 500 ng/ml, preparadas por triplicado y aplicando el método ELISA propuesto. Mediante el empleo del método de mínimos cuadrados parciales, los datos de absorbancia obtenidos fueron usados para determinar el modelo matemático al que mejor se ajustan dichos datos, respondiendo la relación entre la señal de absorbancia y el intervalo

de concentración de TTZ evaluado, a un modelo polinómico, cuya ecuación es la siguiente:

$$y (\text{Absorbancia}) = -2,35 x^2 (\text{Concentración})^2 + 2,34 x + 0,095$$

El coeficiente de correlación (r) obtenido para esta función de calibrado fue 0,9959 (Figura 6.2), lo cual indica que hay una fuerte relación entre las variables.

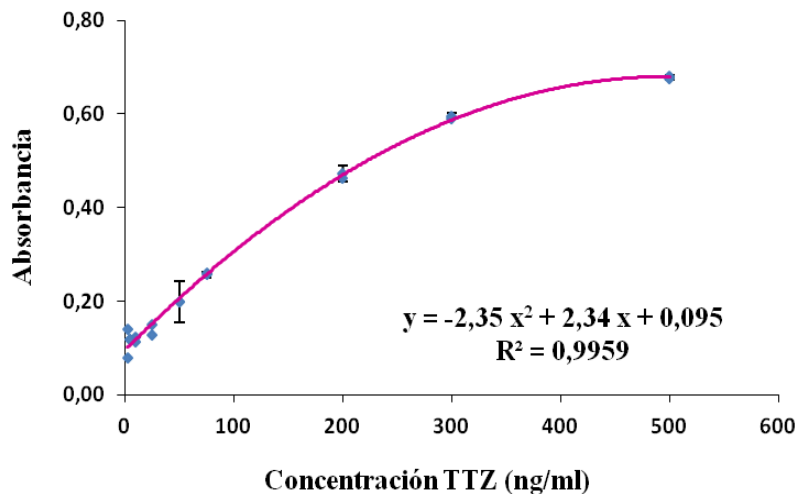


Figura 6.2. Función de calibrado HER-2-TTZ mediante ELISA indirecto no competitivo.

Los parámetros estadísticos de la función de calibrado obtenida se muestran en la tabla 6.2.

Capítulo VI

Tabla 6.2. Parámetros estadísticos de la función polinómica de calibrado de TTZ.

Parámetro	Valor
Función	$y = -2,35 x^2 + 2,34 x + 0,095$
s (a) ⁽¹⁾	0,08
s (b) ⁽²⁾	0,15
s (b) ⁽³⁾	0,005
Error estándar del estadístico	0,0148
R ² (%) ⁽⁴⁾	99,6
P-Valor del modelo	0,0000
Intervalo de aplicabilidad	1,4 - 400 (ng/ml)

1. Desviación estándar de la concentración.
2. Desviación estándar del cuadrado de la concentración.
3. Desviación estándar de la constante para la función polinómica.
4. Coeficiente de correlación en porcentaje.

A partir del dato obtenido para el P-Valor de este modelo, se puede declarar que existe relación estadísticamente significativa para un nivel de confianza del 95 %, entre la señal analítica de absorbancia y el intervalo de concentración evaluado.

Además, a través de la gráfica, se puede observar que a partir de la concentración de 400 ng/ml la señal analítica de absorbancia no sufre un gran cambio con la concentración, de forma que se fijó en este valor de concentración el valor máximo de la aplicabilidad de la función de calibrado.

Al igual que para los mAbs estudiados anteriormente, en este caso también fue abordado el estudio de la homogeneidad de varianzas mediante la representación gráfica de los residuos frente a la concentración ensayada [42], de forma que se puede detectar la existencia de valores atípicos. En la figura 6.3 se muestra la gráfica correspondiente a dichos residuos, mediante la cual se observó la existencia de homogeneidad de varianzas (los residuos están distribuidos aleatoriamente alrededor de cero).

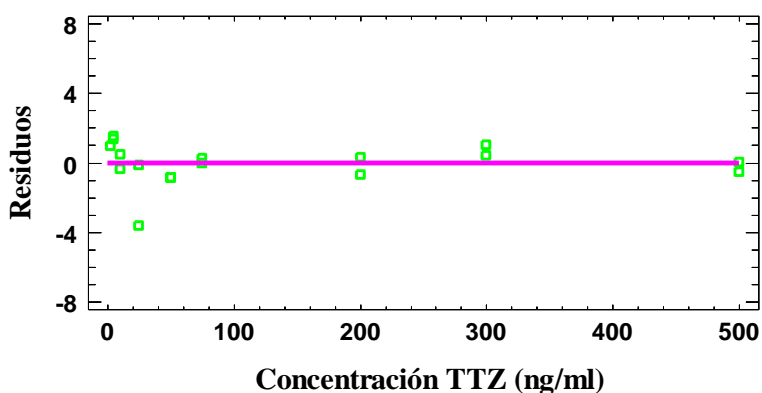


Figura 6.3. Gráfico de residuos de TTZ

Los datos obtenidos mediante el análisis de residuos y el coeficiente de regresión, hacen que se pueda afirmar que la respuesta de la señal obtenida con la concentración de TTZ es polinómica en el intervalo de concentraciones evaluado, y que por tanto, su comportamiento se ajusta a la función que se muestra en la tabla 6.2.

Capítulo VI

5.1.2. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

Los **límites de detección y de cuantificación** de TTZ para el ELISA propuesto, se obtienen aplicando las ecuaciones ya definidas tanto en el Capítulo II de esta Tesis Doctoral como en los Capítulos sucesivos. De tal forma se establece que ambos límites son **0,5 ng/ml y 1,4 ng/ml respectivamente**.

5.1.3. Intervalo de detección (ID) e intervalo de cuantificación (IC)

A partir de los datos obtenidos de límite de detección y límite de cuantificación del método, se establece el **intervalo de detección** del mismo.

Así mismo, a partir del límite de cuantificación del método y hasta el valor de concentración máximo ensayado para el cual la señal analítica obtenida varía en función de la concentración de mAb adicionada, queda definido el *intervalo de cuantificación* del método.

En la siguiente tabla 6.3 quedan definidos ambos intervalos.

Tabla 6.3. IC e ID del modelo establecido para TTZ

ID	0,5-1,4 ng/ml
IC	1,4 -400 ng/ml

En virtud de los resultados obtenidos para el límite de detección- 0,5 ng/ml- y para el límite de cuantificación -1,4 ng/ml-, se puede concluir que el ELISA sugerido es sensible para el intervalo de concentraciones ensayado.

También queda establecido un intervalo de detección del método comprendido entre 0,5 ng/ml y 1,4 ng/ml y un intervalo de cuantificación entre 1,4 ng/ml y 400 ng/ml.

5.1.4. Precisión

La precisión del ELISA indirecto no competitivo propuesto fue evaluada estudiando la reproducibilidad intra-día (repetibilidad) e inter-día.

Al igual que para los inmunoensayos desarrollados y validados para los mAbs IFX, BVX y CTX, ambos parámetros fueron calculados mediante el análisis de 10 muestras patrón preparadas a la misma concentración y bajo las mismas condiciones experimentales.

La repetibilidad fue calculada mediante el ensayo de todas las muestras un mismo día.

Por su parte, el dato de reproducibilidad fue obtenido mediante la evaluación de las muestras patrón durante 4 días.

Tanto repetibilidad como reproducibilidad fueron definidas como la DER (%) de las concentraciones calculadas a partir de las señales analíticas obtenidas usando la función de calibrado estándar. Ambas fueron evaluadas a tres concentraciones diferentes: 0,4; 0,1 y 0,01 µg/ml, que se encuentran dentro de la función de calibrado establecida.

Los resultados obtenidos de repetibilidad quedan definidos en la tabla 6.4 y los resultados de reproducibilidad en la tabla 6.5.

Capítulo VI

Tabla 6.4. Precisión intra-día (repetibilidad) de TTZ.

TTZ concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Promedio concentración 10 réplicas ($\mu\text{g/ml}$)	Desviación estándar (DE) ($\mu\text{g/ml}$)	DER (%)
0,4	0,48	0,02	3,7
0,1	0,099	0,003	2,8
0,01	0,0103	0,0005	4,6

Dado que para las tres concentraciones ensayadas 0,4, 0,1 y 0,01 $\mu\text{g/ml}$, la DER (%) resultante fue menor al 10 %, se puede afirmar que este ELISA específico para TTZ es repetitivo para las condiciones de trabajo seleccionadas.

Tabla 6.5. Precisión inter-día (reproducibilidad) de TTZ.

TTZ concentración (µg/ml)	Día control	Promedio concentración 10 réplicas/día	Promedio concentración (4 días)	Desviación estándar (DE) (µg/ml)	DER (%)
0,4	1	0,44	0,45	0,04	8,9
	2	0,43			
	3	0,41			
	4	0,50			
0,1	1	0,092	0,09	0,009	10,7
	2	0,074			
	3	0,091			
	4	0,095			
0,01	1	0,011	0,012	0,0003	2,8
	2	0,012			
	3	0,012			
	4	0,012			

Los resultados obtenidos para las tres concentraciones ensayadas, muestran que la DER (%) fue menor al 10 % para las concentraciones de 0,4 y 0,1 µg/ml, siendo ligeramente superior al 10 % para la concentración de 0,01 µg/ml, esto es, 10,7 %. Así, y dados estos datos, se puede afirmar que este ELISA específico para TTZ es reproducible para las condiciones de trabajo seleccionadas.

Por lo tanto, en base a que se trata de un método repetitivo y reproducible, se puede concluir que este ELISA es un método preciso de análisis.

Capítulo VI

5.1.5. Exactitud/veracidad

La exactitud del ELISA propuesto para determinar cuantitativamente TTZ, fue evaluada siguiendo el mismo procedimiento aplicado para establecer la exactitud en los ELISAs desarrollados anteriormente para los mAbs IFX, BVZ y CTX y que quedó descrito en los Capítulos previos a este.

De tal manera, la exactitud fue determinada como porcentaje de recuperación (R, %), mediante el análisis de 10 muestras de trabajo estándar a tres concentraciones diferentes: 0,4; 0,1 y 0,01 $\mu\text{g/ml}$ que se encuentran dentro de la función de calibrado establecida, quedando expuestos los resultados obtenidos en la siguiente tabla 6.6.

Tabla 6.6. Estudio de recuperación

TTZ concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Promedio concentración 10 réplicas ($\mu\text{g/ml}$)	Recuperación (%)
0,4	0,40	100,8
0,1	0,110	109,6
0,01	0,0095	94,8

Los porcentajes de **recuperación** obtenidos para las tres concentraciones evaluadas, acatan la premisa previamente establecida con respecto a la concentración inicial, cuyo valor es igual a $\pm 10\%$. Así que, **estos resultados permiten** afirmar que **el método ELISA propuesto es exacto para determinar la concentración de TTZ en su medicamento**

Herceptin® o en cualquier otra formulación en la que TTZ sea su principio activo.

Los dos parámetros establecidos, precisión y exactitud, presentan coeficientes de variación menores al 20 % ($CV \leq 20 \%$), por lo tanto, ambos cumplen con los criterios indicados para la validación de métodos bioanalíticos [38].

5.1.6. Especificidad/selectividad

La especificidad/selectividad del ELISA propuesto para determinar TTZ, fue evaluada mediante un estudio de reacciones cruzadas.

→ *Estudio de reacciones cruzadas*

El estudio consistió en la aplicación del inmunoensayo descrito para TTZ sobre mAbs diferentes a éste, pero estructuralmente similares.

Así, sobre placas ELISA sensibilizadas con HER-2 1 $\mu\text{g/ml}$, Ag específico de TTZ, se adicionan como Abs primarios otros mAbs diferentes a TTZ y para los cuales su Ag es diferente. A continuación, el resto de etapas del ensayo se desarrollan tal y como quedaron descritas anteriormente.

Los mAbs ensayados fueron BVZ, CTX, IFX y RTX, a una concentración similar para todos e igual a 0,2 $\mu\text{g/ml}$, concentración que se encuentra dentro de la función de calibrado previamente establecida para cada uno de estos mAbs.

En la tabla 6.7 se pueden observar los resultados obtenidos en este estudio de reacciones cruzadas, a través de los cuales se puede concluir la no existencia de las mismas con respecto al método analítico desarrollado, tratándose por lo tanto de un ensayo específico para el mAb TTZ y no para la determinación de otros FBIOs.

Capítulo VI

Tabla 6.7. Estudio de reacciones cruzadas. ELISA específico para TTZ.

mAb específico	Concentración HER-2 (µg/ml)	mAb no específico	Concentración mAbs no específico (µg/ml)	Concentración obtenida mAb específico (µg/ml)	Promedio concentración obtenida mAb no específico (µg/ml)
TTZ	1	BVZ	0,2	0,23	0,021
		CTX			0,019
		IFX			0,015
		RTX			0,020

Las señales analíticas obtenidas tras el desarrollo del ensayo con los mAbs no específicos BVZ, CTX, IFX y RTX, se corresponden con concentraciones cuyo valor es muy inferior al ensayado de 0,2 µg/ml y similar al que se obtendría mediante la evaluación de una muestra en blanco.

Estos resultados permiten realizar la afirmación de que no se producen reacciones cruzadas entre los cuatro FBIOS estudiados y que el ELISA propuesto es específico para la cuantificación de TTZ.

5.2. Estudios de degradación acelerada

Los estudios de degradación acelerada se llevaron a cabo mediante la aplicación del ELISA propuesto a muestras de Herceptin® 15 mg/ml, procedentes de un mismo vial y previamente sometidas durante un periodo de 24 horas a diferentes condiciones de estrés, como temperatura elevada (50 y 70°C), luz visible, exposición a pH extremos (HCl 0,1 M y NaOH 0,1 M), fuerza iónica (NaCl 1,5 M) y medios oxidantes (H₂O₂ 1 % y 10 % v/v).

La exposición del MB a pH extremos, fuerza iónica y medios oxidantes fue realizada mediante la adición de 50 µl de agente estresante a 0,5 ml de dicho MB, siendo por tanto la concentración final de agente estresante de un 10 % (v/v).

A continuación, y tras 24 horas de exposición del mismo ante las diferentes condiciones de estrés, las muestras fueron diluidas a una concentración de 0,1 µg/ml con tampón carbonato 0,1 M de pH 9,6 para posteriormente realizar el ELISA empleando cuatro réplicas de cada una de estas muestras.

Tras el desarrollo del método, la actividad biológica obtenida para cada una de las muestras estresadas, fue comparada con la actividad biológica de una muestra estándar no sometida a estrés y preparada en el momento de realizar el análisis. Los datos de actividad biológica resultantes se pueden observar en la tabla 6.8.

Tabla 6.8. Estudios de degradación forzada de Herceptin® 15 mg/ml

AGENTE ESTRÉS	CONCENTRACIÓN OBTENIDA TRAS DEGRADACIÓN (mg/ml)	ACTIVIDAD REMANENTE (%)	PÉRDIDA DE ACTIVIDAD (%)
NaOH 0,1M ⁽¹⁾	7,1	47,6	52,4
HCl 0,1M ⁽¹⁾	8,4	56,0	44,0
H ₂ O ₂ 1 % ⁽¹⁾	8,2	54,8	45,2
H ₂ O ₂ 10 % ⁽¹⁾	8,0	53,5	46,5
NaCl 1,5 M	8,1	53,9	46,1
T (50°C)	9,7	64,7	35,3
T (70°C)	2,7	17,7	82,3
LUZ VISIBLE	13,3	88,8	11,2

* Concentración inicial de Herceptin®: 15 mg/ml

(1) Concentración de agente estresante: 10 % (v/v) (50 µl de agente estresante añadidos a 0,5 ml de Herceptin®).

Capítulo VI

Los datos resultantes tras someter las diferentes muestras de Herceptin® 15 mg/ml indican que se trata de un mAb cuya actividad biológica no se ve tan afectada ante la exposición a medios de degradación acelerada como ocurre en el caso de los mAb estudiados anteriormente, ya que todas las muestras presentan una actividad biológica remanente significativa.

Así, y como era de esperar, la exposición del MB a 70°C da lugar a la mayor degradación del mismo, sin embargo, este mantiene una funcionalidad del 17,7 % con respecto a la inicial. Ante una temperatura menos elevada, 50°C la pérdida de actividad biológica sufrida por Herceptin® es del 35,3 %, lo cual indica que el despliegue térmico sufrido por la proteína no lleva a una desnaturalización completa.

La exposición a la luz provoca una oxidación de la proteína o un cambio en su estructura o conformación mínimo, ya que el resultado de pérdida de actividad de la misma es solo del 11,2 %.

En cuanto a la exposición de la proteína ante un medio básico o ácido, la disminución de la actividad biológica es algo más pronunciada, siendo reducida aproximadamente a la mitad (47,6 %) cuando se somete el MB a un medio básico y por encima de esta (56 %) cuando se somete a un medio ácido. Ambos resultados son esperables, dado que ante pH extremos se promueve la desamidación de la proteína, así como la hidrólisis ácida y básica que puede dar lugar a su distorsión química.

Sorprendentemente, la exposición de Herceptin® a estrés oxidativo (tanto en alta como en baja concentración) y a fuerza iónica da lugar a una pérdida de actividad muy similar, por encima del 53 % en ambos casos, y probablemente debida a los cambios conformacionales y la desnaturalización sufrida por el MB ante dichas condiciones de degradación.

5.3. *Aplicación del método ELISA propuesto. Evaluación de la actividad biológica en el tiempo de TTZ (Herceptin®)*

El estudio de estabilidad del MB Herceptin® 15 mg/ml, cuyo principio activo es TTZ, fue realizado mediante el empleo de dos viales de dicho MB pertenecientes a un mismo lote, pero cuya apertura tuvo lugar en días diferentes. Muestras de ambos viales fueron conservadas protegidas de la luz a tres temperaturas diferentes, concretamente a 4°C, -20°C y -80°C. La conservación de las muestras a una temperatura de ultracongelación fue realizada con la finalidad de observar cómo afecta la disminución drástica de la temperatura a la funcionalidad del mAb y comparar si la pérdida de la misma es similar, superior o inferior a la sufrida cuando es conservado a una temperatura de congelación inferior (-20°C). En muchas proteínas es indicada su congelación a -80 °C, por no ser efectiva en su conservación la temperatura de -20°C. Es este estudio se quiso realizar una evaluación de este hecho en el TTZ.

Tres réplicas de cada una de las muestras conservadas fueron analizadas mediante el método ELISA propuesto, siendo para ello diluidas justo antes del inicio del análisis en tampón carbonato 0,1 M de pH 9,6.

El inmunoensayo también fue aplicado en una muestra de cada uno de los viales ensayados tras la apertura y reconstitución de los mismos por el Servicio de Farmacia Hospitalaria, siendo el resultado de actividad biológica obtenido para estas muestras considerado como la actividad inicial del MB, esto es, la actividad en el día 0 de control.

Uno de los viales de Herceptin® fue analizado durante 15 días para las tres condiciones de conservación ensayadas, siendo los días de control para las muestras refrigeradas los días 0, 1, 2, 3, 10 y 15, los días 0, 2, 3, 7, 10 y 15 para las muestras congeladas a -20°C y los días 0, 2, 3, 7 y 15 para las muestras congeladas a -80°C.

El segundo vial de Herceptin® fue analizado para las tres condiciones de conservación durante una semana, siendo los días de control similares en los tres estudios: días 0, 1, 2 3 y 7.

Capítulo VI

Tal y como quedó descrito en los estudios de estabilidad realizados previamente para los MB Remicade[®], Avastin[®] y Erbitux[®], la actividad biológica fue expresada como porcentaje de actividad biológica remanente en comparación con la actividad inicial del mAb en cada momento de control y obtenida mediante la aplicación de las ecuaciones ya definidas en los Capítulos anteriores correspondientes al estudio de los citados MB.

Los resultados obtenidos para las muestras conservadas a 4°C se muestran en la tabla 6.9 y la representación gráfica de los mismos en la figura 6.4.

Tabla 6.9. Estabilidad de dos viales de Herceptin[®] 15 mg/ml conservados a 4°C.

Nº VIAL	DIA CONTROL	PROMEDIO CONCENTRACIÓN (mg/ml)	ACTIVIDAD REMANENTE (%)	ACTIVIDAD PERDIDA (%)
1 (16.09.14)	0	15,0	100	0
	1	11,3	75,3	24,7
	2	6,3	41,9	58,1
	3	6,0	39,7	60,3
	10	4,8	32,0	68,0
	15	5,3	35,1	64,9
2 (23.09.14)	0	15,0	100	0
	1	9,7	64,6	35,4
	2	7,3	48,5	51,5
	3	3,3	21,9	78,1
	7	3,8	25,5	74,5

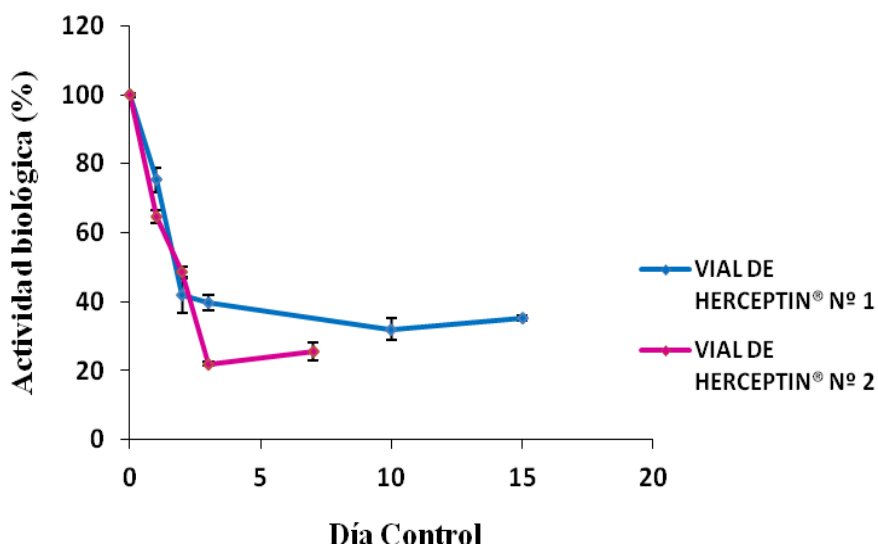


Figura 6.4. Estabilidad de dos viales de Herceptin® 15 mg/ml conservados a 4°C.

Tras realizar el estudio de estabilidad de dos viales de Herceptin® 15 mg/ml conservados a 4°C, se puede concluir, que:

- El vial número 1 conserva un 75 % de su actividad biológica inicial tras 24 horas de conservación, actividad que se reduce a un 41,9 % a las 48 horas de estudio, es decir, la pérdida de actividad con respecto a las 24 horas se ve aumentada en un 33 % aproximadamente. A partir del tercer día de análisis y hasta la conclusión del mismo el día 15 de conservación, la pérdida de funcionalidad mostrada por el MB es similar, oscilando entre un 60-68 %, pérdida tan pronunciada que fue decisiva para dar por finalizado el estudio.
- En cuanto al vial número 2 de Herceptin® 15 mg/ml, conservado durante 1 semana a 4°C, se puede afirmar en base a los resultados obtenidos tras realizar el estudio, que dicho MB conserva una actividad biológica próxima al 65 % tras las primeras 24 horas de conservación, siendo por lo tanto la pérdida de actividad sufrida por este vial número 2 un 10 %

Capítulo VI

mayor a la pérdida de actividad sufrida por el vial número 1 bajo condiciones y tiempo de conservación similares.

A las 48 horas el MB presenta una actividad remanente superior a un 48 %, actividad que se disminuye aproximadamente a un 22 % a las 72 horas de conservación y que se mantiene hasta el último día de estudio (día 7).

De tal manera, los datos experimentales resultantes, muestran que, sorprendentemente, la pérdida de actividad sufrida por el segundo vial de Herceptin® 15 mg/ml evaluado (vial número 2), se produce de forma ligeramente más acelerada que en el vial número 1 ensayado, siendo ambos viales pertenecientes a un mismo lote. Tal hecho lleva a pensar en una posible existencia de variabilidad de actividad biológica intra e inter lotes. Aún así, este hecho no ha sido corroborado experimentalmente, de forma que esta afirmación no es concluyente.

A continuación, en la tabla 6.10, se muestran los resultados experimentales resultantes del estudio de estabilidad de dos viales de Herceptin® conservados a -20°C, cuya representación gráfica puede observarse en la figura 6.5.

Tabla 6.10. Estabilidad de dos viales de Herceptin® 15 mg/ml conservados a -20°C.

N° VIAL	DIA CONTROL	PROMEDIO CONCENTRACIÓN (mg/ml)	ACTIVIDAD REMANENTE (%)	ACTIVIDAD PERDIDA (%)
1 (16.09.14)	0	15,0	100	0
	2	7,4	49,6	50,4
	3	6,6	43,8	56,2
	7	8,3	55,4	44,6
	10	4,1	27,6	72,4
	15	5,7	37,8	62,2
2 (23.09.14)	0	15,0	100	0
	1	10,2	67,7	32,3
	2	7,5	49,8	50,2
	3	3,6	23,9	76,1
	7	4,8	31,7	68,3

Capítulo VI

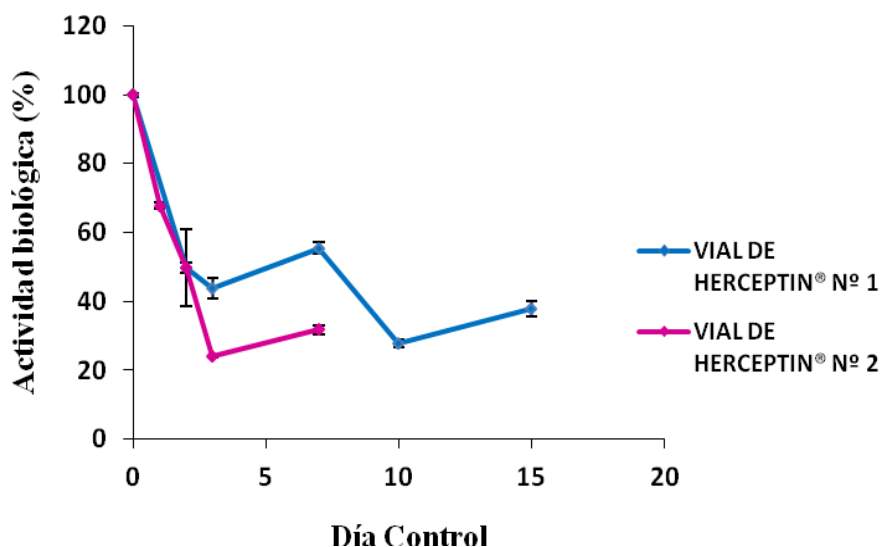


Figura 6.5. Estabilidad de dos viales de Herceptin® 15 mg/ml conservados a -20°C.

La evolución de la actividad biológica de Herceptin® 15 mg/ml en el tiempo, siendo conservado a -20°C varía de la siguiente forma:

- El vial número 1 ensayado, ve reducida su actividad biológica inicial a la mitad durante las primeras 48 horas, pérdida que se mantiene durante una semana para, finalmente, verse incrementada hasta un 72 % aproximadamente a los 10 días de conservación. A la finalización del estudio, esto es, día 15 de conservación, la pérdida de actividad se mantiene a los niveles del día 10.

- La pérdida de funcionalidad mostrada por el vial número 2 estudiado, se corresponde con una pérdida de actividad superior al 32 % a las 24 horas de conservación. Esta actividad se ve aumentada hasta la mitad de la actividad biológica inicial presentada por el MB a las 48 horas. Sin embargo, a partir del tercer día de control y hasta el día 7 de control, día en que el estudio se da por finalizado, la pérdida de actividad se produce de una forma mucho más acelerada, llegando a ser de un 76 %.

Para estas condiciones de conservación, y al igual que en el caso anterior, la pérdida de actividad biológica sufrida por el vial número 2 del MB estudiado, se produce de forma algo más rápida que en el vial número 1, siendo ambos pertenecientes a un mismo número de lote.

El estudio realizado conservando Herceptin® 15 mg/ml a -80°C dio lugar a los resultados expuestos en la tabla 6.11 cuya representación gráfica se muestra en la figura 6.6.

Tabla 6.11. Estabilidad de dos viales de Herceptin® 15 mg/ml conservados a -80°C.

Nº VIAL	DIA CONTROL	PROMEDIO CONCENTRACIÓN (mg/ml)	ACTIVIDAD REMANENTE (%)	ACTIVIDAD PERDIDA (%)
1 (16.09.14)	0	15,0	100	0
	2	6,0	40,3	59,7
	3	6,8	45,2	54,8
	7	7,6	50,7	49,3
	15	6,7	44,9	55,1
2 (23.09.14)	0	15,0	100	0
	1	7,5	49,9	50,1
	2	4,2	28,1	71,9
	3	3,5	23,5	76,5
	7	3,4	22,8	77,2

Capítulo VI

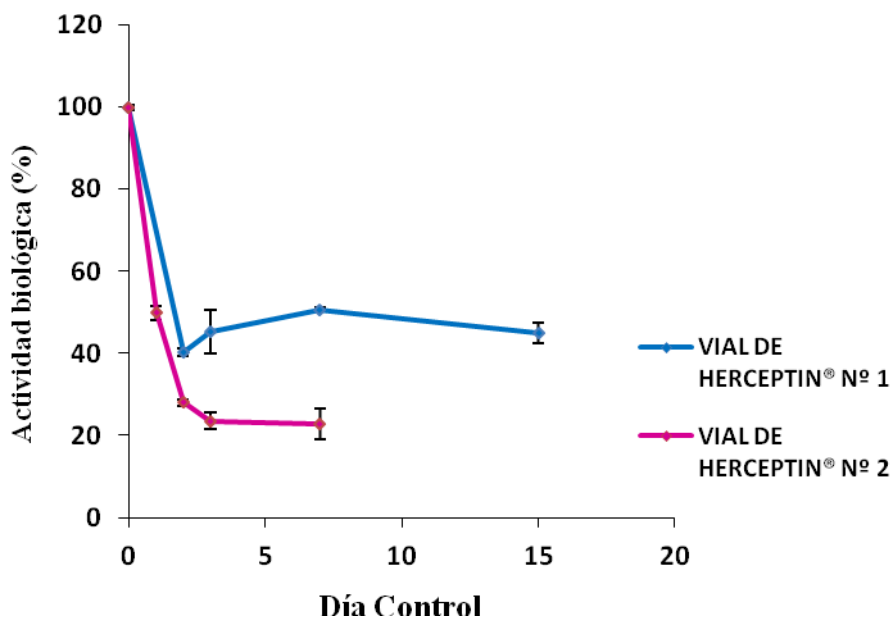


Figura 6.6. Estabilidad de dos viales de Herceptin® 15 mg/ml conservados a -80°C.

Los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad de Herceptin® 15 mg/ml muestran que la reducción de la actividad biológica se produce de la forma descrita a continuación:

- El vial número 1 del MB evaluado, muestra una actividad biológica remanente del 40-50 % con respecto a su actividad inicial tras conservarse durante 15 días en las condiciones descritas anteriormente.
- El vial número 2 de Herceptin®, muestra una pérdida de actividad del 50 % el día 1 de control, sin embargo, y a diferencia del vial número 1, el segundo día de control la pérdida de actividad se ve incrementada, siendo ésta de un 72 % aproximadamente, y aumentando de forma progresiva hasta la finalización del estudio el día 7.

De nuevo bajo estas condiciones de conservación, los dos viales de Herceptin® evaluados y pertenecientes a un mismo lote, muestran una

pérdida de actividad diferente entre sí a partir del tercer día de ensayo, siendo mucho más pronunciada en el vial número 2.

6. CONCLUSIONES

En el presente Capítulo ha quedado descrito el desarrollo y validación de un ELISA específico para TTZ, mediante el cual se hace reaccionar este FBIO con su Ag correspondiente HER-2; siendo la finalidad de este ensayo determinar la funcionalidad de TTZ como tal principio activo, usando Herceptin® 15 mg/ml como MB que contiene dicho mAb y antes de ser administrado.

La validación del ELISA se ha hecho siguiendo las principales guías ICHs y las recomendaciones propuestas en estudios de validación específicos de inmunoensayos [36-41]. De tal manera que para todos los parámetros estudiados, esto es, modelo de calibración, intervalo de cuantificación del método, límites de detección y cuantificación, precisión, exactitud/veracidad y especificidad/selectividad, los resultados han sido satisfactorios.

Este inmunoensayo ha sido aplicado en un estudio de estabilidad en el tiempo de dos viales de Herceptin® 15 mg/ml pertenecientes a un mismo lote, conservados a tres temperaturas diferentes, 4°C, -20°C y -80°C y protegidos de la luz.

La pérdida de actividad mostrada en las unidades del medicamento Herceptin® 15 mg/ml congeladas a diferente temperatura (-20°C y -80°C), indica que esta es independiente de dicha temperatura de congelación, ya que la disminución de funcionalidad es semejante a ambas temperaturas, y a su vez semejante con las muestras almacenadas a la temperatura de refrigeración de 4°C.

De los datos obtenidos, se puede concluir que TTZ en las condiciones de conservación estudiadas (4°C, -20°C y -80°C) no permanece estable

Capítulo VI

durante un periodo superior al indicado por el fabricante, ya que no cumple el límite de $\pm 10\%$ usado en los estudios de estabilidad práctica [43] [44], siendo la pérdida de actividad a partir del día 1, próxima o incluso superior en algunos casos al 50 % en todas las condiciones ensayadas.

Como conclusión final, se puede afirmar que el ELISA desarrollado y validado es específico para TTZ y adecuado para la realización de estudios de estabilidad del mismo en cuanto a su actividad biológica se refiere y a partir de su formulación farmacéutica de origen.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Agencia Europea de Medicamentos (EMA). Ficha técnica de Herceptin® (Trastuzumab). <http://www.ema.europa.eu>.
- [2] Carretero M.. Medicamentos de Vanguardia.Trastuzumab. *Offarm Vol 21 Núm 7 Julio-Agosto 2002*.
- [3] Hudis, C.A. Trastuzumab. Mechanism of action and use in clinical practice. *N.Engl. J. Med. (2007); 357, 39–51*.
- [4] Cardinali B. *et al.* Trastuzumab quantification in serum: a new, rapid, robust ELISA assay based on a mimetic peptide that specifically recognizes trastuzumab. *Anal Bioanal Chem - 15 May 2014*.
- [5] Nahta R. and Esteva F.J. Mini review. Herceptin: mechanisms of action and resistance. *Cancer Letters 232 (2006) 123–138*.
- [6] Bianchini G. and Gianni L. Review. The immune system and response to HER2-targeted treatment in breast cancer. *Lancet Oncol 2014; 15: e58–68*.
- [7] Moja L. *et al.* Trastuzumab containing regimens for early breast cancer (Review). *The Cochrane Library 2012, Issue 4*.
- [8] Pivot X. *et al.* Preference for subcutaneous or intravenous administration of trastuzumab in patients with HER2-positive early breast cancer (PrefHer): an open-label randomised study. *Lancet Oncol 2013; 14: 962–70*.
- [9] Pradip De *et al.* Molecular determinants of trastuzumab efficacy: What is their clinical relevance?. *Cancer Treatment Reviews 39 (2013) 925–934*.
- [10] Catarina Pinto A. *et al.* Trastuzumab for patients with HER2 positive breast cancer: Delivery, duration and combination therapies. *The Breast 22 (2013) S152-S155*.
- [11].Albanell J. *et al.* Trastuzumab in small tumours and in elderly women. *Cancer Treatment Reviews 40 (2014) 41–47*.
- [12] Kümler I. *et al.* A systematic review of dual targeting in HER2-positive breast cancer. *Cancer Treatment Reviews 40 (2014) 259–270*.

Capítulo VI

- [13] Kamal S. *et al.* Beyond trastuzumab: New treatment options for HER2-positive breast cancer. *The Breast* 20 (2011) S3, S20–S27.
- [14] Bükmann Larsen P. *et al.* A systematic review of trastuzumab and lapatinib in the treatment of women with brain metastases from HER2-positive breast cancer. *Cancer Treatment Reviews* 39 (2013) 720–727.
- [15] Damen C.W.N. *et al.* Electrospray ionization quadrupole ion-mobility time-of-flight mass spectrometry as a tool to distinguish the lot-to-lot heterogeneity in N-Glycosylation profile of the therapeutic monoclonal antibody trastuzumab. *J Am Soc Mass Spectrom* 2009, 20, 2021–2033.
- [16] Hall P.S. and Cameron. D.A. Current perspective–Trastuzumab. *European Journal of Cancer* 45 (2009) 12–18.
- [17] Scheer J.M. *et al.* Reorienting the Fab Domains of Trastuzumab Results in Potent HER2 Activators. *PLoS ONE*. December 2012 | Volume 7 | Issue 12 | e51817.
- [18] Girish S. *et al.* Clinical pharmacology of trastuzumab emtansine (T-DM1): an antibody–drug conjugate in development for the treatment of HER2-positive cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* (2012) 69:1229–1240.
- [19] Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Informe de posicionamiento terapéutico PT-TRASTUZUMAB-EMTANSINA/V1/10072015. *Fecha de publicación: 27 de julio de 2015.*
- [20] Mijung Jang *et al.* Trastuzumab-Conjugated Liposome-Coated Fluorescent Magnetic Nanoparticles to Target Breast Cancer. *Korean J Radiol* 2014; 15(4):411-422.
- [21] Rahmania H. *et al.* Synthesis and stability test of radiogadolinium (III)-DOTA-PAMAM G3.0-trastuzumab as SPECT-MRI molecular imaging agent for diagnosis of HER-2 positive breast cancer. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 8 (2015) 91-99.
- [22] Mohammad Mehdi *et al.* Construction and characterization of a new chimeric antibody against HER2. *Immunotherapy*. 5 (7):703-715, July 2013.
- [23] Lathrop M. L. *et al.* Development and validation of ELISA for Herceptin[®] detection in human serum. *J. Immunol. Methods* (2004) 295, 169.

- [24] Damen C.W.N. *et al.* Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of trastuzumab in human serum and plasma. *Anal. Biochem* (2009); 391, 114.
- [25] Jamieson D. *et al.* Development and validation of cell-based ELISA for the quantification of trastuzumab in human plasma. *Journal of Immunological Methods* 345 (2009) 106–111.
- [26] Damen C. W.N. *et al.* The bioanalysis of the monoclonal antibody trastuzumab by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after immuno-affinity purification from human serum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 50 (2009) 861–866.
- [27] Damen C.W.N. *et al.* The bioanalysis of trastuzumab in human serum using precipitate-enhanced ellipsometry. *Analytical Biochemistry* 393 (2009) 73–79.
- [28] Damen C.W.N. *et al.* Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of trastuzumab in human serum and plasma. *Analytical Biochemistry* 391 (2009) 114–120.
- [29] Damen C.W.N. *et al.* Quantitative aspects of the analysis of the monoclonal antibody trastuzumab using high-performance liquid chromatography coupled with electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 46 (2008) 449–455.
- [30] Piechocki M.P. *et al.* Quantitative measurement of anti-ErbB-2 antibody by flow cytometry and ELISA. *Journal of Immunological Methods* 259 2002. 33–42.
- [31] Muriel P. *et al.* Long-term physico-chemical stability of diluted trastuzumab. *International Journal of Pharmaceutics* 448 (2013) 101– 104.
- [32] Kaiser J. and Krämer I. Physicochemical stability of diluted trastuzumab infusion solution in polypropylene infusion bags. *Int. J. Pharm. Comp.* 2011. Vol. 15, (6) 515–520.
- [33] Pabari R.M. *et al.* Effect of microencapsulation shear stress on the structural integrity and biological activity of a model monoclonal antibody, trastuzumab. *Pharmaceutics* 2011. 3, 510–524.
- [34] Pabari R.M. *et al.* Physical and Structural Stability of the Monoclonal Antibody, Trastuzumab (Herceptin®), Intravenous Solutions. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2013, 14, 000-000.

Capítulo VI

- [35] Nebija D. *et al.* Quality Control and Stability Studies with the Monoclonal Antibody, Trastuzumab: Application of 1D- vs. 2D-Gel Electrophoresis. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 6399-6411.
- [36] Lipton C.R. *et al.* Guidelines for the validation and use of immunoassays for determination of introduced proteins in biotechnology enhanced crops and derived food ingredients. *Food Agric. Immunol.* 12 (2000)153-164.
- [37] Findlay J.W.A. *et al.* Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *J Pharm. Biomed. Anal.* 21 (2000) 1249-1273.
- [38] De Silva B. *et al.* Recommendations for the Bioanalytical Method Validation of Ligand-binding Assays to Support Pharmacokinetic Assessments of Macromolecules. *Pharmaceut. Res.* 20 (2003) 1885-1900.
- [39] International Conference on Harmonization (ICH) guidelines ICH Q2 (R1), Validation of analytical procedures: text and methodology.
- [40] International Conference on Harmonization (ICH) guidelines ICH Q1A (R2), Stability Testing of New Drug Substances and Products.
- [41] International Conference on Harmonization (ICH) guidelines ICH Q1B, Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products.
- [42] Boqué R. y Rius F.X. Avances en Quimiometría Práctica. *Servicio de Publicaciones e Intercambio científico de la Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela (1994).*
- [43] Bardin C. *et al.* Guidelines for the practical stability studies of anti-cancer drugs: a European consensus conference. *Ann Pharm Fr.* 2011; 69:221-31.
- [44] Barrueco N. Estabilidad de medicamentos en la práctica clínica. De la seguridad a la eficiencia. *Farm Hosp.* 2013;37(3):175-177.



CONCLUSIONES Y
LÍNEAS FUTURAS
DE ACTUACIÓN

Tal y como ha quedado descrito en la presente Tesis Doctoral, el empleo de MB para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, así como de diferentes tipos de patologías autoinmunes, es cada vez más frecuente. Sin embargo, dada su naturaleza biológica, el coste que suponen estos tratamientos es muy elevado, llegando en algunos casos a superar los 40.000 € el tratamiento durante un año. Además, y de nuevo debido a su naturaleza, la caducidad oficial que presentan este tipo de medicamentos es mucho más limitada que la de MSQ, siendo habitualmente de 24 a 48 horas tras la apertura de los viales y/o reconstitución del contenido de los mismos en los casos que sea necesario. Este hecho da lugar a la existencia de excedentes que suponen un incremento del gasto sanitario.

En esta Tesis Doctoral se han desarrollado diferentes ELISAs específicos para el estudio de los mAbs IFX, BVZ, CTX y TTZ, en los cuales se hace reaccionar cada mAb con su Ag correspondiente, siendo este último además su diana clínica. La finalidad de estos inmunoensayos es disponer de una herramienta válida y robusta que permita determinar la estabilidad, desde un punto de vista de la funcionalidad biológica, de estos FBIOs en sus propias medicinas, Remicade[®], Avastin[®], Erbitux[®] y Herceptin[®], respectivamente, en condiciones de uso hospitalarias y tras la apertura del vial. Así, para el estudio y determinación de IFX ha sido desarrollado un ELISA directo y un ELISA indirecto y para BVZ, CTX y TTZ han sido puestos a punto ELISAs indirectos.

Estos ELISAs han sido validados siguiendo las recomendaciones de organismos internacionales (como por ejemplo ICH), siendo en todos los casos los datos resultantes satisfactorios para todos los parámetros estudiados: modelo de calibración, intervalo de concentraciones de aplicación del método, límites de detección y cuantificación, precisión, exactitud/veracidad y especificidad/selectividad. Los resultados obtenidos permiten indicar que son por tanto métodos de análisis apropiados para la determinación cuantitativa, de forma sencilla y rápida, de la actividad biológica de estos mAbs.

Conclusiones y líneas futuras de actuación

La especificidad/selectividad de los métodos se ha evaluado llevando a cabo estudios de reacciones cruzadas entre los mAbs estudiados, para estimar las posibles interferencias producidas por mAbs similares y quedando establecida de este modo la aplicabilidad del método para el análisis del mAb considerado. Los resultados obtenidos muestran que los ELISAs desarrollados son específicos para cada FBIO para el que han sido desarrollados y validados, excepto para CTX, en el que existe una cierta afinidad entre el EGFR y los otros mAbs comerciales ensayados (de un 20 % aproximadamente).

También se han realizado estudios de degradación acelerada (estudios de estrés) de los medicamentos estudiados, que aunque se han revelado como no adecuados en el contexto de la validación de los métodos ELISA (como discutido en esta Tesis Doctoral), sí son muy importantes desde el punto de vista del conocimiento de las pautas de degradación de los mismos, lo cual es importante para una correcta manipulación en su uso hospitalario. En estos estudios, los MB evaluados han sido expuestos a diferentes condiciones de degradación durante 24 horas, tras las cuales han sido analizados mediante la aplicación de los inmunoensayos desarrollados para cada uno de ellos. A partir de los resultados obtenidos, se puede afirmar que todos los MB presentan cierta actividad remanente tras su exposición ante pH extremos, medios oxidativos, fuerza iónica, luz visible y temperatura de 50°C, siendo la temperatura de 70°C la única condición ambiental que da lugar a la degradación total, en cuanto a actividad biológica se refiere, de los MB evaluados, lo cual se justifica por una total desnaturalización de los mAbs a esa temperatura. Con respecto a la fuerza iónica del medio, empleando NaCl como electrolito, los resultados manifiestan una gran estabilidad frente a este factor, lo cual es positivo dado que es el medio en el que se disponen las correspondientes preparaciones farmacéuticas. También debe prestarse atención a la exposición de estos medicamentos a la luz solar, ya que promueve también disminución importante de la funcionalidad biológica.

Los diferentes ELISAs desarrollados han sido aplicados en estudios de estabilidad en el tiempo empleando varias unidades de los MB Remicade[®], Avastin[®], Erbitux[®] y Herceptin[®]. Los estudios de estabilidad

se han realizado mediante controles periódicos de la actividad biológica de los MB tras su conservación refrigerados a 4°C y congelados a -20°C.

A partir de los resultados obtenidos en estos estudios de estabilidad, se puede concluir que de entre los diferentes MB estudiados, Avastin® es el que presenta mayor estabilidad desde el punto de vista de su actividad biológica después de la fecha de uso indicada por el fabricante, siendo los demás MB estables durante no más de 24-48 horas, periodo que coincide con el indicado por el fabricante.

No obstante, para corroborar los resultados de estabilidad obtenidos deben hacerse más estudios de estabilidad empleando por ejemplo más unidades de cada MB, así como estudios paralelos de funcionalidad utilizando otras metodologías basadas en principios de medida y evaluación de la funcionalidad diferentes a las empleadas en los ELISA aquí propuestos (reacción Ag-Ab), como por ejemplo estudios basados en líneas celulares sobre las cuales actúen los mAbs, evaluando el crecimiento o inhibición de poblaciones celulares. Esta línea de investigación está siendo actualmente desarrollada a través de una colaboración con el grupo de investigación del Dr. José Carlos Prados Salazar, del Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Medicina de la UGR.

La citometría de flujo, técnica analítica muy usada para cuantificar Abs enlazados a células o a proteínas de la superficie celular, y empleada para cuantificar las moléculas de un Ag concreto expresado en la superficie celular, puede también ser utilizada para estudios de funcionalidad biológica de los mAbs terapéuticos. Esta técnica fue considerada durante el desarrollo de esta Tesis y se abordaron estudios iniciales, pero presenta el inconveniente de necesitar del uso de líneas celulares en las cuales la expresión de las proteínas celulares frente a las que actúan dichos mAbs esté aumentada.

Por otra parte, en el contexto del proyecto en el que se enmarca esta Tesis (FIS PI010-201), ha sido también estudiada la estabilidad fisicoquímica de todos estos mAbs terapéuticos por diversas técnicas de análisis, evaluando así diferentes características de los mismos. Así, se han realizado los siguientes estudios:

Conclusiones y líneas futuras de actuación

- Estabilidad estructural mediante huella dactilar obtenida por Desorción/Ionización por Láser Asistida en Matriz (MALDI) acoplada a un Analizador de Masas de Tiempo de Vuelo (TOF/MS).
- Estudio de agregación mediante cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaños y detección mediante diodos en fila (WCX-HPLC/DAD).
- Estudios de isoformas mediante cromatografía líquida de alta resolución de intercambio catiónico débil y detección mediante diodos en fila (SEC-HPLC/DAD).
- Estudios de cuantificación mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa y detección mediante diodos en fila (RP-HPLC/DAD).
- Estudios del perfil de N-glicanos mediante cromatografía líquida de ultra altas prestaciones acoplada a un analizador de masas cuadrupolo de tiempo de vuelo (UHPLC-qTOF).

En todos estos estudios, los mAbs han mostrado estabilidad en el tiempo, no habiendo sido identificada ninguna modificación o alteración que justifique la disminución de actividad biológica a las 48 horas de la apertura de los correspondientes viales de medicamento.

Teniendo en cuenta todos estos resultados del proyecto, es decir, estabilidad fisicoquímica no corroborada con estabilidad funcional medida mediante ELISA, una línea de actuación que está siendo propuesta actualmente es la investigación de cambios conformacionales en las estructuras de los mAbs y su relación con la funcionalidad. Para ello se proponen, entre otros, estudios basados en la metodología de intercambio de hidrógeno deuterio y su análisis mediante espectrometría de masas de alta resolución y masa exacta para una evaluación comprensiva de la conformación de los mAbs, que permitiera justificar o no cambios funcionales en los mismos. Estos, además de los estudios de funcionalidad empleando líneas celulares.



ANEXOS



ANEXO I

COSTES ASOCIADOS AL
TRATAMIENTO CON
INFLIXIMAB (REMICADE®)

1. COSTES ASOCIADOS AL TRATAMIENTO CON INFLIXIMAB

El IFX (Remicade[®]), Ab monoclonal IgG1 humano-murino quimérico producido en células de hibridoma murino mediante tecnología de ADN recombinante, actúa inhibiendo la acción de TNF- α mediante unión al mismo con alta afinidad, tanto a la forma soluble como a la de transmembrana de TNF- α , pero no a la linfotoxina α (TNF- β). Debido a su mecanismo de acción, IFX está indicado en el tratamiento de la artritis reumatoide (AR), enfermedad de Crohn en adultos y pediatría (EC), colitis ulcerosa (CU) en adultos y pediatría, espondilitis anquilosante (EA), artritis psoriásica (APs) y psoriasis (Ps), solo o en combinación con otras terapias concomitantes [1].

El elevado coste que supone el tratamiento con agentes biológicos, y en concreto con IFX, hace necesaria la realización continua de análisis coste-efectividad del mismo. La bibliografía consultada demuestra que son muchos los estudios llevados a cabo con IFX, con la finalidad de evaluar el coste que supone el tratamiento con este mAb en las diferentes patologías en las que está indicado. Además, se estudia frecuentemente el coste-efectividad de este MB en comparación con otros medicamentos usados en la terapia de las mismas enfermedades. De tal forma, y dada la gran cantidad de artículos encontrados que hacen referencia al coste que supone un tratamiento basado en el uso de IFX, a continuación se describen algunas de las investigaciones realizadas más recientemente en este sentido y que dan idea del gasto sanitario que conlleva el empleo de este mAb.

El precio de los agentes anti-TNF, incluido el de IFX, es muy elevado.

Coste de IFX: 100 mg/vial; 1 vial por envase → PVP envase: 536,28 €.

Anexo I

En España, dependiendo de la dosis e intervalo de administración, el coste anual por paciente oscila entre 5.000 y 12.000 € [2] [3]. A esto hay que añadir los costes derivados de la monitorización y de la administración.

En la siguiente tabla 1.1 se puede observar el coste en dólares que supone el tratamiento con IFX.

Tabla 1.1. Coste estimado de un tratamiento de 2 años de duración (\$).

Fuente: elaboración propia.

COSTE ESTIMADO DE UN TRATAMIENTO DE 2 AÑOS DE DURACIÓN (en \$)			
IFX 100 mg/ml			
Paciente 50-70 Kg	3 fármacos/dosis		
1 ^{er} año	Inducción	3 dosis	9 fármacos
	Mantenimiento	5 dosis	15 fármacos
	Coste: 10.800.000 \$		
2 ^o año	Mantenimiento	6 dosis	18 fármacos
	Coste: 8.100.000 \$		

Tao Gu *et al.* [4] estimaron que los costes biológicos y los patrones de tratamiento en los EE.UU. para el cuidado de los pacientes con AR, APs, Ps y/o EA por paciente tratado durante 1 año para las cuatro indicaciones son actualmente: Etanercept (ETN) 24.859 \$, Adalimumab (ADA) 26.537 \$ e IFX 26.468 \$. Estos FBIO suponen grandes beneficios para la salud en los EE.UU., siendo ETN el que tiene un menor coste en el primer post-índice del año frente ADA o IFX en las cuatro condiciones [4].

→ *Costes asociados al tratamiento de la artritis reumatoide con Infliximab*

La AR es una enfermedad inflamatoria crónica, de naturaleza autoinmune, caracterizada por la afectación simétrica de múltiples articulaciones y la presentación de diversos síntomas generales inespecíficos y manifestaciones extra-articulares. La enfermedad puede causar en fases

avanzadas importantes limitaciones físicas, así como un marcado deterioro de la calidad de vida. La AR se manifiesta típicamente por dolor, tumefacción y rigidez o dificultad de movimiento en diversas articulaciones pequeñas y grandes. Los síntomas generales, que a veces preceden a las manifestaciones articulares y tienden a persistir durante toda la evolución del trastorno, incluyen básicamente cansancio, sensación de malestar, fiebre ligera, inapetencia y pérdida de peso corporal. Las posibles manifestaciones extra-articulares, que suelen presentarse cuando la enfermedad ya está establecida, afectan principalmente a la piel, los vasos sanguíneos, el corazón, los pulmones, los ojos y la sangre [5].

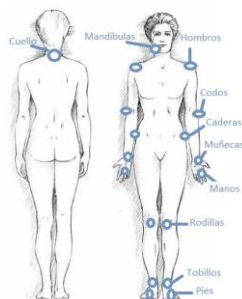


Figura 1.1. Localizaciones de la AR. Fuente: Arthritis Foundation.
<http://espanol.arthritis.org>.

La AR es una enfermedad relativamente frecuente (Según la Sociedad Española de reumatología (SER) 200.000 afectados en España, cada año 20.000 casos nuevos). Según datos estadísticos globales, afecta a entre el 0,3 y el 1 % de la población, lo que significa que actualmente habría en todo el planeta entre 100 y 200 millones de personas que padecen este trastorno. La AR es mucho más frecuente en el sexo femenino (3 veces más) que en el masculino, afectando a alrededor del 5 % de las mujeres mayores de 55 años de edad y suele aparecer en personas adultas mayores (40-60 años), pero puede iniciarse en cualquier etapa de la vida y afectar a cualquier persona, con independencia de la raza, el sexo y la ocupación. Aún así, la AR es más frecuente en quienes tienen cierta predisposición

Anexo I

genética a padecerla, aunque ello no significa que los hijos y familiares de un enfermo tengan necesariamente riesgo elevado de desarrollar la enfermedad. Por ello, la detección del factor reumatoide forma parte de los análisis que se solicitan para realizar el diagnóstico y controlar la evolución de la enfermedad [5]. Tiene una prevalencia en la población española del 0,5 % y un considerable impacto sobre la calidad de vida y la capacidad funcional de los pacientes afectados.

La AR es una enfermedad crónica de alto coste para el sistema de salud, en particular cuando se requiere terapia biológica. El coste anual de la AR en España se ha estimado entre los 590 y los 1.262 millones de euros. De acuerdo con un estudio de la SER, el coste por medicamentos supone el 56 % del coste total de la enfermedad y el coste más elevado por este concepto correspondería a los tratamientos de segunda línea, en particular a los MB, con un coste medio anual por paciente de 5.111 € (entre 1.616 y 15.345 €).

El uso oportuno de fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME) es un aspecto esencial de la gestión de la enfermedad, pero muchos pacientes no responden al tratamiento incluso cuando los agentes convencionales se utilizan de forma óptima. Los agentes biológicos diseñados para interrumpir la vía inflamatoria han demostrado ser un avance importante en el cuidado de los pacientes con AR [6]. Actualmente, los fármacos antirreumáticos modificadores biológicos de la enfermedad (MBE) que neutralizan al TNF- α más empleados, son: ETN, IFX, ADA [7], Abatacept (ABT), Tocilizumab (TCZ), RTX y Golimumab (GLM). La resistencia al tratamiento lleva aparejados costes adicionales por aumento de las dosis, consultas extraordinarias, hospitalizaciones, cambio de tratamiento y adición o intensificación de los tratamientos concomitantes. Por este motivo, teniendo en cuenta la creciente preocupación por la contención del gasto sanitario, es de interés la realización de análisis fármaco-económicos que evalúen la eficiencia de los diferentes MBE en la AR [7].

Una revisión bibliográfica realizada por K. Malottki *et al.* [6] con el fin de evaluar la eficacia clínica y el coste-efectividad de ADA, ETN, IFX, RTX

y ABT cuando se utilizan en pacientes con AR que han probado agentes convencionales incluyendo metotrexato (MTX) y han logrado mejorar después de probar un inhibidor del TNF- α , realizado desde la perspectiva del Sistema Nacional de Salud (NHS) del Reino Unido, indica que los resultados obtenidos en los diferentes modelos ensayados a lo largo de los años varían en algunos aspectos importantes, sobre todo debido a los diferentes enfoques de modelización, en particular, el horizonte temporal, país de origen y perspectiva elegida, de forma que no se puede llevar a cabo una comparación directa de relaciones coste-efectividad incremental (ICER) entre los estudios. Todos los agentes biológicos se compararon con FARME. En comparación con los FARME, los MB suponían 34.300 £ por años de vida ajustados por calidad (AVAC) de ADA, 38.800 £ para ETN, 36.200 £ para IFX, 21.200 £ para RTX y 38.600 £ para el ABT. RTX dominaba los inhibidores del TNF y el ICER para ABT en comparación con RTX era más de 100.000 £ (por AVAC). Estos resultados están sujetos a una gran incertidumbre con respecto a cualquier comparación directa de la relación coste-eficacia entre los diferentes fármacos. Una comparación indirecta ajustada sugirió que no hay diferencias significativas en la eficacia entre RTX y ABT. Los datos existentes no permitieron una cuantificación fiable de la eficacia de los inhibidores de TNF en comparación con RTX y ABT. Existió una falta de evidencia que compara directamente la eficacia de las cinco tecnologías con otros agentes biológicos [6].

Muy recientemente, Holden SE *et al.* [8] calcularon el coste del aumento de dosis en personas con AR tratadas con inhibidores del TNF en toda Europa. El porcentaje de personas que aumentan sus dosis de inhibidor y el porcentaje medio de aumento del coste de estos inhibidores se calculó a partir de estimaciones publicadas anteriormente, ponderadas por el tamaño de la muestra para cada estudio. Se obtuvo el número de personas con AR tratadas con inhibidores del TNF y las correspondientes ventas totales de medicamentos para cinco países europeos. El aumento estimado de los costes de inhibidor del TNF asociado con el aumento de la dosis en personas con AR en Alemania, Francia, Reino Unido, España e Italia fue 51,5-54,4 millones de euros para ADA, 44,8-52,8 millones de euros para IFX y 5,8-5,9 millones de euros para ETN. Por lo tanto, el aumento de

Anexo I

dosis de los inhibidores del TNF ADA, IFX y ETN en pacientes con AR se ha traducido en un aumento de los costes para los cinco países europeos [8].

En España, también han sido llevados a cabo varios estudios para determinar el coste-efectividad que supone el uso de diferentes MB en el tratamiento de la AR. Así, Cárdenas M. *et al.* [9] compararon la relación coste-eficacia de IFX, ETN y ADA en el logro de la remisión clínica (DAS28 < 2,6) cuando se utiliza como terapia biológica inicial tras dos años. El estudio se realizó teniendo en cuenta los pacientes que fueron diagnosticados con AR y que iniciaron el tratamiento con IFX, ETN o ADA en el Hospital Reina Sofía (Córdoba, España) entre el 1 de enero de 2007 y el 31 de diciembre de 2012. El análisis de costes consideró el uso de los recursos sanitarios directos (perspectiva del sistema sanitario). El coste-efectividad se calculó dividiendo el coste medio total de cada tratamiento por el porcentaje de pacientes que alcanzaron la remisión. Se incluyeron 130 pacientes: 55 con IFX, 44 con ADA y 31 con ETN. Después de 2 años, el 45,2 % de los pacientes con ADA alcanzaron la remisión clínica, frente al 29,1 % con IFX y el 22,7 % con ETN, sin diferencias entre ETN e IFX. El coste total promedio a los 2 años fue de 29.858 €, 25.329 € y 23.309 € para ADA, IFX y ETN, respectivamente, mientras que el coste medio (IC 95 %) para lograr la remisión fue de 66.057 €, 87.040 € y 102.683 €, respectivamente. ADA fue más eficiente que ETN e IFX, sin diferencias entre estos dos últimos. ADA fue el tratamiento más rentable para lograr la remisión clínica en condiciones clínicas de la vida real en pacientes con AR durante el período de estudio [9].

Otro estudio realizado en el Hospital de Sagunto (Valencia, España) indica que hasta el año 2010 el coste de los tratamientos biológicos en la AR se incrementó anualmente en un 15 %. Se evaluó el impacto económico asociado con un protocolo de terapia biológica de priorización de los pacientes con AR en dicho hospital. Para ello llevaron a cabo un estudio observacional comparando el coste asociado de los pacientes con AR tratados con FBIO en el protocolo previo (2009-2010) en comparación con los períodos de post-protocolo (2011-2012). Fueron

incluidos los pacientes con AR tratados con ABT, ADA, ETN o IFX durante al menos 6 meses durante el periodo de estudio (2009-2012). En 2012, TCZ también se incluyó en el protocolo de establecimiento de prioridades. El ahorro de costes y el impacto económico se calcularon utilizando los precios oficiales españoles. Como resultado obtuvieron que en el período pre-protocolo (2009-2010), los gastos totales fueron aumentando desde 110.000 € hasta 1.761.000 € en 2010 (11.362 € paciente/año). Después de la implementación del protocolo, los gastos totales disminuyeron en 53.676 € en el periodo 2010-2011, y 149.200 € en el periodo 2011-2012. En el periodo 2010-2011 el coste de la terapia biológica por paciente/año disminuyó 355 € (11.007 € paciente/año) y 653 € adicionales (hasta 10.354 € paciente/año) para el año 2012, con un efecto acumulativo de la implementación del protocolo de 1.008 € por paciente y año. En el período pre-protocolo (2009), el coste/paciente anual fue de 10.812 € con ETN, 10.942 € con IFX, 12.961 € con ADA y 12.739 € con ABA. Para el 1 de enero de 2013, el coste anual por paciente fue de 9.469 € con ETN, 10.579 € con IFX, 11.117 € con ADA, 13.540 € con ABA y 14.932 € con TCZ. Por tanto, la optimización de los recursos les permite ahorrar 200.000 € después de la implementación del protocolo de la eficiencia de 2 años, siendo el tratamiento más económico el de ETN seguido por IFX [10].

C. Rubio-Terrés *et al.* [7] también establecieron la utilización de recursos sanitarios en la AR y los costes asociados en los pacientes tratados con tres MBE: ETN, IFX y ADA. El estudio se hizo desde la perspectiva del hospital, por tanto sólo se recogió la utilización de recursos sanitarios y los costes de la enfermedad se expresaron como costes directos sanitarios. El horizonte temporal fue de seis meses para pacientes con AR con al menos un año de tratamiento. *Perspectiva:* hospitales del Sistema Nacional de Salud. *Utilización de recursos:* revisión, por los servicios de farmacia hospitalaria, de las historias clínicas de todos los pacientes incluidos. *Costes sanitarios:* los unitarios obtenidos de bases de datos españolas; los de la enfermedad por paciente con cada MBE, estimados de los resultados de utilización de recursos (euros de julio de 2006). *Análisis de sensibilidad:* simples unifactoriales del caso básico. *Análisis del impacto presupuestario:* de la sustitución de IFX o ADA por ETN sobre

Anexo I

el presupuesto de tres poblaciones hospitalarias. *Resultados:* 1.111 historias clínicas revisadas, de 41 hospitales, 432 pacientes tratados con ETN, 396 con IFX y 283 con ADA. *Dosis promedio:* de ETN 48,90 mg semanales; de IFX 4,14 mg/kg cada 8 semanas; de ADA de 41,58 mg cada dos semanas (97,8, 138 y 104 % de las dosis recomendadas, respectivamente). El tratamiento con ETN generó menos costes. Frente a IFX, con ETN se redujeron los costes semestrales por paciente del tratamiento con el MBE (232,23 €), por fracasos terapéuticos (163,42 €), por consultas (54,88 €), por pruebas (22,52 €) y por la administración del MBE (474,42 €). El ahorro por paciente con ETN durante seis meses fue de 577,94 € en comparación con IFX, y de 906,68 € en comparación con ADA. En comparación con ADA, los ahorros con ETN se produjeron principalmente en los costes del MBE (1.111,74 €) y en las pruebas (10,16 €) con un ahorro total semestral por paciente tratado con ETN de 906,68 €. Los costes semestrales totales de un paciente tratado con ETN, IFX o ADA fueron de 6.662,84, 7.240,77 y 7.569,52 €, respectivamente. Los análisis de sensibilidad confirmaron la estabilidad del caso básico en la mayoría de los supuestos considerados, con ahorros semestrales por paciente que oscilaron entre 395,79 y 644,32 € en comparación con IFX y entre 672,09 y 1.159,46 € en comparación con ADA. El tratamiento con IFX fue más barato que con ETN y ADA cuando se consideró el mínimo número posible de dosis del primero (3 dosis al semestre). La reducción en los costes de los pacientes tratados con ETN, podría generar ahorros en el presupuesto hospitalario que oscilarían aproximadamente y según la población considerada (50 a 200 pacientes), entre 14.500 y 231.100 € si ETN sustituyera IFX y entre 22.600 y 362.600 €, si ETN sustituyera ADA. De acuerdo con los resultados obtenidos, en la mayoría de los escenarios el tratamiento de la AR con ETN reduce los costes sanitarios hospitalarios, en comparación con IFX y ADA. Asumiendo que el número teórico de casos considerado en el análisis del impacto presupuestario (50, 100 ó 200) corresponde al tamaño del hospital (pequeño, mediano, grande) la sustitución de IFX por ETN en hospitales de tamaño pequeño, mediano o grande podría generar ahorros para cada hospital de 14.000-58.000 €, 29.000-115.000 € y 58.000-231.000 €, respectivamente [7].

La literatura muestra que la realización de este tipo de estudios también es frecuente en el resto de países. De tal manera, recientemente (2016) se caracterizaron los patrones de tratamiento de la AR con ADA, ETN, IFX, TCZ, ABT, Certolizumab Pegol, o GLM y se evaluó el coste utilizando datos del Centro Japonés de Datos Médicos. En el estudio fueron incluidos los pacientes de edades comprendidas entre 16-75 años diagnosticados de AR y a los que les fueron prescritos entre enero de 2005 y agosto de 2014. Los costes transversales anuales de ETN, IFX, ADA, y TCZ fueron aproximadamente 8000 \$ (2009 y 2013), 13.000 \$ (2009) y 15.000 \$ (2013), 10.000 \$ (2009) y 11.000 \$ (2013), y 9.000 \$ (2009) y 8.000 \$ (2013), respectivamente. Los costes anuales por paciente para la prescripción inicial de ETN, IFX, ADA, y TCZ como tratamiento biológico de primera línea fueron aproximadamente 11.000 \$, 19.000 \$, 16.000 \$ y 12.000 \$. Los costes médicos directos para más de 1 año de tratamiento a partir de la prescripción inicial eran aproximadamente de 17.000 \$, 26.000 \$, 22.000 \$ y 22.000 \$. Los costes fueron mayores en el grupo de IFX al inicio del tercer año de tratamiento. Los costes, la interrupción considerada y los índices de cambio fueron más con ETN en comparación con IFX, ADA, o TCZ utilizado como MB de primera línea. Por tanto, y a pesar de las limitaciones, estos resultados implican beneficios clínicos de coste-reducción de la terapia con ETN como opción de tratamiento biológico de primera línea para la AR en Japón [11].

V. Fragoulakis *et al.* [12] estimaron en el año 2015 el coste medio total del tratamiento anual de las diferentes opciones de tratamiento para pacientes con AR moderada a severa en Grecia. El coste total estaba compuesto por el coste de los medicamentos, la administración y las visitas de atención en hospitales de día. Los datos de costes unitarios se obtuvieron del boletín de precios y los boletines oficiales emitidos por el Ministerio de Salud. Debido al corto horizonte temporal del estudio (1 año), no fue aplicada ninguna tasa de descuento. Como resultado, el coste total anual medio por cada nuevo paciente (o ya existente) que responde al tratamiento con ETN se estimó en 9.845 € y el costo total de ETN/metotrexato (MTX) se estimó en 9.857 €. El tratamiento con ETN tuvo un menor coste anual en relación con ADA e IFX. Sobre una base anual, se estimó que la diferencia entre la monoterapia con ETN y ADA

Anexo I

fue de 544 €. Del mismo modo, la diferencia entre ETN/MTX e IFX/MTX fue 1.871 € y 543 €, respectivamente, en relación con ADA/MTX. De tal forma, concluyeron que en el ámbito de la práctica de la vida real en Grecia, ETN, solo o en combinación con MTX, representaba la opción con un menor coste anual por paciente en comparación con ADA o IFX en pacientes con AR [12].

→ *Costes asociados al tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) con Infliximab*

El término EII incluye una amplia variedad de presentaciones y manifestaciones clínicas cuya característica principal es la inflamación crónica del tubo digestivo en diferentes localizaciones (desde la boca hasta el ano) [13]. El concepto de enfermedad inflamatoria intestinal (EII) agrupa a los procesos idiopáticos del intestino: colitis indeterminada (CI), colitis ulcerosa (CU) y enfermedad de Crohn (EC) [14] que se definen según criterios clínicos, radiológicos, endoscópicos e histológicos [15]. La EII provoca un gran impacto en la calidad de vida de los pacientes [14] y su incidencia, tanto en la CU como en la EC, ha sufrido un notable incremento durante los últimos 30 años en todos los países desarrollados, estableciéndose una meseta desde los años setenta y estabilizándose entre 10 y 15 casos/100.000/año. La EII se distribuye en forma paralela al nivel socio-económico de los distintos países. La incidencia de este grupo de enfermedades en España, es baja en relación a la presentada en estudios europeos, sobre todo aquellos que corresponden al norte de Europa. Sin embargo, en trabajos más recientes, estas tasas han aumentado, asemejándose a las publicadas en los países nórdicos [16]. Se calcula que en Europa existe casi un millón y medio de personas con EII. España se considera con un riesgo medio para padecer estas enfermedades [17], siendo diagnosticados cada año 2.000 nuevos casos en adultos (más de 15 de cada 100.000 españoles padecen EC y más de 10 de cada 100.000 padecen CU) y habiéndose triplicado en menores de 18 años en las dos últimas décadas, llegando a diagnosticarse al año entre 200 y 300 casos en menores de 18 años [18].

IFX es usado en el tratamiento de la EII, siendo eficaz en la misma pero muy costoso. Por lo tanto la monitorización de IFX para determinar los niveles y la formación de Abs anti-IFX (ATI) puede conducir a un uso más rentable de la terapia con el mismo. De tal manera, M. Taks *et al.* [19] llevaron a cabo un estudio para investigar el efecto de la aplicación de un algoritmo de tratamiento de IFX en una única cohorte de pacientes con EII, centrándose en las tasas de remisión y costes de los medicamentos. Como resultados obtuvieron que entre enero y diciembre de 2015, fueron tratados con IFX en su centro un total de 62 pacientes con EII, de los cuales 33 (53 %) participaron en este estudio. El número de pacientes en remisión fue de 28 (85 %) al inicio del estudio y había 13 adaptaciones de dosis sugeridas por el algoritmo de tratamiento para la segunda infusión sucesiva de IFX. Cuatro pacientes poseían niveles indetectables de IFX y el estado de ATI positivos al inicio. Después de la segunda infusión, hubo 29 (88 %) pacientes en remisión en la tercera infusión. Todo esto dio lugar a una reducción anual del coste del medicamento (7,4 %). Por lo tanto, concluyeron que su algoritmo de tratamiento de IFX condujo a la optimización de la terapia con IFX en pacientes con EII mediante el aumento de las tasas de remisión y la reducción de los costes de medicamentos [19].

M.E. Van der Valk *et al.* [20] demostraron que los costes sanitarios son impulsados principalmente por los costes de los MB anti-TNF y que la hospitalización y cirugía representan solamente una pequeña parte de los costes sanitarios [20]. L. Martelli *et al.* [21] realizaron una revisión bibliográfica sobre todos los estudios que comparan el coste-efectividad de una estrategia basada en monitorización terapéutica y una gestión de las dosis empírica de anti-TNF en la EII o AR a través de la base de datos electrónica MEDLINE (hasta julio de 2016), de los resúmenes anuales de reuniones internacionales y manualmente, concluyendo también que la evidencia disponible indica que la estrategia de monitorización terapéutica conduce a importantes ahorros en los costes relacionados con la terapia anti-TNF, tanto en pacientes con EII como con AR, sin ningún impacto negativo en la eficacia [21].

Anexo I

Dado que el tratamiento de la EII con IFX conlleva una alta carga económica para la sociedad, M. Severs *et al.* [22] estimaron el impacto actual y futuro de la introducción de los biosimilares de IFX en los costes de salud relacionados con la EII en la situación holandesa. Como resultado obtuvieron que el promedio de ahorro de costes sobre el total de 5 años fue 9.850 € por paciente de EC y 2.250 € por paciente con CU, produciendo 493 millones de euros el ahorro de costes totales [una reducción del 28 %] de los Países Bajos. Los resultados fueron determinados, principalmente, por la reducción del precio de la terapia anti-TNF, la reducción del precio de umbral en el que los médicos cambian a los pacientes hacia los biosimilares y el grado en que se llevará a cabo la conmutación. Conclusiones: la introducción de los biosimilares para IFX se espera que tenga un impacto importante en el perfil de costes de la EII. El impacto económico dependerá de precios locales, políticas de adquisición y disposición del médico para cambiar a los pacientes a los biosimilares [22].

→ *Costes asociados al tratamiento de la enfermedad de Crohn con Infliximab*

La EC es una patología crónica de carácter inflamatorio y transmural que puede afectar a cualquier parte del tracto gastrointestinal y asociarse con manifestaciones sistémicas y extraintestinales. Su etiología exacta aún se desconoce, aunque determinados factores genéticos y de carácter ambiental, como el consumo de tabaco, incrementan el riesgo de padecerla.

En el mundo occidental, la incidencia y consecuentemente la prevalencia de esta enfermedad se han visto considerablemente incrementadas en las últimas décadas; situándose en torno a 6-15 nuevos casos/100.000 habitantes/año y 50-200 casos/100.000 habitantes, respectivamente [23]. El debut de la enfermedad puede aparecer a cualquier edad, aunque ocurre más frecuentemente entre los 20 y 30 años.

Se trata de una enfermedad altamente discapacitante. Se estima que sólo el 75 % de los pacientes son plenamente capaces de trabajar un año después del diagnóstico; y que tras 5-10 años de evolución, el 15 % de los pacientes son incapaces de trabajar.

Entre los síntomas típicos de la EC se incluyen el dolor abdominal, la diarrea y la pérdida de peso; siendo también frecuente la aparición de malestar general, anorexia o fiebre. El curso natural de la enfermedad se caracteriza por periodos de exacerbación que alternan con periodos de remisión o ausencia de los síntomas. La clasificación fenotípica de la EC se realiza en función de la edad al diagnóstico (A1: 16 años; A2: 17-40 años; A3: > 40 años), la localización (L1: ileal; L2: colónica; L3: ileocolónica; L4: gastrointestinal alta), y el patrón evolutivo de la misma (B1: no obstructivo-no fistulizante; B2: obstructivo; B3: fistulizante; p: afectación perianal). Adicionalmente, se han propuesto varios índices para cuantificar el grado de actividad de la enfermedad. El más comúnmente utilizado en el ámbito de los ensayos clínicos es el *Crohn's Disease Activity Index (CDAI)*, que se calcula en función de 8 variables, entre las que se incluyen síntomas clínicos y parámetros analíticos [23].

La EC es una condición crónica para la que no existe actualmente una cura médica, ni quirúrgica. El objetivo terapéutico se dirige fundamentalmente a inducir y mantener el control de los síntomas, mejorar la calidad de vida de los pacientes y minimizar las complicaciones que puedan surgir a corto y largo plazo. El tratamiento incluye farmacoterapia, terapia nutricional y cirugía. Entre las alternativas terapéuticas disponibles se encuentran aminosalicilatos, corticosteroides, inmunosupresores y fármacos anti-TNF- α . En la actualidad se emplean dos fármacos anti-TNF- α autorizados por la AEMPS para su uso en la EC: IFX y ADA [23]. El coste que supone el tratamiento con estos fármacos queda indicado en la tabla 1.2.

Tabla 1.2. Coste del tratamiento de la EC con IFX y ADA

MEDICAMENTOS BIOLÓGICOS		IFX	ADA
Coste unitario (PVL + IVA) (€)		557,73	534,71
Coste por dosis para un paciente de 70 kg (PVL+IVA) (€)		1.952,06	534,71
Coste tratamiento anual por paciente (70 kg) (PVL + IVA) (€)	Inducción	3.904,12	1.604,13
	Mantenimiento	11.712,36	13.367,75

Un determinante relevante de su coste lo constituyen las hospitalizaciones, lo cual aumenta considerablemente la cantidad total por paciente. La terapia de mantenimiento con IFX puede mejorar la calidad de vida del individuo en esta patología, ya sea de tipo luminal o fistulizante. Por este motivo, muchos autores evalúan el ICER del tratamiento de mantenimiento con IFX, en comparación con el cuidado usual o con otros FBIO en el tratamiento de pacientes con EC luminal o fistulizante [23]. De tal forma, se realizó una revisión sistemática de los estudios publicados sobre el coste y la relación coste-eficacia de ADA e IFX en el tratamiento de la EC. Cuatro estudios financiados de forma independiente, identificados para IFX, sugirieron altos ratios de coste-efectividad (todos por encima de 50.000 £ / ajustado por AVAC para la enfermedad no fistulizante y todos por encima de 100.000 £ / AVAC para la enfermedad fistulizante). Se estimó el coste incremental por AVAC de ambos fármacos en comparación con la atención estándar durante 1 año (2008). Las conclusiones fueron que para la inducción, tanto ADA como IFX eran rentables en el tratamiento de la EC grave y que ADA fue rentable para la EC moderada. La terapia de inducción con IFX no era rentable para la EC moderada (ICER de 94.321 £). Ningún fármaco era rentable como terapia de mantenimiento para la enfermedad moderada o grave por estos criterios (ICER alrededor de 5 millones de libras para la enfermedad severa de ambos fármacos, y alrededor de 14 millones de libras para la enfermedad moderada para ambos fármacos). Además el análisis reflejó el hecho de que un número sustancial de pacientes podría alcanzar la remisión bajo el cuidado estándar y que la incidencia de recaídas entre los que están en remisión fue tal que la terapia de mantenimiento tendría que demostrar una mayor eficacia que la actual y/o ser mucho menos costosa de lo que actualmente es [24].

Otro estudio demostró que para pacientes con EC que no respondían al tratamiento con IFX, las intervenciones definidas por un algoritmo basado en las mediciones de IFX y ATI eran más rentables que la intensificación del régimen de IFX. Los resultados clínicos se evaluaron en la semana 20. Los costes acumulados, expresados como costes medios por paciente, se basaron en el Registro Nacional de Pacientes Danés. Como resultado obtuvieron que en la semana 20 de seguimiento, las tasas de respuesta y remisión fueron similares en todas las subpoblaciones de estudio entre los pacientes tratados por el algoritmo o por la intensificación de IFX. Sin embargo, la suma de los costes de salud relacionados con la EC fueron sustancialmente menores (31 %) en los pacientes asignados al azar basados en el algoritmo para la intensificación de IFX en la población por intención de tratar: 11.940 \$ frente a 17.236 \$. Para los pacientes por protocolo, los costes en la semana 20 eran aún más bajos (49 %) en el grupo de algoritmo: 8,742 \$ frente a 17.236 \$. Las cifras fueron similares para los pacientes que completaron el ensayo de 12 semanas según el protocolo (reducción del 50 % en los costes). Entre los pacientes que continuaron la intervención del estudio asignado durante todo el período de seguimiento de 20 semanas, los costes se redujeron en un 60 % en los pacientes tratados con el algoritmo: 7.056 \$ contra 17.776 \$. Los porcentajes de reducción de costes se mantuvieron estables a lo largo de un año. Como conclusión establecieron que la existencia de beneficio económico de las intervenciones basadas en algoritmos en el fracaso ante IFX se mantiene durante 1 año [25].

J. Lindsay *et al.*, por su parte, estimaron el coste global y el número de AVAC para Inglaterra y Gales, durante un horizonte temporal de 5 años, en un grupo de pacientes con EC a los que se administraba IFX utilizando el período 2005-06 como tiempo de referencia. Para la estimación del coste del tratamiento farmacológico se tomó como caso base a un paciente tipo de 60 kg de peso. Los resultados mostraron un ICER de aproximadamente 26.000 £ por AVAC adicional en la EC luminal y algo mayor en la EC fistulizante. Los análisis de sensibilidad univariante mantuvieron los resultados del caso base en el rango de 23.752 a 38.848 £ por AVAC adicional en la EC luminal y de 27.047 a 44.206 £ en la fistulizante. La variable más sensible resultó ser la dosis de IFX, estimada

Anexo I

en función del peso del paciente. El empleo de un paciente tipo de 80 kg de peso incrementó hasta aproximadamente 39.000 y 44.000 £ por AVAC adicional en las dos variedades patológicas respectivamente. En este caso, el umbral habitualmente empleado por el *National Institute of Clinical Excellence* (NICE), de 20-30.000 £ por AVAC adicional, sería sobrepasado. Si el análisis se efectúa para el paciente medio descrito en Gran Bretaña, con 67,8 kg de peso, el ICER estimado sería de aproximadamente 31.000 y 37.000 £ por AVAC adicional en la variedad luminal y fistulizante, respectivamente. Adicionalmente, se realizó un análisis probabilístico para evaluar la incertidumbre alrededor de los parámetros más importantes (probabilidades de transición, costes de servicios sanitarios y utilidades de los estados de salud). Los resultados de dicho análisis mostraron un incremento significativo de los costes globales del tratamiento con IFX respecto del cuidado usual. Los autores concluyeron que IFX es efectivo y bien tolerado en el manejo de la EC moderada a grave, sea de tipo luminal o fistulizante. Asimismo, el tratamiento se halla situado por debajo del umbral máximo de eficiencia considerado en Gran Bretaña [23].

El grupo de investigación de Vega-Coca *et al.* [26] realizó una serie de evaluaciones económicas con objeto de comparar la eficacia, seguridad y eficiencia de los anti-TNF- α (IFX y ADA) en el tratamiento de la EC no fistulizante, EC o CU con respuesta inadecuada al tratamiento convencional y determinar el valor económico de estos fármacos frente a la terapia convencional y las intervenciones quirúrgicas. Una revisión bibliográfica realizada por este grupo de investigación demostró que la eficiencia del tratamiento con IFX y ADA en pacientes adultos con EC no fistulizante moderada-grave, da lugar a resultados muy heterogéneos entre sí. Así, una de las evaluaciones señaló que ninguno de los tratamientos (IFX y ADA) podía considerarse coste-efectivo como terapia de mantenimiento para la EC moderada o grave; pero que, sin embargo, sí fueron eficientes como terapia de inducción en la EC grave. Otro informe añadió que dado que IFX y ADA no podían diferenciarse en términos de eficacia clínica, solo podrían ser diferenciados por su coste, recomendando el inicio del tratamiento anti-TNF- α con el tratamiento menos costoso en cada caso (teniendo en cuenta costes de administración,

dosis requerida y coste por dosis). Otro de los informes concluyó que en un periodo de seguimiento de 5 años de duración, aunque IFX y ADA obtuvieron beneficios clínicos, el alto coste asociado a estos tratamientos hizo que la ICER de estos fármacos con respecto al tratamiento convencional fuese muy elevada, y por tanto no pudieran ser considerados tratamientos eficientes. Al comparar ADA con IFX, ADA obtuvo unos AVAC similares a IFX, pero a menor coste, con lo que podía ser considerada una estrategia más coste-efectiva. Este resultado fue contradictorio al de un análisis de coste utilidad que estableció que los tratamientos biológicos (IFX y ADA) obtenían unas ICER aceptables cuando se consideraba un modelo cuya duración de tiempo era toda la vida del paciente, con períodos de hasta 4 años de terapia continuada. Un análisis de coste-utilidad de cuatro tratamientos biológicos (IFX, ADA, Certolizumab Pegol y Natalizumab) en el ámbito de EE.UU, desde la perspectiva del pagador, concluyó que IFX fue el único tratamiento biológico que resultó eficiente. Otro análisis de coste-utilidad de ADA e IFX como terapias de mantenimiento en pacientes con EC en EE.UU, donde se utilizó un horizonte temporal de 56 semanas, concluyó que ADA era una estrategia dominante en comparación con IFX, en cuanto que fue más efectiva y menos costosa. Por último, en un análisis de coste-efectividad cuyo objetivo era comparar de forma indirecta la eficacia y eficiencia de los FBIO autorizados por la FDA para el tratamiento de la EC moderada-grave, la Ps y la AR, ADA fue asociado con una reducción de 8.878 \$ por respondedor inicial y 52.983 \$ en coste por remitente adicional, en comparación con IFX.

Sin embargo, estos investigadores indican que no localizaron evidencia empírica que arrojase conclusiones fehacientes acerca de si los tratamientos biológicos, ADA e IFX, eran claramente eficientes en términos de coste-utilidad en comparación al tratamiento convencional, ni el dominio de uno de estos tratamientos frente al otro. Los autores también llevaron a cabo un análisis de coste-utilidad para pacientes con EC no fistulizante moderada o grave, cuyo objetivo era estimar el coste incremental por AVAC entre la terapia convencional, terapia de inducción y terapia de mantenimiento para la EC moderada y grave. Sólo se consideraron los costes directos, obtenidos como la suma del coste del

Anexo I

tratamiento anti-TNF- α y el coste relativo a cada estado de salud. No se incluyeron los costes de hospitalización, a excepción del coste de administración de IFX. Los resultados del modelo base para pacientes con enfermedad grave mostraron que las terapias de inducción de IFX y ADA dominaron a la terapia estándar, mientras que la ICER de IFX como terapia de mantenimiento *vs.* tratamiento estándar fue de 68.315 £/AVAC; y la de ADA *vs.* tratamiento estándar fue de 7.749 £/AVAC. Para el caso de la enfermedad moderada, el tratamiento de inducción de IFX *vs.* tratamiento convencional obtuvo una ICER de 94.321 £/AVAC, la de IFX de mantenimiento fue de 317.991 £/AVAC, la terapia de ADA como terapia de inducción dominó al tratamiento convencional, y la ICER de ADA de mantenimiento *vs.* tratamiento convencional fue de 160.079 £/AVAC. Las conclusiones del informe señalaron que ninguno de los tratamientos (IFX y ADA) podía considerarse eficiente como terapia de mantenimiento para la EC moderada o grave (aunque ADA obtuvo una ICER por debajo de los umbrales comúnmente aceptados, los resultados mantenían una alta incertidumbre). Sin embargo, sí fueron eficientes como terapia de inducción en la EC grave [26].

→ Costes asociados al tratamiento de la colitis ulcerosa con Infliximab

La CU es una enfermedad inflamatoria crónica intestinal, de etiología multifactorial, que afecta principalmente al colon. Se clasifica según su extensión en proctitis ulcerosa, colitis izquierda o colitis extensa; y según su severidad en colitis en remisión, leve, moderada o grave [27].

La incidencia en Europa se estima de 1,5-20,3 casos por 100.000 personas/año. Puede aparecer a cualquier edad, pero el pico de incidencia se encuentra entre los 15 y 25 años y entre los 55 y 65 años, siendo este último menor.

La CU cursa con brotes de actividad y otros periodos en los que el paciente está totalmente asintomático (en remisión). Los síntomas de la enfermedad activa o de la recaída incluyen diarrea con sangre, necesidad

urgente de defecar y dolor abdominal [27]. Esto implica que van a existir dos tipos de tratamientos, uno durante los brotes cuyo objetivo es controlar los síntomas y evitar la aparición de complicaciones, y otro de mantenimiento para mantener la enfermedad inactiva y evitar que sucedan nuevos brotes. La elección de tratamiento en la CU es individualizada para cada paciente ya que viene condicionado por la extensión de la enfermedad en el colon, por la gravedad y por la presencia de manifestaciones extraintestinales. En el tratamiento de la CU se utilizan cinco grupos de fármacos: 5-aminosalicilatos, glucocorticoides, antibióticos, inmunosupresores y terapias biológicas. Aunque muchos son los agentes biológicos que se están desarrollando, los primeros que se desarrollaron y de los que se dispone de más datos son los anti-TNF- α , ya que los niveles de este factor están aumentados en el intestino de los pacientes con CU. Aunque estos fármacos han supuesto un gran avance en el control de la enfermedad, no la curan y no son eficaces en todos los pacientes. Se emplean en las situaciones en las que han fracasado los tratamientos convencionales, pero en determinadas circunstancias podrían utilizarse como primera opción de tratamiento. En España el primer biológico que se pudo utilizar fue IFX. El segundo fármaco comercializado fue ADA y actualmente también es usado GLM [28]. Los costes que suponen estos agentes biológicos se presentan en la tabla 1.3.

Tabla 1.3. Coste de IFX, ADA y GLM en el tratamiento de la CU

MEDICAMENTOS BIOLÓGICOS		IFX	ADA	GLM
Coste unitario (PVL + IVA) (€)		615,88	563,79	1.219,83
Coste por dosis para un paciente de 70 kg (PVL+IVA) (€)		2,155,58	563,79	2.439,66
Coste tratamiento anual por paciente (70 kg) (PVL + IVA) (€)	Inducción	6.466,74	4.510,32	7.318,98
	Mantenimiento	12.933,48	13.530,96	29.257,92

Una revisión realizada por M. Galván-Banqueri *et al.* para comparar las diferencias coste-efectivas de los tres MB, indicó que solamente había sido localizado un artículo que incluía el análisis coste-efectividad de los MB IFX y ADA en el tratamiento de la CU moderada-grave. No se

Anexo I

localizó ningún trabajo de evaluación económica que incluyese GLM para el tratamiento de dicha patología [27].

Por su parte, Lofland *et al.* [29] realizaron un análisis coste-efectividad de IFX comparado con ADA en pacientes adultos con CU de moderada a grave desde la perspectiva del pagador privado en EE.UU. Los costes incluidos en el modelo fueron los de la medicación y el coste de administración para el caso de IFX. Los autores concluyeron que con IFX el número necesario a tratar (NNT) para la remisión clínica era menor, así como el coste por NNT a las semanas 8 y 52/54 comparado con ADA, independientemente del subgrupo de pacientes considerados. El coste por remisión clínica prolongada para pacientes *naive* (pacientes que no han recibido tratamiento con IFX previamente) con IFX y ADA fue de 203.205 \$ *vs.* 682.873 \$, mientras que el coste por remisión clínica prolongada para todos los pacientes fue de 203.205 \$ con IFX *vs.* 698.393 \$ para ADA. También llevaron a cabo un análisis de sensibilidad cambiando el precio de administración de IFX. Los resultados mostraron en todos los casos, que IFX seguía manteniendo un coste más bajo que ADA. Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis de coste por NNT el cual reveló que IFX obtenía un NNT y un coste por NNT más bajo que ADA.

En vista a las recomendaciones de eficacia y seguridad, que establecen que IFX, ADA y GLM se consideran alternativas válidas para el tratamiento de inducción y de mantenimiento de la CU moderada-grave en pacientes adultos, que los tres MB se toleran bien y presentan un perfil de seguridad similar, y por tanto, podría utilizarse cualquiera de ellos, se realizó un análisis de minimización de costes en el que se incluyeron los costes farmacológicos de los tres tratamientos, basados en los precios de los fármacos obtenidos a través de Bot Plus [27]. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1.4, donde se puede observar que, teniendo en cuenta los precios máximos autorizados y los costes farmacológicos únicamente, ADA es el tratamiento más económico, con un coste de 15.786,12 € anuales. Para pacientes con un peso inferior a 70 kg y aprovechando los viales, IFX sería una opción también competitiva. Por último, GLM, sólo con una rebaja en su precio de al menos el 20 %, sería

un tratamiento eficiente si se utilizase para tratar a pacientes con un peso inferior a 80 kg. Para los pacientes con un peso superior a 80 kg, GLM, aun suponiendo la bajada de precio del 20 %, seguiría siendo menos económico que el resto de alternativas. Los autores recomiendan utilizar el tratamiento con el fármaco más económico en cada caso (salvo circunstancias individuales del paciente que lo impidan), valorando los siguientes aspectos para determinar el coste del tratamiento: coste por dosis (en función del peso del paciente y del precio de adquisición de los medicamentos), posología administrada y costes derivados de la administración [27].

Tabla 1.4. Coste de los FBIO ADA, IFX y GLM.

Fuente: adaptada de [27]

MB	Dosis	PVP + IVA (€)	Coste tratamiento/año (€)
ADA	100 mg (semana 0) + 80 mg (semana 2) + 40 mg 2 semanas (desde semana 4)	563,79 (jeringa 40 mg)	15.786,12
IFX	5 mg/Kg (70 Kg: 400 mg sin aprovechar los viales) Semana 0,2,y 6, después c/8 semanas	615,88 (vial 100 mg)	19.708,16
	5 mg/Kg (70 Kg: 350 mg aprovechando los viales) Semana 0,2,y 6, después c/8 semanas	615,88 (vial 100 mg)	17.244,64
	5 mg/Kg (100 Kg: 500 mg) Semana 0,2,y 6, después c/8 semanas	615,88 (vial 100 mg)	24.635,2
GLM < 80 Kg	200 mg (semana 0) + 100 mg (semana 2) + 50 mg c/4 semanas (desde semana 6)	1.219,83 (vial 50 mg)	19.517,28
GLM > 80 Kg	200 mg (semana 0) + 100 mg (semana 2) + 100 mg c/4 semanas (desde semana 6)	1.219,83 (vial 50 mg)	31.715,58
GLM < 80 Kg. Supuesto 20 % rebaja de precio	200 mg (semana 0) + 100 mg (semana 2) + 50 mg c/4 semanas (desde semana 6)	975,86 (vial 50 mg)	15.613,82
GLM > 80 Kg. Supuesto 20 % rebaja de precio	200 mg (semana 0) + 100 mg (semana 2) + 100 mg c/4 semanas (desde semana 6)	975,86 (vial 50 mg)	25.372,46

L. Yokomizo *et al.* [30] también evaluaron la relación coste-eficacia de ADA, IFX y Vedolizumab (VLZ) como agentes de primera línea para inducir la remisión clínica y la curación de la mucosa (MH) en la CU de moderada a severa. Se realizó desde la perspectiva de un pagador en los EE.UU. Suponiendo una cohorte biológica de pacientes no tratados

Anexo I

previamente, IFX 5 mg/kg cada 8 semanas fue más rentable (99.171 \$ por MH) que ADA 40 mg cada dos semanas (316.378 \$ por MH) y que VLZ cada 8 semanas (301.969 \$ por MH) durante 1 año. Los costes de administración de IFX fueron superiores a 1.974 \$ por infusión, lo cual hacía ADA más rentable. El tratamiento de primera línea con VLZ sería rentable si el precio de adquisición del fármaco fuera $< 2,537$ \$ para cada administración de 300 mg durante el horizonte temporal de 1 año. De tal forma, si los costes de la administración de IFX no son excesivos (< 2000 \$), este es el MB de primera línea más rentable para la CU de moderada a severa. Si se supera este coste relacionado con la infusión ADA sería la terapia más rentable. Teniendo en cuenta los costes de los medicamentos en los EE.UU., VLZ parece utilizarse apropiadamente como un biológico de segunda línea tras el fracaso del factor de necrosis antitumoral [30].

Otro estudio realizado por JG. Williams *et al.* [31] compara la eficacia clínica y coste-eficacia de IFX y ciclosporina en el tratamiento resistente a los esteroides en CU grave aguda. Entre mayo de 2010 y febrero de 2013, reclutaron 270 participantes de 52 hospitales de Inglaterra, Escocia y Gales. La recopilación de datos terminó en marzo de 2014. El coste más bajo de la ciclosporina llevó a menores costes totales del NHS, sin embargo, los participantes fueron más positivos sobre el uso de IFX que de ciclosporina. No hubo diferencia significativa entre los dos fármacos en la eficacia clínica, las tasas de colectomía, la incidencia de reacciones adversas graves o la mortalidad, cuando se midió de 1 a 3 años después del tratamiento. Para IFX, los costes medios de la administración fueron 17.66 £ por infusión. Para ciclosporina eran 35.41 £ por día durante el cual era recibida la infusión [31].

Durante el año 2015, K. Toor *et al.* [32] también determinaron los costes a corto plazo por remisión y respuesta sostenidas de IFX, ADA y GLM y en comparación con la terapia convencional para el tratamiento de la CU moderada a severamente activa. El modelo incluyó tres estados de la enfermedad: remisión, respuesta y recaída. Los costes se estimaron desde una perspectiva de pagador público canadiense. Se obtuvieron estimaciones para el coste adicional por cada año de remisión sostenida y respuesta sostenida. GLM 100 mg presentó el menor coste por remisión

adicional (935 \$) y por respuesta adicional (701 \$) en comparación con la terapia convencional. GLM 50 mg produjo costes ligeramente más altos que GLM 100 mg. IFX se asoció con el mayor número adicional de remisiones y respuestas estimadas, y con un mayor coste por remisión (1.975 \$) y por respuesta (1311 \$). ADA se asoció con el mayor coste por remisión (7.430 \$) y coste por respuesta (2.361 \$). El coste adicional por remisión y el coste por respuesta asociado con IFX frente a GLM 100 mg fueron de 14.659 \$ y 4.753 \$, respectivamente. Los resultados sugirieron que el coste adicional de 1 año por remisión y respuesta era más bajo con GLM 100 mg, seguido de GLM 50 mg. Aunque IFX tenía la mayor eficacia, no presentó el menor coste por remisión o respuesta y ADA produjo el mayor coste [32].

→ Costes asociados al tratamiento de la espondilitis anquilosante con Infiximab

La EA es un tipo de artritis que primariamente afecta a la espina dorsal o espalda. En la EA, las articulaciones y los ligamentos que se encuentran a lo largo de la columna vertebral (espina dorsal) se inflaman. La inflamación produce dolor y rigidez, que usualmente comienza en la espalda baja o las nalgas y podría progresar hacia la parte superior de la columna, el pecho y el cuello. Con el paso del tiempo, las articulaciones y los huesos (las vértebras) pueden fusionarse, causando que la columna se vuelva rígida e inflexible. Otras articulaciones, tales como las caderas, los hombros y las rodillas también pueden afectarse. Es una enfermedad sistémica, lo que significa que podría afectar otros órganos del cuerpo, y crónica. La gravedad de los síntomas y la discapacidad varían de una persona a otra. Con mayor frecuencia, los primeros síntomas de EA aparecen entre los 17 y los 35 años de edad y es más común en hombres que en mujeres. La EA puede desarrollarse durante la niñez, siendo los niños más susceptibles a presentarla que las niñas. Cuando los niños tienen EA, los síntomas normalmente empiezan en las caderas, las rodillas o los talones y después progresan a la espina dorsal.

Anexo I

Casi medio millón de personas en los EE.UU. presentan esta enfermedad, la cual es más común en anglosajones que en afroamericanos. Sin embargo, los asiáticos y los hispanos podrían desarrollarla en porcentajes similares a los primeros. Es una enfermedad frecuente, ya que según los datos actuales se calcula una incidencia de unos 7 casos nuevos por cada 100.000 habitantes al año [33]. La prevalencia de EA oscila entre el 0,3 y el 1,06 % dependiendo de la serie estudiada. La EA, prototipo de este grupo de enfermedades, presenta una prevalencia muy diversa entre diferentes grupos étnicos, situándose en Europa entre el 0,082 y el 0,26 % [34].

Se desconoce la causa de la EA, pero los genes y la herencia juegan un papel importante. El tratamiento para EA se enfoca en la reducción del dolor y la rigidez, para prevenir deformaciones y ayudar al paciente a continuar con sus actividades normales. Entre los medicamentos se emplean AINEs; FARME y MB inhibidores del TNF- α : ETN, IFX, ADA, GLM y Secukinumab (SKN) [35].

Con la finalidad de comparar indirectamente la eficacia de varios de estos agentes biológicos para el tratamiento de la EA activa, KA. Betts *et al.* [36] realizaron una revisión de la literatura específica para identificar ensayos clínicos aleatorios para ADA, IFX, GLM, Certolizumab Pegol, ETN y SKN para el tratamiento de la EA activa. Como resultados se identificaron quince estudios, que incluyeron las tasas de respuesta ASAS20 y/o ASAS40 en la semana 12 hasta la semana 16. Los pacientes con EA tratados con IFX tenían el NNT más bajo para lograr una respuesta adicional, seguido de los tratados con ADA. ADA tenía el coste más bajo durante 12 semanas por respondedor ASAS20 (26.888 \$), seguido de IFX (28.175 \$) y GLM (28.199 \$). ADA también tenía el menor coste por respondedor ASAS40 (26.898 \$), seguido por IFX (32.508 \$) y ETN (34.406 \$) [36].

M. Corbett *et al.* [37] determinaron la eficacia clínica, seguridad y coste-efectividad en el NHS inglés de ADA, CLZP, ETN, GLM e IFX, dentro de sus indicaciones autorizadas, para el tratamiento de EA grave activa o espondiloartritis axial no radiográfica (nr-AxSpA) grave (pero con signos

objetivos de la inflamación). Para ello realizaron una revisión sistemática y un modelo económico. Emplearon quince bases de datos en busca de estudios pertinentes en julio de 2014. El modelo tuvo un horizonte de tiempo de vida de 60 años. En EA nr-AxSpA, todos los anti-TNF eran aproximadamente igual de eficaces, aunque algo más en EA; y la eficacia se mantenía en el tiempo (alrededor del 50 % de los pacientes seguían respondiendo a los 2 años). Las relaciones coste-efectividad incrementales iban desde 19.240 £ a 66.529 £ en función del anti-TNF empleado y los supuestos del modelo. Los autores concluyeron que la terapia anti-TNF puede ser un uso efectivo de los recursos del NHS en función de cuales sean los supuestos considerados apropiados [37].

→ Costes asociados al tratamiento de la artritis psoriásica y psoriasis en placa con Infliximab

La APs es una enfermedad inflamatoria crónica no contagiosa que afecta a las articulaciones y/o entesis (zona de unión del tendón y ligamento al hueso). La afectación de la Ps cutánea afecta a entre un 2-3 % de la población general. De estos pacientes entre un 10-30 % van a padecer APs, la cual también puede surgir en personas sin Ps cutánea, pero con antecedentes familiares de Ps. La APs puede manifestarse en todas las edades, incluso en niños, y sin distinción de género, aunque es más probable en la etapa que va desde los 30 a los 64 años. La lesión articular es de tipo inflamatorio, es decir, cursa con dolor, hinchazón, calor y dificultad de movimiento de la articulación. Puede afectar a cualquier articulación del cuerpo, incluso a la columna vertebral, aunque es más frecuente a nivel de las extremidades inferiores (rodillas, tobillos, pies). Si la inflamación articular no se trata de forma precoz puede producirse una destrucción articular con la consiguiente deformidad e incapacidad funcional a largo plazo. La forma de manifestarse de la APs es diferente para cada individuo. En el 85 % de los casos la Ps aparece años antes que la artritis, solo en un 5-10 % de los pacientes la artritis precede a la Ps. Se pueden distinguir diversas manifestaciones clínicas dentro de la APs: a nivel de la piel; a nivel articular y otras zonas afectadas como el ojo e intestino [38].

Anexo I

La importancia de realizar estudios coste-efectividad de los diferentes tratamientos aplicados en la Aps, queda reflejada en la gran cantidad de artículos publicados con ese fin. Así, M. Rodgers *et al.* [39] determinaron la eficacia clínica, seguridad y coste-efectividad de ETN, IFX y ADA para el tratamiento de la APs activa y progresiva en pacientes que tienen una respuesta inadecuada al tratamiento estándar. Las revisiones sistemáticas se realizaron, con datos recabados a partir de 10 bases de datos electrónicas hasta junio de 2009. El Grupo de Evaluación encontró que bajo los supuestos del caso base, ETN es más probable que sea la estrategia rentable para los pacientes con Aps y Ps leve a moderada si el umbral de coste-efectividad fuese de 20.000-30.000 £ por AVAC. Todos los tratamientos biológicos tenían una probabilidad similar de ser rentables para los pacientes con Aps y Ps moderada a severa en un umbral de 20.000 £ por AVAC. En un análisis secundario, fue más probable que fuese rentable ETN en un umbral de 20.000-30.000 £ por AVAC para los pacientes con Aps y Ps de leve a moderada que fracasaron por eventos adversos o ineficacia con ADA o IFX como tratamiento de primera línea. Para los pacientes con Aps y Ps leve a moderada que fracasaron con ETN como tratamiento de primera línea por cualquiera de los eventos adversos o ineficacia, ADA fue más rentable en un umbral de 20.000 £ por AVAC, siendo IFX más rentable si el umbral es de 30.000 £ por AVAC [39].

Mediante otro estudio [40] fue determinada y comparada la rentabilidad de los agentes biológicos en relación con el coste por paciente, para lograr una mínima diferencia importante (MID) en el Índice de Calidad de Vida en Dermatología (DLQI) y el coste por paciente para lograr una mejora del 75 % en el Índice de Severidad del Área de Psoriasis (PASI-75). Para ello se determinó la relación coste-eficacia de cada agente durante un período de 12 semanas y se realizó un análisis de sensibilidad. Veintisiete estudios fueron incluidos en el análisis. Por vía intravenosa (i.v.) IFX 3 mg/kg fue el agente biológico más rentable con respecto tanto al coste por paciente para lograr PASI-75, como para el coste por paciente para lograr un DLQI MID. Alefacept fue el agente menos rentable hasta un nivel del 10 % de variación en todas las dosis, excepto 0,025 mg/kg una vez por semana [40].

V. Fragoulakis *et al.* [41] también estimaron recientemente el coste anual por paciente del tratamiento con ADA, ETN, IFX y UTK por estado de respuesta para los pacientes nuevos y existentes con Ps moderada a grave en Grecia, obteniendo como resultado que el coste medio anual del tratamiento de nuevos pacientes que respondieron (o no responden) era el siguiente: ADA 10.686 €, ETN 10.415 €, IFX 14.738 €, y UTK 17.155 €. Para los pacientes existentes el coste anual medio fue de 9.916, 9.462, 12.949 y 17.149 €, respectivamente. De tal manera concluyeron que el coste del tratamiento con ETN, es menor que el de los otros agentes biológicos para la Ps en placas de moderada a severa en Grecia, tanto para los pacientes nuevos como para los ya existentes, independientemente de su estado de respuesta [41].

Otra evaluación realizada por Y. Bravo Vergel *et al.* [42] para determinar la estrategia coste-efectiva para el tratamiento de la APs comparando dos MB (ETN e IFX) siguiendo su posología y la estrategia de cuidados paliativos desde la perspectiva del NHS de Reino Unido, concluyó que comparado con la estrategia de cuidados paliativos, ETN mostraba una ratio coste-efectividad que iba de 16.855 a 30.345 £ por AVAC. En un horizonte temporal de 10 años, sus resultados sugieren que para niveles de gasto máximo del sistema sanitario de 30.000 £ por AVAC, ETN podía ser considerado como coste-efectivo para el tratamiento de la APs tras la falta de respuesta a la terapia convencional [42].

Durante el año 2016, y con el objetivo de calcular el tratamiento más coste efectivo de los existentes para la Ps, se desarrolló un modelo de evaluación económica recogiendo tanto los costes directos como indirectos. El periodo temporal fue de 12 semanas para los siguientes tratamientos: fototerapia, medicamentos sistémicos clásicos y MB. Para el precio de los fármacos se aplicaron los precios oficiales para el sistema sanitario español. Los datos del coste que supuso cada tratamiento vienen indicados en la tabla 1.5. El tratamiento tópico fue el más económico de todos y el de menor efectividad. El tratamiento más coste efectivo fue MTX y el menos coste efectivo la fototerapia. En el periodo de 12 semanas, en el caso de los tratamientos biológicos, ETN costó 7.025,57 € y Stelara 7.231,13 €. En todos los tratamientos biológicos, la variable más

Anexo I

cara fue el precio del fármaco seguida de las pruebas complementarias y costes estructurales. Así, en ETN, el coste del fármaco incrementó un 89,10 %, ADA suponía un coste de 5.276,56 € e IFX un coste total de 6.622,96 €. El peso en precio del fármaco fue de un 89,41 %, un 4,68 % en pruebas complementarias y un 2,53 % en costes estructurales [43].

Tabla 1.5. Costes de los diferentes tratamientos de Ps. Fuente: [43]

		CT	T	PP	PF	CE	DF	PV	VS	VE	PC
Tópico	Daivobet	572.62	6.00	79.40	144.99	183.00	0.00	99.07	59.86	0.00	0.00
Fototerapia	UVBbe	7.168.49	108.00	1.429.20	0.00	3.299.40	18.00	99.07	59.86	2154.96	0.00
	PUVA	7.240.49	108.00	1.429.20	72.00	3.299.40	18.00	99.07	59.86	2154.96	0.00
Sistémicos clásicos	Metotrexato	1.396.38	15.00	198.50	4.74	458.25	0.00	99.07	119.72	119.72	381.38
	Ciclosporina	2.625.48	15.00	198.50	1.233.84	458.30	0.00	99.07	119.70	119.70	381.40
	Acitretina	1.532.22	15.00	198.50	140.58	458.30	0.00	99.07	119.70	119.70	381.20
Biológicos	Etanercept	7025.57	6.00	79.40	6.259.44	183.30	0.00	99.07	59.86	0.00	338.50
	Adalimumab	5.276.53	6.00	79.40	4510.40	183.30	0.00	99.07	59.86	0.00	338.50
	Infliximab	6.622.98	9.00	119.10	5.542.92	274.95	0.00	99.07	59.86	179.58	338.50
	Stelara	7.231.13	6.00	79.40	6.465.00	183.30	0.00	99.07	59.86	0.00	338.50

CT: Coste total del tratamiento estudiado. T: Número de desplazamientos al centro de salud por su coste unitario. PP: Número de horas de productividad perdidas por su coste unitario. PF: Precio del medicamento por costes unitarios de dosificación. CE: Costes estructurales imputados a cada paciente. DF: Número de sesiones de fototerapia por el coste unitario PV: Primera consulta por su coste unitario. VS: Número de consultas sucesivas por el coste de cada una de ellas. VE: Número de horas necesarias de enfermería para el suministro del tratamiento por su coste. PC: Pruebas complementarias por el coste de las mismas

2. POSIBLES MEDIDAS DE AHORRO

Todo lo descrito anteriormente revela que el coste del tratamiento con IFX es muy elevado en cualquiera de las indicaciones para las que está autorizado, siendo incluso en algunas ocasiones no coste-efectivo. La realización de ensayos de monitorización, aplicación de algoritmos al tratamiento, así como la creación de protocolos de uso actualizados, son algunas de las medidas a tomar que pueden resultar beneficiosas para reducir el gasto sanitario que supone el uso de este mAb.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Agencia Europea de Medicamentos (EMA). Ficha técnica de Remicade® (Infiximab). <http://www.ema.europa.eu>
- [2] Soria Aledo A. Tesis Doctoral. Estudios de polimorfismos genéticos tnf-alfa (238 y 308), il-10 (1082) mthfr (677) y del das-28, como predictores de la respuesta al tratamiento con infiximab, en la artritis reumática. *Universitat de València. Servei de Publicacions 2009.*
- [3] Mulero Mendoza J, Vera Mendoza M. Infiximab y Etanercept hoy. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud Vol 27(6), 178174, 2003.*
- [4] Tao Gu *et al.* Comparing Biologic Cost Per Treated Patient Across Indications Among Adult US Managed Care Patients: A Retrospective Cohort Study. *Drugs Real World Outcomes. 2016 Dec; 3(4):369-381.*
- [5] Asociación ConArtritis. Coordinadora Nacional de Artritis. Artritis Reumatoide. 2014. www.conartritis.org
- [6] Malottki K. *et al.* Adalimumab, etanercept, infiximab, rituximab and abatacept for the treatment of rheumatoid arthritis after the failure of a tumour necrosis factor inhibitor: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess. 2011 Mar; 15(14):1-278.*
- [7] C. Rubio-Terrés *et al.* Utilización y coste de los modificadores biológicos de la artritis reumatoide en España (estudio PRAXIS). *Farm Hosp 2007; 31 (2): 78-92.*
- [8] Holden SE. *et al.* Cost of dose escalation in people with rheumatoid arthritis treated with tumour necrosis factor inhibitors across Europe. *Clin Exp Rheumatol. 2016 Jul-Aug; 34(4):679-84.*
- [9] Cárdenas M. *et al.* Real-world cost-effectiveness of infiximab, etanercept and adalimumab in rheumatoid arthritis patients: results of the CREATE registry. *Rheumatol Int. 2016 Feb; 36(2):231-41.*
- [10] Borrás-Blasco J. *et al.* Economical impact associated with a biological therapy prioritization protocol in patients with rheumatoid arthritis in the Hospital of Sagunto. *Expert Opin Biol Ther. 2014 Nov; 14(11):1561-7.*

Anexo I

[11] Sugiyama N. *et al.* Treatment Patterns, Direct Cost of Biologics, and Direct Medical Costs for Rheumatoid Arthritis Patients: A Real-world Analysis of Nationwide Japanese Claims Data. *Clin Ther.* 2016 Jun; 38(6):1359-1375.

[12] Fragoulakis V. *et al.* Economic evaluation of anti-TNF agents for patients with rheumatoid arthritis in Greece. *Clinicoecon Outcomes Res.* 2015 Jan 16; 7:85-93.

[13] Gassull MA. *et al.* Enfermedad inflamatoria intestinal. III Edición. Arán Ediciones S.L. ISBN: 978-84-86725-98-3.

[14] Dr. Fernández Suárez A. Enfermedad Inflamatoria intestinal. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. *Comisión de Bioquímica de las Enfermedades Inmunológicas.* Fecha de creación: 11/04/2014.

[15] Medina Benítez E. *et al.* Enfermedad inflamatoria intestinal. Hospital 12 de Octubre. Madrid. Hospital Ramón y Cajal. Madrid. Hospital Infantil Universitario La Paz. Madrid. *Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHP-AEP.* Pág. 151-160.

[16] Saro Gismera C. *et al.* Incidencia y prevalencia de la enfermedad inflamatoria intestinal en Gijón (Asturias). *Gastroenterol Hepatol.* 2000 Aug-Sep; 23(7):322-7.

[17] Costa Ribas C. y Castiñeira Pérez C.. Enfermedad inflamatoria intestinal. Servicio de Atención Primaria de Fingoy. *Servicio Galego de Saúde, Lugo, España.* *Atención Primaria en la Red.* www.fisterra.com.

[18] EUROPA PRESS. Salud-Enfermedades. Aumenta la incidencia de la enfermedad inflamatoria intestinal en niños, hasta 300 nuevos casos al año en España. MADRID| 03/04/2016

[19] Taks M. *et al.* The effect of implementation of a treatment algorithm for Infliximab on remission rates and drug costs in inflammatory bowel disease patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 29 (2), 169-173. 2 2017.

[20] Van der Valk ME. *et al.* Healthcare costs of inflammatory bowel disease have shifted from hospitalisation and surgery towards anti-TNF α therapy: results from the COIN study. *Gut.* 2014 Jan; 63(1):72-9.

[21] Martelli L. *et al.* Cost-effectiveness of drug monitoring of anti-TNF therapy in inflammatory bowel disease and rheumatoid arthritis: a systematic review. *J Gastroenterol.* 2017 Jan; 52(1):19-25.

- [22] Severs M. *et al.* The Economic Impact of the Introduction of Biosimilars in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis* (2017) 11 (3): 289-296.
- [23] Lindsay J. *et al.* Health-economic analysis : cost-effectiveness of scheduled maintenance treatment with infliximab for Crohn's disease –modelling outcomes in active luminal and fistulising disease in adults. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008; 28(1): 76-87.
- [24] Dretzke J. *et al.* A systematic review and economic evaluation of the use of tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) inhibitors, adalimumab and infliximab, for Crohn's disease. *Health Technol Assess.* 2011 Feb; 15(6):1-244.
- [25] Steenholdt C. *et al.* Individualized Therapy Is a Long-Term Cost-Effective Method Compared to Dose Intensification in Crohn's Disease Patients Failing Infliximab. *Dig Dis Sci.* 2015 Sep; 60(9):2762-70.
- [26] Vega-Coca MD. *et al.* Eficacia, seguridad y eficiencia de los fármacos anti-TNF α en el tratamiento de la enfermedad de Crohn no fistulizante, moderada-grave, en pacientes adultos. *Sevilla: Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía; marzo 2014. Informe 3-2014.*
- [27] Galván-Banqueri M. *et al.* Recomendaciones para la elección y monitorización del tratamiento con fármacos anti-TNF α en pacientes adultos con colitis ulcerosa moderada-grave. *Sevilla: Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía; febrero 2014.*
- [28] Dras. Gómez Senent S. y M.D. Martín Arranz MD. Todo sobre la colitis ulcerosa. ¿Qué Medicamentos Sirven Para el Tratamiento de la Colitis Ulcerosa? Unidad de Enfermedad Inflamatoria Intestinal. *Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Universitario La Paz. Madrid Capítulo 6. Pág 35-41.*
- [29] Lofland JH. *et al.* Cost-per-remission analysis of infliximab compared to adalimumab among adults with moderate-to-severe ulcerative colitis. *J Med Econ.* 2013; 16:461-7.
- [30] Yokomizo L. *et al.* Cost-effectiveness of adalimumab, infliximab or vedolizumab as first-line biological therapy in moderate-to-severe ulcerative colitis. *BMJ Open Gastroenterol.* 2016 May 3; 3(1):e000093.
- [31] Williams JG. *et al.* Comparison of Infliximab and ciclosporin in Steroid

Anexo I

Resistant Ulcerative Colitis: pragmatic randomized. Trial and economic evaluation (CONSTRUCT). *Health Technol Assess.* 2016 Jun; 20(44):1-320.

[32] Toor K. *et al.* Cost per remission and cost per response with infliximab, adalimumab, and golimumab for the treatment of moderately-to-severely active ulcerative colitis. *J Med Econ.* 2015 Jun; 18(6):437-46.

[33] Sociedad Española de Reumatología (SER). Espondilitis Anquilosante. www.ser.es.

[34] Casals-Sánchez JL. *et al.* Características de los pacientes con espondiloartritis seguidos en unidades de reumatología en España. Estudio emAR II. *Reumatol Clin.* 2012; 8(2):107-113.

[35] Arthritis foundation. Espondilitis anquilosante. <http://espanol.arthritis.org>

[36] Betts KA. *et al.* Network Meta-Analysis and Cost Per Responder of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin Inhibitors in the Treatment of Active Ankylosing Spondylitis. *Rheumatol Ther.* 2016 Jul 25.

[37] Corbett M. *et al.* Tumour necrosis factor- α inhibitors for ankylosing spondylitis and non-radiographic axial spondyloarthritis: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2016 Feb; 20(9):1-334, v-vi.

[38] Asociacion ConArtritis. Coordinadora Nacional de Artritis. Artritis psoriásica. 2014. www.conartritis.org

[39] Rodgers M. *et al.* Etanercept, infliximab and adalimumab for the treatment of psoriatic arthritis: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2011 Feb; 15(10):i-xxi, 1-329.

[40] Ahn CS. *et al.* Cost effectiveness of biologic therapies for plaque psoriasis. *Am J Clin Dermatol.* 2013 Aug; 14(4):315-26.

[41] Fragoulakis V. *et al.* Annual biologic treatment cost for new and existing patients with moderate to severe plaque psoriasis in Greece. *Clinicoecon Outcomes Res.* 2015 Jan 8; 7: 73-83.

[42] Bravo Vergel Y. *et al.* Análisis de coste efectividad de los medicamentos biológicos para el tratamiento de la artritis psoriática. Economía de la Salud ¿dónde estamos 25 años después? *XXV Jornadas de Economía de la Salud. Barcelona, 13-15 de julio 2005.*

[43] Alfageme Roldán F. *et al.* Coste efectividad de diferentes tratamientos para la psoriasis. *Rev Esp Salud Pública.* 2016; Vol. 90: 13 de abril: e1-e7.



ANEXO II

COSTES ASOCIADOS AL
TRATAMIENTO CON
BEVACIZUMAB (AVASTIN®)

1. COSTES ASOCIADOS AL TRATAMIENTO CON BEVACIZUMAB

Desde su salida al mercado en 2004, BVZ ha sido un fármaco superventas que en pocos años ha obtenido la aprobación para el tratamiento de cinco tipos de tumores y está en investigación para otros cincuenta. En España el precio del tratamiento con BVZ es de unos 30.000 € al año. A pesar de su elevado precio, en el año 2010 sus ventas superaron los 6.000 millones de dólares en EE.UU., siendo utilizado en primera y segunda línea de tratamiento en muchos pacientes, a menudo fuera de las indicaciones autorizadas. Además, BVZ ha sido el segundo fármaco más vendido durante el año 2016 [1].

BVZ es uno de los fármacos de mayor precio que se comercializa actualmente. En muchos países con Servicios Nacionales de Salud, el uso del mismo se ha restringido, basándose en los cálculos de costes y beneficios que sugieren que la droga no es coste-efectiva, aportando solo ventajas mínimas considerables en muchos casos.

Un estudio publicado en New England Journal of Medicine [2] señaló que un tratamiento con BVZ supone un coste de entre 42.800 y 55.000 \$. El coste de Avastin[®], según lo indicado actualmente por el fabricante, es de 1.848,80 £ por mes, para un paciente típico de 70 kilogramos (Kg). La dosificación recomendada es 5 mg/kg y debe ser suministrada una vez cada 14 días como infusión intravenosa hasta que la progresión de la enfermedad se reduzca. De acuerdo con el coste actual de suministrar BVZ (1.848,80 £ por mes para una persona de 70 kg) y el tiempo medio durante el cual se requiere el tratamiento (aproximadamente 10 meses), el coste de BVZ estaría alrededor de 18.500 £ por paciente tratado. A esto además habría que sumar el coste de quimioterapia basada en fluoropirimidina, que supondría unas 1.115-3.000 £ por ciclo de tratamiento (5-FU en combinación con el ácido folínico: 63 \$ para 8 semanas de tratamiento).

Anexo II

En Canadá, el coste supone una suma de 40.000 \$ por año. Este elevado coste está llevando a que en los EE.UU. las compañías de seguros rehúsen pagar en todo o en parte los costes de la terapia de Avastin[®] y el reembolso también se restringe en Canadá [2].

Por último, pero no menos importante, el análisis fármaco-económico o evaluación de la relación coste-beneficio de BVZ es un problema. Aunque los umbrales para aceptar una droga como económicamente aceptable y valiosa pueden diferir en cada país, el coste aceptable por año de vida ganado o años de calidad de vida ajustados (AVAC) se ha fijado en aproximadamente 80.000 € en varios países europeos. Basándose en una suposición aceptada, se pueden calcular los costes relacionados con el tratamiento en relación con la ganancia en el resultado clínico, y esto se hace cada vez más para los medicamentos nuevos y caros contra el cáncer, incluyendo Avastin[®]. Tomado como ejemplo, este análisis ha instado al Servicio de Salud Nacional Inglés a concluir que BVZ en combinación con bolos de 5-FU / leucovorina o IFL no es coste-efectivo. En conclusión, la introducción en la clínica de BVZ hace 12 años se ha traducido en la aprobación, aceptación y el uso regular de un número aún mayor de indicaciones. Aunque el aumento de la supervivencia en muchos casos es más bien modesto, BVZ ha sido adoptado por muchos oncólogos como una opción nueva y atractiva para el tratamiento de muchos pacientes. Sin embargo, antes de que su uso se amplíe a otras indicaciones, es crucial tener una evidencia robusta proporcionada por estudios aleatorizados [3].

Actualmente, son varios los estudios realizados sobre el coste que supone un tratamiento con BVZ en los diferentes tipos de patologías en las que es usado. A continuación se muestran los resultados obtenidos de varios de estos estudios durante su uso como tratamiento de elección.

→ Costes asociados al tratamiento del cáncer de mama metastásico (CMM) con Bevacizumab

El CMM es el estado más avanzado de cáncer, donde el cáncer se expande a otras partes del seno y a otras partes del cuerpo.

En el año 2012 1,7 millones de nuevos casos fueron diagnosticados en el mundo entero. Del 5 % al 10 % de las pacientes fueron diagnosticadas en un estado metastásico de la enfermedad, siendo más del 50-80 % en países en vías de desarrollo. Aunque faltan datos, algunos estudios han encontrado que aproximadamente el 20-30 % de las pacientes con cáncer en estadio temprano pueden recurrir a un cáncer de mama metastásico. El promedio de supervivencia para el CMM es de 2 a 3 años. Se estima que 561.334 muertes por cáncer de mama (CM) ocurrieron alrededor del mundo en el 2015, ante todo de CMM. Para el 2030, se estima que el número de muertes alcanzará los 805.116 representando el 43 % de incremento en el número de muertes por CM [4].

En la actualidad hay varios tratamientos disponibles para el CMM, entre los cuales se encuentra el uso de BVZ.

El coste unitario de cada vial de Avastin[®] es de 1.272,89 € para el vial de 16 ml y 341,71 € para el vial de 4 ml (PVL, 2008). Considerando una dosis de 10 mg/kg cada 2 semanas, el coste anual varía de 827 a 888 € por kg de peso; considerando una dosis de 15 mg/kg cada 3 semanas, el coste anual varía de 811 a 871 € por kg de peso (estimaciones basadas en el supuesto de que cada paciente recibe un año completo de tratamiento). Estas estimaciones sólo incluyen el coste directo del medicamento; no incluyendo el coste de la administración, de visitas a médicos, estancias, otras medicaciones, etc. Teniendo en cuenta diversos datos de prevalencia de la enfermedad y de indicación y utilización del medicamento, se estima el impacto presupuestario de la financiación de Avastin[®] en aproximadamente 1,4 millones de euros al año.

La tabla 2.1 muestra las presentaciones y precio de Avastin[®].

Tabla 2.1. Presentaciones y precio de Avastin®

FORMA FARMACÉUTICA Y DOSIS	UNIDADES POR ENVASE	CÓDIGO	COSTE POR UNIDAD PVL CON IVA
Vial 400 mg (25 mg/ml x 16 ml)	1	650603	1.323,80 €
Vial 100 mg (25 mg/ml x 4 ml)	1	650602	355,38 €

Precio de la dosis de un vial de 400 mg: 4,13 €

La tabla 2.2 muestra las estimaciones del coste de un año completo de tratamiento por persona para distintos pesos corporales.

Tabla 2.2. Estimación del coste por persona de un año completo de tratamiento con Avastin® (euros 2008)

PESO CORPORAL (Kg)	10 mg/Kg CADA 2 SEMANAS		15 mg/Kg CADA 3 SEMANAS	
	Vial 16 ml	Vial 4 ml	Vial 16 ml	Vial 4 ml
50	41.368,93 €	44.422,30 €	40.573,37 €	43.568,03 €
60	49.642,71 €	53.306,76 €	46.688,04 €	52.281,63 €
70	57.916,50 €	62.191,22 €	56.802,72 €	60.995,24 €

La tabla 2.3 muestra diversos escenarios de impacto presupuestario para el Servicio Canario de la Salud para distintas prevalencias de la enfermedad, en el caso de que cada paciente recibiera un año completo de tratamiento. Estas estimaciones sólo incluyen el coste directo del medicamento; no incluyen el coste de la administración, de visitas a médicos, estancias, otras medicaciones, etc.

Tabla 2.3. Análisis del impacto presupuestario anual en el Servicio Canario de la Salud de la introducción de Avastin® (euros 2008)

Nº de personas	Vial 16 ml			Vial de 4 ml		
	15 mg/Kg cada 3 semanas			10 mg/Kg cada 2 semanas		
	50 Kg de peso	60 Kg de peso	70 Kg de peso	50 Kg de peso	60 Kg de peso	70 Kg de peso
	Coste del tratamiento (€)					
1	40.573,37	48.688,04	56.802,72	44.422,30	53.306,76	62.191,22
10	405,734	486,880	568,027	444,223	533,068	621,912
15	608,601	730,321	852,041	666,335	799,601	932,868
40	1.622,935	1.947,522	2.272,109	1.776,892	2.132,270	2.487,649
60	2.434,402	2.921,283	3.408,163	2.665,338	3.198,406	3.731,473
70	2.840,136	3.408,163	3.976,190	3.109,561	3.731,473	4.353,385
80	3.245,870	3.895,043	4.544,217	3.553,784	4.264,541	4.975,298

* Estimaciones basadas en el supuesto de que cada paciente recibe un año completo de tratamiento.

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que diversos factores hacen que la utilización real por paciente sea inferior a la estimada en las tablas anteriores. Estos factores son: la indicación (motivada por criterios clínicos) de dosis menores a las señaladas en la ficha técnica del medicamento, la interrupción temporal o definitiva de la medicación debida a la aparición de efectos adversos y la evolución clínica de estos pacientes, la cual determina su supervivencia. Todo esto hace que la duración promedio del tratamiento sea inferior al año (5 meses aproximadamente según datos del servicio de farmacia del Hospital Universitario de Canarias).

Por otro lado, según información facilitada por diversos Servicios de Farmacia Hospitalaria, el laboratorio ofrece a los hospitales un acuerdo, denominado AVACO, por el que el laboratorio se compromete a hacerse cargo del importe de los viales una vez superado el umbral de los 10.000 mg por paciente y año.

Teniendo en cuenta todos estos factores, el coste promedio del tratamiento con BVZ de una paciente con CMM se estima en unos 20.000 € al año aproximadamente (5-6 meses de tratamiento) [5].

Anexo II

Un informe de evaluación para el Comité de Actualización de la Guía Farmacoterapéutica de Hospitales de Andalucía sobre el coste que supone el tratamiento del CMM con BVZ en combinación con paclitaxel, indicó que el coste de añadir ambos en combinación como tratamiento de primera línea del CMM y del CMM con HER-2 negativo, se sitúa en torno a los 30.000 €/paciente, con lo que el coste/eficacia incremental de BVZ excedería los 5.000 € por mes libre de progresión (60.000 €/año), sin influencia demostrada en la supervivencia y la calidad de vida. Es evidente con estos datos, que el tratamiento excede los dinteles de eficiencia (30.000-50.000 €/QALY). El coste incremental de añadir BVZ a paclitaxel por mes libre de progresión es muy superior a las alternativas disponibles. Por ello, y dado que el medicamento presentaba una eficacia y seguridad comparables a las alternativas existentes para las indicaciones propuestas y no aportaba ninguna mejora en el perfil de coste-efectividad, ni en la organización o gestión de los servicios, en el año 2008 se propuso no incluirlo en la Guía Fármaco-Terapéutica de Hospitales de Andalucía [6].

→ Costes asociados al tratamiento del cáncer de ovario con Bevacizumab

El cáncer de ovario es un tumor maligno que nace en cualquiera de las partes del ovario. Hay varios tipos histológicos de cáncer de ovario. Los más frecuentes son: carcinomas serosos (32 %), adenocarcinomas (20 %) y carcinomas mucinosos (12 %). Los tumores germinales sólo representan el 2 % de los tumores, pero son éstos los que se diagnostican en las más jóvenes, los que mejor responden a los tratamientos y por lo tanto, los que mejor supervivencia tienen. En países en vías de desarrollo, los tumores germinales representan hasta el 18-20 % del total [7].

El cáncer de ovario fue el séptimo cáncer más frecuente en las mujeres en el mundo el año 2012 (239.000 nuevos casos). En España en 2014 se diagnosticaron 3.276 nuevos casos siendo el quinto cáncer más frecuente en las mujeres, igual que en Europa. La tasa de incidencia ajustada a la población estándar mundial fue de 7,4 por 100.000 mujeres [8]. Alrededor del 50 % de los casos se concentran en los países desarrollados. En

España se diagnostican unos 3.300 casos anuales lo que representa el 5,1 % de los cánceres entre las mujeres. La incidencia en nuestro país se puede considerar alta [7].

Es un tumor propio de las edades medias de la vida. La mayoría de los casos se diagnostican entre los 45 y los 75 años. Hay un número significativo de casos desde los 30 años, y no es infrecuente diagnosticar tumores en jóvenes desde los 15 [7].

El cáncer de ovario tiene un pronóstico bastante malo. La supervivencia relativa a 5 años estandarizada por edad en España en las pacientes diagnosticadas durante el periodo 2000-2007 fue de 36,8 %, similar a la del conjunto de Europa (37,6 %) [8].

No existe actualmente ningún método eficaz que facilite el diagnóstico precoz, por lo que hasta el 75 % de los casos se presentan en fases avanzadas. Entre un 5 y un 10 % de los tumores de ovario se atribuyen a factores genéticos heredados. Lo mismo sucede en mujeres portadoras de una mutación en el gen BRCA1 o BRCA2. Los anticonceptivos orales protegen contra esta enfermedad (se estima hasta un 50 % menos de incidencia en aquellas mujeres que han tomado anticonceptivos 5 o más años), sin embargo, la terapia hormonal sustitutiva (THS) administrada durante la menopausia parece que aumenta el riesgo. Otros factores de riesgo son la ausencia de embarazos y el sobrepeso así como el tabaquismo [7].

Los principales tratamientos del cáncer de ovario son la cirugía, el uso de quimioterapia, terapia hormonal, terapia dirigida y radioterapia. En la actualidad se está empleando terapia biológica angiogénica, específicamente BVZ. A menudo, se emplean dos o más tipos de tratamientos diferentes.

Haciendo referencia al empleo de BVZ como tratamiento del cáncer de ovario, en el año 2012, una revisión sobre el empleo de este mAb en cáncer de ovario, realizado a solicitud del Comité de Actualización de la Guía Farmacoterapéutica de Hospitales de Andalucía, mostró (entre otros datos aportados) una comparación entre el coste que suponía el

Anexo II

tratamiento en el cual es incluido BVZ, con el coste que suponían otros tratamientos alternativos. La tabla 2.4 muestra el coste tratamiento/día y coste del tratamiento completo así como el coste incremental y la comparación con la terapia de referencia o alternativa a dosis usuales en cáncer de ovario [9].

Tabla 2.4. Comparación de costes del tratamiento evaluado frente a otra/s alternativa/s. Fuente: [9]

Precio unitario* (PVL+IVA)	Carboplatino+Paclitaxel	BVZ+Paclitaxel+Carboplatino	
	Carboplatino: 0.06 €/mg Paclitaxel: 0.1 €/mg	BVZ:3.4 €/mg Paclitaxel: 0.1 €/mg Carboplatino: 0.06 €/mg	
Posología**	400 mg/m ² +175 mg/m ² cada 3 semanas	15 mg/Kg +175 mg/m ² + 400 mg/m ² cada 3 sem 6 ciclos+ BVZ 15 mg/Kg cada 3 sem hasta completar un total de 22 ciclos (BVZ desde ciclo 2)	7.5 mg/Kg +175 mg/m ² + 400 mg/m ² cada 3 sem 6 ciclos+ BVZ 7.5 mg/Kg cada 3 sem durante 12 ciclos más o hasta progresión (BVZ desde ciclo 2)
Coste día	62.25 €	3.377,25 €	1.719,75 €
Coste tratamiento completo***	373.5 €	43.168,5 € (6 ciclos CP+13 ciclos B)	25.236 € (6 ciclos CP+15 ciclos B)
Coste incremental (diferencial) respecto a la terapia de referencia	Terapia de referencia	+ 42.795 €	+ 24.862,5 €

* Para el precio/mg se ha tenido en cuenta el precio aprobado según el Acuerdo Marco.

** Para realizar los cálculos se supone una superficie corporal de 1,5 m² y un peso de 65 Kg. Además se considera una dosis media de carboplatino de 400 mg/m².

*** Para el coste del tratamiento completo se ha tenido en cuenta la mediana de ciclos administrados (14 ciclos en el ensayo que utilizó 15 mg/kg de BVZ y 16 ciclos en el que utilizó 7,5 mg/kg).

Como conclusión se confirmó que el uso de BVZ no es coste-efectivo, suponiendo un gran incremento en el coste del tratamiento. El medicamento *es de una eficacia y seguridad comparable* a las alternativas

existentes para las indicaciones propuestas, sin embargo, *no aporta ninguna mejora en el perfil de coste-efectividad, ni en la organización o gestión de los servicios*. Por tanto, propusieron que solo fuese incluido en la guía fármaco-terapéutica de Hospitales de Andalucía como equivalente terapéutico a las opciones existentes, por lo que el fármaco concreto que exista en cada momento será el que resulte del procedimiento público de adquisiciones [9].

→ Costes asociados al tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) y glioblastoma (GBM) con Bevacizumab

- Degeneración macular asociada a la edad (DMAE)

La maculopatía asociada con la edad engloba un conjunto de alteraciones caracterizadas por la presencia de «drusas» en la retina que causan problemas en el campo visual central. Las drusas son acumulaciones de material blanco-amarillo que pueden evolucionar a lesiones conocidas genéricamente como degeneración macular o fase tardía de la maculopatía. Hay razonable evidencia (si las drusas son grandes y numerosas) del progreso desde etapas previas hasta la llamada fase tardía de la maculopatía o degeneración macular asociada a la edad (DMAE). Ésta tiene dos formas: atrófica (también llamada seca o «atrofia geográfica») y neovascular (húmeda o exudativa). Aunque con datos muy dispares, parece ser más frecuente esta última. No se conocen sus causas, aunque hay factores de riesgo aparte de la edad, como el consumo de tabaco y factores genéticos que muestran asociaciones consistentes [10] [11]. Aunque hay alternativas terapéuticas, estas lesiones son irreversibles y suponen una causa importante de alteraciones de la visión y calidad de vida por la afección en mayor o menor grado de la visión central [11].

La DMAE, constituye en la actualidad la primera causa de ceguera legal por encima de los 50 años en los países desarrollados, así como la tercera causa principal en todo el mundo, y su prevalencia aumenta con la edad. Las estimaciones indican que el número de personas que sufrirán la última etapa de la enfermedad en el año 2020, será de unos 11 millones de

Anexo II

personas en el mundo [10]. La prevalencia en España es aproximadamente del 1,5 % de la población actual, lo que representa que alrededor de 707.857 personas padecen DMAE. Si se considera sólo la población mayor de 55 años (población con mayor probabilidad de padecer DMAE), la prevalencia es del 5,3 %. Es muy rara en menores de 50 años. La DMAE, fundamentalmente la forma neovascular, representa la primera causa de ceguera en personas mayores de países desarrollados. Aunque raramente lleva a ceguera completa, ya que la visión periférica no suele afectarse, la alteración en la autonomía y calidad de vida es importante [11].

A pesar de los avances en la prevención y el tratamiento de la enfermedad, el número de pacientes afectados se espera que aumente debido a una población de edad avanzada en rápido crecimiento. En muchos casos la salud mental de estos pacientes también puede sufrir, afectando la depresión al 30 % de los adultos mayores con discapacidad visual. Los pacientes con DMAE parecen presentar un riesgo particular de sufrir esta depresión. Esto subraya la necesidad urgente de un tratamiento eficaz de la DMAE y de la realización de estudios coste-efectividad de los tratamientos actualmente empleados para tratar esta patología así como de la monitorización de los mismos [10].

- *Glioblastoma (GBM)*

El GBM, es el tipo más común y agresivo de tumor cerebral maligno primario en adultos. Representa el 17 % de todos los tumores cerebrales primarios y tiene una tasa de incidencia de 3,19 por 100.000 años-persona. En España, la incidencia de tumores cerebrales por edad aumenta en forma dramática con la edad del paciente principalmente entre los 75 y 85 años de edad en ambos sexos, y el tipo más frecuente en los ancianos es el glioblastoma multiforme y el astrocitoma [12]. El glioblastoma multiforme y el astrocitoma anaplásico son los tumores cerebrales primarios más frecuentes del adulto, de muy mal pronóstico, y con un rápido crecimiento constituyendo aproximadamente el 45-50 % de los tumores de origen intracraneal [13].

Análisis de ADN, ARN y proteínas de GBM sugieren que no es un solo tipo de tumor, sino que existen varios subtipos moleculares distintos. Estos subtipos se han denominado proneural, proliferativo y mesenquimal. Un análisis más reciente también ha identificado otras subclases, denominadas neural y clásica.

En la actualidad, los diferentes subtipos se tratan de la misma manera. Las opciones de tratamiento disponibles son cirugía sola o conjuntamente con quimioterapia, radioterapia si no se ha empleado anteriormente, sola o con quimioterapia, braquiterapia intersticial, quimioterapia y radiocirugía estereotáxica [13]. Pero los GBM son tumores cerebrales altamente vascularizados, por lo tanto, son objetivos atractivos para las terapias antiangiogénicas [14], siendo estas utilizadas comúnmente para el tratamiento del GBM recurrente [15]. A pesar del empleo de estos tratamientos, la mediana de la supervivencia libre de progresión (PFS) no es muy alta, de ahí que sean necesarias nuevas opciones de tratamiento para estos pacientes, representando la terapia antiangiogénica como BVZ, una oportunidad terapéutica prometedora [16]. Pero, el coste de este tipo de tratamientos es muy elevado, de ahí la importancia de realizar análisis coste-efectividad de los mismos, tales como los descritos a continuación.

Un estudio comparativo entre el uso de BVZ vs. Ranibizumab (RNZ) en el tratamiento de la DMAE [17], indica que BVZ supone un coste mucho menor al del RNZ, siendo una alternativa para la que se dispone de la experiencia de uso en unos miles de pacientes en series de casos con resultados que parecen similares. La tabla 2.5 muestra la comparación en costes con la terapia de referencia a dosis usuales.

Tabla 2.5. Comparación con la terapia de referencia a dosis usuales.

Fuente: [17]

Costo tratamiento y comparación terapia de referencia						
Medicamento	Precio unitario (P. estimado de compra)	Posología	Costo/dosis	Nº sesiones estimadas mínimas/año	Costo tratamiento 6 sesiones	Ahorro incremental/paciente
Ranicizumab FA 10 mg/ml x 0.23 ml	\$7295	0.5 mg/ mes	\$ 7295	6	\$43770	---
Ranicizumab FA 10 mg/ml x 0.23 ml (a)	\$7295	0.5 mg/ mes	\$ 2431	6	\$14586	\$29184
Bevacizumab jeringas 2.5 mg/0.1ml (b)	\$340	1.25 mg/ mes	\$ 340	6	\$2040	\$41730
Bevacizumab FA 100 mg/4ml (c)	\$3092	1.25 mg/ mes	\$ 77	6	\$463	\$43307

(a) Servicio de Farmacia del Hospital El Cruce podría realizar el fraccionamiento de RNZ en tres jeringas, una vez instalada la campana de flujo laminar.

(b) Jeringas compradas a Farmacia que realizan el fraccionamiento bajo campana de flujo laminar de BVZ.

(c) Servicio de Farmacia del Hospital El Cruce podría realizar el fraccionamiento de BVZ en jeringas de 2.5 mg/0.1 ml, una vez instalada la campana de flujo laminar.

El impacto económico en el escenario del Hospital El Cruce (Buenos Aires, Argentina) suponiendo un total de pacientes tratados en un periodo de 6 meses: 105 pacientes = 105 dosis es el mostrado en la tabla 2.6.

Tabla 2.6. Estimación del impacto económico en el Hospital El Cruce (Buenos Aires, Argentina). Fuente: [17]

Estimación del impacto en el hospital El Cruce		
Periodo inicial de 6 meses = 105 dosis		
	Costo	Ahorro según las diferentes opciones
Ranicizumab FA 10 mg/ml x 0.23 ml	\$765975	---
Dosificando Ranicizumab en 3 jeringas	\$255255	\$510720
Reemplazo por Bevacizumab fraccionado comprado	\$35700	\$730275
Reemplazo por Bevacizumab fraccionado en la Farmacia del Hospital	\$8116	\$757859

De estos datos se deduce el gran ahorro económico que supone el uso de BVZ vs RNZ en el tratamiento de la DMAE [17].

Por su parte, J.L. García López analizó la relación coste-efectividad del uso de BVZ, fotemustina y temozolomida en pauta extendida en los pacientes con GBM en progresión o recidivado tras el tratamiento estándar, frente a la práctica clínica habitual [8]. Los costes se obtuvieron de los recursos consumidos en un hospital universitario del Sistema Nacional de Salud de España, siendo la razón coste-efectividad del uso de BVZ tras un tratamiento, de 15.122,49 € al año con buena calidad de vida y libre de progresión 6 meses [18].

→ Costes asociados al tratamiento del cáncer colorrectal metastático (CCRM) con Bevacizumab

El cáncer colorrectal (CCR) aparece por una serie de mutaciones acumuladas en genes específicos: genes supresores tumorales, oncogenes y genes reparadores del ADN. Las manifestaciones clínicas del CCR se relacionan con el tamaño y la localización, de forma que el CCR se puede entender como un grupo de enfermedades distintas más que una enfermedad homogénea, ya que el colon se puede dividir en dos lados, izquierdo y derecho, con la flexión esplénica como límite. Varias evidencias clínicas sugieren que el cáncer de colon (CC) del lado izquierdo difiere significativamente del CC del lado derecho en términos de factores de riesgo, grado histológico, tamaño tumoral y características metastásicas, de forma que apoyan la respuesta de los CC del lado derecho y del lado izquierdo de manera diferente a la quimioterapia paliativa [19].

Entre los signos y síntomas del CCR se pueden citar: sangre en la materia fecal o cambios en los hábitos intestinales, diarrea, estreñimiento o sensación de que el intestino no se vacía completamente, heces más delgadas de lo normal, dolor frecuente ocasionado por gases, distensión abdominal, sensación de llenura o cólicos, pérdida de peso sin razón conocida, sensación de mucho cansancio y vómitos entre otros.

Anexo II

El adenocarcinoma del colon con frecuencia invade los órganos adyacentes, se propaga intraperitonealmente y se metastatiza a los ganglios linfáticos intestinales, a los pulmones y al hígado [20], siendo este último el lugar más frecuente a la hora de localizarse las metástasis de este cáncer. Un 15 % de los pacientes con CCR presenta metástasis hepáticas sincrónicas y hasta un 50 % metástasis hepáticas metacrónicas [21]. Otros sitios menos frecuentes de metástasis del CCR son las glándulas adrenales, los ovarios y los huesos, siendo raras las metástasis al sistema nervioso central. Los cánceres rectales tienen una alta recurrencia local en los pulmones.

La colonoscopia es el examen de elección para el diagnóstico, cuya confirmación se hace mediante biopsia. El tratamiento puede consistir en cirugía, radiación, quimioterapia, terapia biológica entre la que se encuentra el uso de Avastin[®], o una combinación de estas técnicas. Sin embargo, la falta de eficacia del tratamiento sigue siendo un problema importante en el CCRm, en parte debido a la falta de marcadores predictivos [22].

El CCR es el segundo cáncer más frecuente en el mundo occidental y afecta a 550.000 hombres y 470.000 mujeres. En hombres, es el tercer cáncer más frecuente, tras los de pulmón y de próstata, y su incidencia es mayor entre los 50 y los 65 años. En las mujeres ocupa el segundo lugar tras el cáncer de mama [23]. Sólo el 3 % de los CCR ocurre en personas menores de 40 años. El mayor aumento se produce durante la quinta década [24].

En España, es el cáncer más común, con una tasa de incidencia de 33,1 nuevos casos por cada 100.000 habitantes por año (con un incremento anual del 2,6 %) [23] En el año 2014 fue el segundo tipo de cáncer que más muertes provocó en España (15.449) [25]. Aún así, la mortalidad e incidencia en nuestro país son sustancialmente menores que la de los países del norte de Europa, estando nuestras tasas por debajo de las tasas promedio de Europa, pero con una mortalidad ya superior a la de Francia, Italia y Reino Unido y una tendencia temporal de incremento [26].

Además, se estima que en 2035 se diagnosticarán en el mundo 2,5 millones de casos al año, frente a los 1,4 millones al año actuales. La principal causa de muerte por CCR se debe a la diseminación metastásica de la enfermedad. Se estima que la tasa de supervivencia relativa a 5 años es aproximadamente del 90 % en estadios tempranos de la enfermedad (estadio I), pero disminuye a un 11 % en caso de presentar lesiones metastásicas (estadio IV). Se calcula que aproximadamente el 50 % de los pacientes recientemente diagnosticados progresarán hacia el cáncer metastásico, siendo el promedio de supervivencia a 5 años de estos pacientes del 64,9 %. Se pronostica que el número de supervivientes aumentará de manera constante en los próximos años [23], en parte como resultado de la introducción de nuevos agentes quimioterapéuticos y biológicos efectivos como el BVZ, CTX y panitumumab (PNT) [22]. Sin embargo, la tasa de supervivencia de pacientes con CCR varía ampliamente aun entre los que tienen un tumor con las mismas características histológicas. Este hecho indica que el desarrollo tumoral no solo está determinado por el bagaje genético del paciente, sino también por el impacto de factores ambientales sobre el desarrollo tumoral. Dentro de estos factores, destacan los nutricionales. Por ejemplo, en España la mortalidad por CCR es más elevada en poblaciones de Cataluña y en la provincia de León, donde se come más embutido que en otras regiones de España [23].

El coste que supone el tratamiento del CCRm con terapia biológica está siendo ampliamente estudiado, ya que esta terapia es empleada cada vez con mayor frecuencia y su elevado coste es un parámetro a tener en cuenta a la hora de hacer frente a la enfermedad mediante la administración de este tipo de medicamentos.

Así, en un estudio realizado por F. Gutiérrez *et al*, fue evaluada la seguridad y coste de BVZ en 9 pacientes con CCRm con una edad media de 64,1 años (44-77), un peso medio de 89,9 kg (55-116) y una superficie corporal de 1,89 m² (1,55-2,29), tratados con BVZ (5 mg/kg cada 2 semanas) y con una media de 14 ciclos recibidos, obteniendo como resultado que el tratamiento supuso un coste medio por ciclo de 1.338,50 € [27].

Anexo II

Por su parte, T. Shih *et al.* estimaron que el coste típico de un año de tratamiento con BVZ para CCR es mayor de 50.000 \$. En un paciente con CCRm que pesa 80 kg y recibe una dosis de 5 mg/kg cada 2 semanas durante una duración media de 40,4 semanas, el coste sería de entre 42.800 \$ (2.140 \$ por vial de 400 mg) - 55.000 \$ (2.750 \$ por 400 mg vial), dependiendo del contrato de compra para el fármaco. Dada una estimación de 30.000 - 40.000 pacientes con CCRm en los EE.UU. cada año, que son candidatos para la terapia con BVZ (excluyendo usos no marcados para otros tumores malignos), el impacto fiscal de la aprobación de la FDA podría ser mayor a 1.500 millones de dólares por año [28].

2. POSIBLES MEDIDAS DE AHORRO

Los estudios descritos anteriormente demuestran el elevado coste que supone el tratamiento con BVZ, sea tratamiento de primera o segunda línea o incluso fuera de las indicaciones autorizadas. Este hecho lleva a la necesidad de realizar estudios e investigaciones enfocadas hacia la reducción del gasto sanitario que supone este tipo de terapia.

La adopción tanto de medidas como de protocolos de actuación, puede contribuir a la reducción de este gasto. Así, por ejemplo, la creación de protocolos de uso actualizados, la monitorización del fármaco, el empleo de terapias alternativas e igual de eficaces que supongan un menor coste que el uso de BVZ y la realización de estudios de la estabilidad del fármaco, en cuanto a actividad biológica se refiere, una vez administrado o en su formulación original, esto es, Avastin[®], previa administración, son posibles medidas de ahorro que darían lugar a una disminución del gasto sanitario originado por el empleo de este mAb.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] García-Altés A. Bevacizumab o cuando la vida te da limones. *Gestión Clínica y Sanitaria*. Junio 2011. <http://gcs-gestion-clinica-y-sanitaria.blogspot.com>.
- [2] Ananya Mandal. Precio de Avastin (Bevacizumab). *News medical. Life sciences and medicine*. Apr 2, 2014 [http://www.news-medical.net/health/Avastin-\(Bevacizumab\)-Price-\(Spanish\).aspx](http://www.news-medical.net/health/Avastin-(Bevacizumab)-Price-(Spanish).aspx)
- [3] Ferry A.L.M. Eskens and Sleijfer S. The use of bevacizumab in colorectal, lung, breast, renal and ovarian cancer: Where does it fit?. *European Journal of Cancer* 44, 16 (2008) 2350–2356.
- [4]. Pfizer. Informe Global del Cáncer de Mama Metastásico I Reporte de una Década 2005 – 2015. 2015.
- [5] García Pérez L. *et al.* Seguridad, efectividad, coste-efectividad e impacto presupuestario de Bevacizumab (Avastin®) para el cáncer de mama metastático. *Informe de evaluación de tecnologías sanitarias elaborado por el Servicio de Evaluación y Planificación a petición de la Dirección General de Farmacia del Servicio Canario de la Salud y de la Dirección Médica del Hospital Universitario Insular de Gran Canaria*. 12 de marzo de 2009. Disponible en <http://www.nice.org.uk/nicemedia/pdf/TA147Advice.pdf>.
- [6] Bautista J. *et al.* Bevacizumab en cáncer de mama metastático. Informe para el Comité de Actualización de la Guía Farmacoterapéutica de Hospitales de Andalucía. Informe de evaluación. *Guía Farmacoterapéutica de Hospitales de Andalucía*. Junio-2008.
- [7] Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). Cáncer de ovario. Marzo 2011.
- [8]. Galceran J. *et al.* Estimaciones de la incidencia y la supervivencia del cáncer en España y su situación en Europa. *Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN)*. Octubre 2014.
- [9] González Macías M.P. *et al.* Bevacizumab en cáncer de ovario. Informe para la Guía Farmacoterapéutica de Hospitales de Andalucía. *Guía Farmacoterapéutica de Hospitales de Andalucía.- Informe Génesis v.3.0- Octubre-2012*.
- [10] Berber P. *et al.* An Eye on Age-Related Macular Degeneration: The Role of MicroRNAs in Disease Pathology. *Mol Diagn Ther*. 2017; 21(1): 31–43.

Anexo II

- [11]. Damián J. *et al.* Epidemiología de la degeneración macular asociada con la edad. Situación en España. *Aten Primaria*. 2006; 38(1):51-7.
- [12]. Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). Tumores del Sistema Nervioso Central. Abril 2011.
- [13]. Muñoz Carmona M. *et al.* Nuevas perspectivas en el tratamiento paliativo del glioblastoma multiforme y astrocitoma anaplásico recidivado con implantes de carmustina. *Oncología (Barc.)*. Vol.28 N°.5may.2005
- [14] Keunen O. *et al.* Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 1; 108(9): 3749–3754.
- [15]. Lucio-Eterovic AK *et al.* Mediators of glioblastoma resistance and invasion during antivascular endothelial growth factor therapy. *Clin Cancer Res*.2009 Jul 15; 15(14):4589-99.
- [16] Robles Irizarry L. *et al.* Therapeutic targeting of VEGF in the treatment of glioblastoma. *Expert Opin Ther Targets*.2012 Oct;16(10):973-84.
- [17] Rosendi E. Bevacizumab (Avastin) Concentrado para solución para infusión. Uso en oftalmología. *Comité de Farmacia y Terapéutica del hospital El Cruce, Alta Complejidad en Red. Ministerio de Salud. Buenos Aires. Junio 2010.* www.hospitalelcruce.org.
- [18] Garcia Lopez, J.L. Tesis Doctoral: Análisis de coste-efectividad de Bevacizumab, Fotemustina y Temozolomida en pauta extendida en pacientes con glioblastoma recurrente. *Departamento de Medicina. Universidad de Alcalá. 05.03.2014.*
- [19] Wen-Zhuo He *et al.* Primary Tumor Location as a Predictive Factor for First-line Bevacizumab Effectiveness in Metastatic Colorectal Cancer Patients. *J Cancer*. 2017; 8(3): 388–394.
- [20] Knowles K.J.*et al.* Metastatic Colonic Adenocarcinoma to the Extrahepatic Common Bile Duct: The Critical Role of the Pathologist and Immunohistochemistry in Guiding Patient Care Decisions. *Am J Case Rep*.2017 Mar 14; 18:263-266.
- [21]. González Fernández M. Trabajo Fin de Grado: Estado actual de la cirugía en metástasis hepáticas de cáncer colorrectal. *Facultad de Medicina y Odontología. Universidad País Vasco, España. Marzo 2016.*

- [22]. Boisen MK *et al.* Primary tumor location and bevacizumab effectiveness in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2013 Oct;24(10):2554-9.
- [23]. Escudero Paniagua B. Revisión Biomarcadores de pronóstico modificables nutricionalmente en el paciente con cáncer colorrectal tras el diagnóstico de la enfermedad. *Nutr Hosp* 2017; 34 (1):235-243.
- [24]. Galiano de Sánchez M.T. Cáncer Colorrectal (CCR). *Rev. Colombiana de Gastroenterología / 20 (1) 2005; 43-53.*
- [25]. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Informe epidemiológico de la enfermedad en España. Las Cifras del Cáncer en España. Enero 2017.
- [26]. Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer, Centro Nacional de Epidemiología Instituto de Salud Carlos III. La situación del cáncer en España. ISBN: 84-7670-673-1.
- [27] Gutierrez F. *et al.* Utilización del Cetuximab y Bevacizumab en cáncer colorrectal metastático. Servicio Canario de la Salud. *Congreso Nacional de Oncología Médica y Farmacia Oncológica. Toledo 28-30 Noviembre 2013.*
- [28] Shih T. *et al.* New Drug Bevacizumab: An Angiogenesis Inhibitor for the Treatment of Solid Malignancies. *Clinical Therapeutics. Volume 28. Number 11, 2006.*



ANEXO III

COSTES ASOCIADOS AL
TRATAMIENTO CON
CETUXIMAB (ERBITUX®)

1. COSTES ASOCIADOS AL TRATAMIENTO CON CETUXIMAB

Desde su aprobación en 2004, CTX está indicado en España, en combinación con irinotecan, para el tratamiento de pacientes con CCRm, con expresión del EGFR después del fracaso de un tratamiento citotóxico que haya incluido irinotecan [1] y desde 2006 en el tratamiento de pacientes con cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC), administrado por vía intravenosa solo o combinado con otros tipos de terapias (quimiorradioterapia entre otros) [2] [3].

Actualmente, se cuestiona la correlación lineal entre el grado de expresión del EGFR y la respuesta a CTX, ya que son varios los autores que han descrito respuesta en pacientes con EGFR negativo [4-6]. A pesar de que CTX muestra actividad clínica relevante en el tratamiento de pacientes con CCR resistente a la quimioterapia [7-9], recientemente, los datos de un creciente número de estudios sugieren que la respuesta a CTX parece limitarse a pacientes con CCRm portadores de tumores con KRAS no mutado [10-12], pero los resultados aun no son concluyentes [13-16]. Incluso en pacientes con tumores KRAS de tipo salvaje se observa variabilidad en la respuesta a CTX [17].

El coste elevado que supone el tratamiento con CTX, hace necesaria la realización continua de análisis coste-efectividad del mismo, siendo numerosos los artículos publicados en referencia a esto.

A continuación quedan descritos algunos de los estudios realizados en base al coste originado por los tratamientos con CTX en las diferentes patologías para las cuales está indicado y que reflejan el gasto sanitario al que da lugar el empleo de este FBIO.

Anexo III

→ *Costes asociados al tratamiento del cáncer colorrectal metastásico (CCRm) con Cetuximab*

Tal y como quedó descrito en el Anexo anterior (Anexo II) de la presente Tesis Doctoral, el CCR es un tipo de malignización de evolución lenta, hasta diez años, con un importante componente de riesgo genético y que suele aparecer a partir de la quinta década de vida [18].

Es una de las causas más comunes de muerte por cáncer en el mundo occidental, ocupando el segundo lugar en Europa y tercero en los EE.UU. [17] [19]. Tras el cáncer de pulmón, es la segunda causa de mortalidad por cáncer en España, con más de 9.000 muertes en el año 2002 [18] y 14.238 en el año 2009 [20].

La incidencia de la enfermedad está experimentando un incremento en los últimos 30 años, estimado en un 3 % anual siendo más importante en el caso de los varones. En España se diagnostican anualmente 19.000 nuevos casos de CCR y, si se consideran ambos sexos, ocupa el primer lugar en incidencia [3]. La esperanza de vida en la fase metastásica de la enfermedad es de 6 a 9 meses [18]. Sin embargo, la supervivencia en nuestro país es ligeramente superior a la media europea, que se sitúa en torno al 50 % a los 5 años después del diagnóstico [20], y menor a la de Italia, Francia o Reino Unido [3] [21] [22].

En términos generales, la cirugía con o sin tratamiento adyuvante consigue curar a la mitad de los pacientes afectados de CCR, desarrollando la otra mitad una recurrencia de la enfermedad, siendo necesario tratamiento paliativo [23].

La mediana global de supervivencia de pacientes con CCR avanzado ha aumentado de 12 meses a 18-21 meses desde la pasada década. Este incremento se ha basado fundamentalmente en la aparición de nuevos fármacos como irinotecán, oxaliplatino y fluoropirimidinas orales. Pero incluso con el avance que esto supone respecto a la quimioterapia tradicional, aún quedan limitaciones con estos tratamientos [5]. Recientemente, el descubrimiento de factores de crecimiento involucrados de forma importante en la modulación de la proliferación y diferenciación

celular, ha conducido al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer [3] como es el caso de CTX.

Los tratamientos utilizados en la actualidad contra esta enfermedad son básicamente la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, pero estas tres vías terapéuticas son sólo útiles para el 30 % de los pacientes, y además generan importantes efectos secundarios [24]. De ahí el empleo cada vez mayor de terapias biológicas entre las que se incluyen el uso de CTX. Sin embargo, el tratamiento del CCRm con CTX supone un elevado coste y gasto sanitario, ya que al tratarse de un MB su precio es más elevado y a este hay que sumar el gasto que supone la asistencia hospitalaria y las terapias coadyuvantes de las que va acompañado el tratamiento con CTX: quimioterapia y/o radioterapia entre otras.

De forma general la dosis inicial administrada de CTX (dosis de carga) es de 400 mg/m² por vía intravenosa administrada en 120 minutos y la dosis de mantenimiento semanal es de 250 mg/m² en 60 minutos. Antes de administrar irinotecán se debe esperar 1 hora. El coste de un vial de 100 mg/50 ml es de 232 €, el de la dosis de carga (1,7 mg/m²): 1.624 € y el de la dosis de mantenimiento (1,7 mg/m²): 928 €. Por lo tanto, el coste del tratamiento de CTX e irinotecan asciende a 5.460 € el primer mes y 4.764 € los meses consecutivos [25].

En la tabla 3.1 se muestra el coste que supone el tratamiento con CTX.

Tabla 3.1. Coste del tratamiento con CTX. Fuente: [25]

	CTX vial de 100 mg. Paciente superficie corporal 1,7 m ²	Análisis de sensibilidad	
		+ 1 vial	- 1 vial
Precio unitario (PVL+IVA)*	204,60 €		
Posología 1ª dosis 400 mg/m ²	680 mg (7 viales) = 1.432,20 €	1.636,80 €	1.227,60 €
Posología dosis consecutivas 200 mg/m ² /semana	425 mg (5 viales) = 1.023,00 €	1.227,60 €	818,40 €
Coste tratamiento 8 semana (1+7)	8.593,20 €	10.014,30 €	6.956,40 €
Costes asociados (8 sesiones HD)**	195,26 €/sesión * 8 sesiones	=	=
Coste global (= coste incremental) o coste global tratamiento/año	8.593,20 € (+ 1562 €)	10.014,30 € (+ 1562 €)	6.956,40 € (+1562 €)
* Se calcula para 8 semanas de tratamiento			
** No se consideran los costes asociados (antihistamínico) por no ser relevantes			

Anexo III

Si se tratasen 10 pacientes durante un año con CTX asociado a radioterapia, el coste incremental por paciente sería 8.593,20 €, siendo el impacto económico anual 85.932 €.

En la tabla 3.2 queda descrito el coste que suponía el tratamiento con CTX durante el año 2010.

Tabla 3.2. Coste del tratamiento con CTX. Año 2010.

Fuente: adaptada de [26]

CTX 20 ml (5 mg/ml)	
PVL de un vial de 20 ml	192,3 €
Posología	400 mg/m ² la 1 ^a semana y 250 mg/m ² cada semana sucesiva
Paciente	70 Kg peso, 1,75 m altura, superficie corporal 1,8 m ²
Coste de 8 semanas de tratamiento	7.442,01 €

Son varios los estudios coste-efectividad de CTX desarrollados, que demuestran el elevado coste que supone el tratamiento con el mismo. De forma general, estos estudios se realizan comparando el coste-efectividad de CTX frente al coste-efectividad de otro medicamento que actúa de forma similar o contra la misma patología (p.ej. panitumumab -PNT-), así como la comparación coste-efectividad de tratamientos en los que se incluye CTX con diferentes tipos de coadyuvantes (irinotecán, 5-fluorouracilo, otros) [27].

Así lo demuestra un modelo de coste-efectividad desarrollado por Merck, para comparar el tratamiento habitual del CCRm con el tratamiento de CTX más irinotecán. El resultado obtenido, expresado como coste por año de vida ganado, se estimó en 33.000 £ (49.734 €) y 34.000 £ (51.241 €) por AVAC (año de vida ajustado por calidad), con un incremento de la esperanza de vida estimada en 0,89 años (10,7 meses) frente a los 5,6 meses de la terapia habitual. Los costes de los tratamientos con CTX ascendieron a 16.995 £ (25.613,01 €), de ellas 8.924 £ (13.449,28 €) atribuibles a CTX, frente a las 3.144 £ (4.738,29 €) de la terapia habitual. Tras calcular el coste incremental por año de vida ganado, el resultado fue

de 32.752 £ (49.360,25 €). Estimando un valor de utilidad de 0,95 para la expectativa de vida y los costes asociados, el coste por AVAC se situaría en 34.454 £ (51.925,32 €). Los costes por paciente medio podrían estimarse en 580 £ (874,11 €) en un estudio realizado en el Reino Unido. En el estudio Bond, los pacientes recibieron un total de 12 dosis, con un coste total por CTX de 8.924 £ (13.449,28 €) y 2.724 £ (4.105,32 €) de irinotecán, pero se dejaron de utilizar 1.654 £ (2.492,73 €) correspondientes a otros fármacos quimioterápicos. En una estimación de costes realizada por el Hospital Txagorritxu (España), se estimó el coste del primer mes de tratamiento en 5.468 € y el coste de los meses posteriores en 5.060 € (sin considerar sueros ni medicación coadyuvante) por paciente [18].

El tratamiento de CTX en combinación con irinotecán (180 mg/m² administrado cada dos semanas) se comparó también con PNT+FOLFIRI. El coste medio estimado del tratamiento de CTX+irinotecán en segunda línea fue de 22.281 €, lo que supone un mayor coste de 3.932 € en comparación con PNT+FOLFIRI [28] [29].

Otro de los estudios coste-efectividad realizados en base a CTX [30], indica que la asociación CTX más FOLOFOX o FOLFIRI, sería coste-efectiva suponiendo un descuento del 16 % del coste en los siguientes casos: A) El tumor colorrectal primario ha sido extirpado o es potencialmente operable. B) La enfermedad metastásica se limita al hígado y es resecable. C) El paciente está en buen estado general para someterse a una cirugía para extirpar el tumor colorrectal primario y para someterse a la cirugía del hígado si la metástasis es resecable después del tratamiento con CTX. D) Se utiliza FOLFOX excepto que el paciente no pueda tolerarlo o tenga contraindicaciones para el oxaliplatino, caso en que se usará FOLFIRI. E) La duración del tratamiento con CTX se limita a 16 semanas [30].

Además, la evidencia científica indica similar eficacia y tolerancia de los Abs anti-EGFR PNT (Vectibix®) (Ab completamente humano) y CTX. Así, un estudio comparativo sobre el coste económico del tratamiento del CCRm en primera y segunda línea de tratamiento en pacientes con CCRm y KRAS nativo con PNT y CTX, ambos en combinación con los

Anexo III

regímenes habituales de quimioterapia (QT), según las correspondientes indicaciones y considerando los costes médicos directos (farmacológicos, administración y manejo del paciente), dio como resultado que el coste del tratamiento con PNT+FOLFOX4 en primera línea (26.074 €) fue menor que el de CTX+FOLFOX4/FOLFIRI (31.496 € [17,2 %] y 27.767 € [6,1 %], respectivamente), y en segunda línea, PNT+FOLFIRI también produjo menor coste (18.349 €) en comparación con CTX+FOLFOX4/FOLFIRI (25.926 € [29,2 %] y 22.875 € [19,8 %], respectivamente). Analizando únicamente el coste de los Abs, PNT representaría un ahorro de 1.847 € (9,9 %) y de 1.601 € (10,4 %) en primera y segunda línea respectivamente, comparado con CTX. Por tanto, la combinación de PNT/QT supondría un ahorro para el Sistema Público de Salud en comparación con CTX/QT, tanto en primera como en segunda línea, en pacientes con CCRm KRAS nativo [30].

Las tablas 3.3 y 3.4 muestran los resultados de la minimización de costes farmacológicos de PNT, CTX, QT y otros costes del manejo de pacientes en primera y segunda línea de tratamiento [29].

Tabla 3.3. Resultados de minimización de costes en primera línea.

Fuente: [29]

Coste total del tratamiento	PMab+FOLFOX4 ^a	CMab+FOLFIRI ^b	PMab+FOLFOX4 vs CMab+FOLFIRI	CMab+FOLFOX4 ^b	PMab+FOLFOX4 vs CMab+FOLFOX4
Coste farmacológico anti-EGFR ^c	16.885 €	18.732 €	-1.847 € (-10%)	18.732 €	-1.847 € (-10%)
Coste farmacológico quimioterapia	2.878 €	1.521 €	1.356 € (89%)	2.878 €	0 € (0%)
Coste administración	4.744 €	4.744 €	0 € (0%)	7.116 €	-2.372 € (-33%)
Otros costes de manejo ^d	1.567 €	2.770 €	-1.203 € (-43%)	2.770 €	-1.203 € (-43%)
Costes totales	26.074 €	27.767 €	-1.693 € (-6%)	31.496 €	-5.422 € (-17%)

^a PMab: Panitumumab: 11 administraciones en 1ª línea

^b CMab: Cetuximab: 22 administraciones en 1ª línea

^c Anti-EGFR: Anticuerpos monoclonales inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico

^d Incluye visita, análisis sanguíneo y determinación de KRAS

Tabla 3.4. Resultados de minimización de costes en segunda línea.

Fuente: [29]

Coste total del tratamiento	PMab+FOLFIRI ^a	CMab+FOLFIRI ^b	PMab+FOLFIRI vs CMab+FOLFIRI	CMab+FOLFOX4 ^b	PMab+FOLFIRI vs CMab+FOLFOX4
Coste farmacológico anti-EGFR ^c	13.815 €	15.416 €	-1.601 € (-10%)	15.416 €	-1.601 € (-10%)
Coste farmacológico quimioterapia	1.245 €	1.245 €	0 € (0%)	2.354 €	-1.110 € (-47%)
Coste administración	1.941 €	3.882 €	-1.941 € (-50%)	5.823 €	-3.882 € (-67%)
Otros costes de manejo ^d	1.348 €	2.332 €	-984 € (-42%)	2.332 €	-984 € (-42%)
Costes totales	18.349 €	22.875 €	-4.526 € (-20%)	25.926 €	-7.577 € (-29%)

^a PMab: Panitumumab: 9 administraciones en 2ª línea

^b CMab: Cetuximab: 18 administraciones en 2ª línea

^c Anti-EGFR: Anticuerpos monoclonales inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico

^d Incluye visita, análisis sanguíneo y determinación de KRAS

Existen más estudios coste-efectividad en los que se compara el tratamiento en primera línea de CTX y PNT, cada uno de ellos basado en datos de eficacia derivados de estudios con características, objetivos, diseño y poblaciones muy diferentes [29] [31-33].

Sin embargo, los resultados obtenidos de todos ellos son comunes, obteniendo datos coste-efectividad menores para el tratamiento del CCRm con el empleo de PNT que con el empleo de CTX y siendo el coste (precios del año 2013) por ciclo del tratamiento con PNT, de unos 1.476 € (sin IVA) y 1.535 € (con IVA) y para CTX, el coste del ciclo inicial es de 1.276 € (sin IVA) y 1.326 € (con IVA) y el coste de ciclos posteriores es 797 € (sin IVA) y 829 € (con IVA). El coste de tratamiento farmacológico completo para PNT es 16.239 € (sin IVA) y 16.885 € (con IVA) y para CTX es 18.023 € (sin IVA) y 18.732 € (con IVA) [33].

CTX es la terapia biológica que optimiza la supervivencia global y minimiza el coste por año de vida ganado (AVG) en tratamientos de primera línea para pacientes con CCRm RAS Wild Type (WT), con un ratio inferior al umbral habitual de 30.000 €/AVG (27.215 €/AVG). Estos resultados están en línea con las recientes decisiones del National Cancer

Anexo III

Drugs Fund sobre terapias biológicas en CCRm (NHS, enero y marzo 2015) [34].

Por su parte, el Servicio de Farmacia, Complejo Hospitalario Jaén, España, también realizó un estudio de indicación-prescripción de CTX en CCRm para todos los pacientes tratados con CTX en CCR en el período 2004-2007 en su hospital. Determinaron el número de prescripciones que no se ajusta a la ficha técnica aprobada para CTX en CCRm y el motivo por el que no se adapta. Se recogieron los datos de 74 pacientes tratados con CTX. El coste medio por paciente fue de 14.399 €, lo que supuso un consumo de CTX de 1.065.526 € en todo el período. El consumo anual de CTX pasó de 62.850 € durante 2004 a 467.484 € en 2007 (enero a octubre). El número total de dosis administradas fue de 1.130, con una media por paciente de 15,3 (1-68), y una mediana de 10. La dosis media de inicio fue 710 mg y la de mantenimiento de 446 mg. La duración media de los tratamientos fue 15,4 semanas. El 70,3 % de las prescripciones no se ajustaba a la ficha técnica, de forma que la utilización de CTX en condiciones distintas a las aprobadas en ficha técnica, origina un aumento en el número de pacientes tratados y una mayor duración de los tratamientos, lo que implica un aumento en el consumo y en el coste que supone este tipo de tratamientos. Por tanto, y debido al impacto económico que representa la introducción de esta terapia para CCRm, J.F. Marín Pozo *et al.* indican que se debería determinar qué pacientes son los que verdaderamente se benefician de la terapia con CTX [35].

→ *Costes asociados al tratamiento del cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC) con Cetuximab*

El cáncer de cabeza y cuello (CCC) es un cáncer que surge en la cabeza o en la región del cuello. Por lo tanto, incluye numerosas localizaciones anatómicas con múltiples sublocalizaciones, lo que conlleva diferentes comportamientos clínicos y resultados [36].

El tipo de CCC más común es el carcinoma de células escamosas, que aparece en las células que revisten el interior de la nariz, la boca y la garganta [37].

Representan aproximadamente el 5 % de todos los cánceres. El 90 % son carcinomas de células escamosas. Aunque el pronóstico depende de múltiples factores, se puede generalizar que la tasa de supervivencia a 1 año es del 75 % y del 42 % a los 5 años.

Entre sus características generales están la ausencia de un diagnóstico temprano, muchos de ellos se presentan en fases avanzadas y con síntomas parecidos a enfermedades comunes que pueden retrasar el diagnóstico definitivo., la ausencia de un screening eficaz, la tendencia a la recaída local más que a dar metástasis a distancia, y el poder afectar a una o varias funciones importantes e incluso vitales, como son la deglución, la respiración y el habla. La clínica es muy variada y depende de la localización [36].

Los tres tipos principales de tratamiento para manejar el CCC son la radioterapia (RT), la cirugía y la quimioterapia (QT). Los tratamientos primarios son radioterapia, cirugía, o una combinación de ambas. En tumores de mayor volumen, suele ser necesario el empleo combinado de ambas modalidades [36]. La QT se usa a menudo como tratamiento adicional o coadyuvante. La combinación óptima de las tres modalidades de tratamiento para un paciente con CCC depende del sitio y el estadio de la enfermedad [37]. Los estudios recientes indican que la QT administrada al mismo tiempo que la RT es más eficaz que si se da antes de la RT. Por lo tanto, el programa de RT a veces incluye QT si el cáncer está avanzado (estadios avanzados III o IV). Los medicamentos que a menudo se dan junto con la RT son cisplatino (Platinol) y CTX. A veces, otros medicamentos pueden incluir fluorouracilo (5-FU, Adrucil), carboplatino (Paraplatin) y paclitaxel (Taxol) [37].

CTX asociado a RT ha demostrado mayor eficacia para el tratamiento del CCECC que la RT sola en pacientes en estadio avanzado. Considerando que el coste de 1 vial de CTX 2 mg/ 50 ml es 199,9 €, el coste incremental

Anexo III

por paciente respecto al tratamiento estándar con cisplatino es de 16.787 € y de 8.600 € respecto a RT [38].

Según los datos de eficacia del ensayo y el coste del tratamiento, por cada paciente adicional que obtiene un control locorregional de la enfermedad a los tres años, el coste adicional estimado sobre haber empleado RT, es de 68.800 €. Seleccionando los pacientes con cáncer de orofaringe, el coste/beneficio sería mucho más favorable. Con un coste incremental de 8.600 €/paciente se conseguiría un aumento de la mediana de supervivencia de al menos tres años. Estimando que durante un año podrían llegar a ser tratados un total de 5-10 pacientes con CTX, el coste anual adicional para el hospital sería de 43.000 a 86.000 € [38].

El coste tratamiento/día y coste del tratamiento completo con CTX, así como el coste incremental y la comparación con la terapia de referencia o alternativa a dosis usuales, queda mostrado en la tabla 3.5.

Tabla 3.5. Coste tratamiento / día y coste del tratamiento completo. Coste incremental. Comparación con la terapia de referencia o alternativa a dosis usuales. Fuente: [38]

COMPARACIÓN DE COSTES DEL TRATAMIENTO EVALUADO FRENTE A OTRA/S ALTERNATIVAS				
	Tratamientos			
	CTX+RT	Cisplatino	Cisplatino+ 5 FU	RT
Posología	400 mg/m ² + 250 mg/m ² y RT c/7d	100 mg/m ² d1	CP 100 mg/m ² d1 + 5FU 1000 mg/m ² d1:5, c/21d	---
Coste tratamiento completo (8 semanas)	8.600 € + coste RT	12,60 €	200 €	8.200 €
Coste incremental (diferencial)	8.600 € + coste RT	8.587 € + coste de RT	8.400 € + coste de RT	8.600

2. POSIBLES MEDIDAS DE AHORRO

A partir de los estudios descritos anteriormente, se puede afirmar que el tratamiento con CTX, tanto en CCRm como en CCECC, supone un elevado gasto sanitario, el cual podría ser reducido mediante:

- Realización de estudios que indiquen qué pacientes se van a beneficiar realmente del tratamiento con el mismo.
- Control de las prescripciones para indicaciones no autorizadas de CTX.
- Uso de PNT en lugar de CTX en los casos en que su empleo haya demostrado un menor coste.
- Uso de nuevas formulaciones de CTX: conjugados.
- Realización de estudios de estabilidad de CTX conservado bajo diferentes condiciones con objeto de determinar su vida media útil.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] European Medicines Agency. Informe EPAR de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA). 30 de Octubre de 2006. Disponible en: <http://www.emea.eu.int/humandocs/Humans/EPAR/erbitux/erbitux.htm>
- [2] Agencia Europea de Medicamentos (EMA). Ficha técnica de Erbitux® (Cetuximab). <http://www.ema.europa.eu>
- [3] Huertas Fernández M.J. *et al.* Tratamiento con cetuximab en pacientes con cáncer colorrectal metastásico que no expresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico. *Farmacia Hospitalaria*. 2007; Vol. 31. N.º 5, pp. 264-269.
- [4] Scartozzi M. *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) status in primary colorectal tumors does not correlate with EGFR expression in related metastatic sites: implications for treatment with EGFR- Targeted monoclonal antibodies. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4772-8.
- [5] Vallböhmer D. *et al.* Molecular determinants of cetuximab efficacy. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3536-44.
- [6] Chung K.Y. *et al.* Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1803-10.
- [7] Saltz L.B. *et al.* Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1201-8.
- [8] Cunningham D. *et al.* Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351:337-45.
- [9] Lenz H.J. *et al.* Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. *J Clin Oncol* 2006; 24:4914-21.
- [10] Hernandez Losa J. *et al.* Recomendaciones para la determinación de mutaciones de KRAS en cáncer de colon. *Rev. Esp. Patol.* 2012; 45 (2): 76-85.
- [11] Shawn F. Bairstow and Sarah E. Lee. Assays for Assessing the Compatibility of Therapeutic Proteins with Flexible Drug Containers, Trends in Immunolabelled and Related Techniques. *Baxter Healthcare Corporation, USA.* (2012).

- [12] Roa I. *et al.* KRAS gen mutation in colorectal cancer. *Rev. Med. Chile. Vol. 141 n° 9. Santiago set. 2013.*
- [13] Lievre A. *et al.* KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res 2006; 66:3992–5.*
- [14] Benvenuti S. *et al.* Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to antiepidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res 2007; 67:2643–8.*
- [15] Di Fiore F. *et al.* Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer 2007; 96:1166–9.*
- [16] De Roock W. *et al.* KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol 2008; 19:508–15.*
- [17] Azzopardi N. *et al.* Cetuximab Pharmacokinetics Influences Progression-Free Survival of Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Clinical Cancer Research. 2011; 17:6329-6337.*
- [18] Carnero Gómez R. Impacto del tratamiento del cáncer colorrectal metastásico con Erbitux (Cetuximab). *Rev Esp Econ Salud 2005; 4(3):179-182.*
- [19] Jemal A. *et al.* Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin 2005; 55:10–30.*
- [20] López Bastida J. *et al.* Análisis coste-efectividad del cribado del cáncer colorrectal en la población general. Universidad Castilla La Mancha. OCDE, París. Hospital Universitario de Canarias. Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud.
- [21] Coleman M.P. *et al.* and the EUROCARE Working Group. The EUROCARE-3 study: Cancer survival in Europe at the end of the 20th century Group. *Ann Oncol 2003; 14: 128-49.*
- [22] Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer, Centro Nacional de Epidemiología Instituto de Salud Carlos III. La situación del cáncer en España. ISBN: 84-7670-673-1.
- [23] Viñes J.J. *et al.* Epidemiología clínica del cáncer colorrectal: la detección precoz. *Cir Esp 2003; 73: 2-8.*

Anexo III

[24] Carretero Colomer M. Cetuximab. Inhibidor del crecimiento del cáncer colorrectal. *Offarm*. Vol 24 Núm 6 Junio 2005.

[25] Comisión de Farmacia y Terapéutica. Informe de inclusión de medicamentos en la guía farmacoterapéutica. *Centro de Información de medicamentos. Servicio Solicitante (facultativo): Servicio de Oncología Médica. Dr. Lacave. 14/04/05.*

[26] Serrano Aguilar P. *et al.* Seguridad, efectividad, coste-efectividad e impacto presupuestario de Panitumumab (VECTIBIX®) para el cáncer colorrectal metastático. *Informe de Evaluación de Tecnologías Sanitarias. Servicio de Evaluación y Planificación. Servicio Canario de la Salud y Hospital Universitario Insular de Gran Canaria. 22 de marzo de 2010.*

[27] Asseburg C. *et al.* Cost-effectiveness of targeted therapy with cetuximab in patients with K-ras wild-type colorectal cancer presenting with initially unresectable metastases limited to the liver in a German setting. *Clin Ther*.2011 Apr;33(4):482-97.

[28] Sobrero A.F. *et al.* EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008; 26:2311–9.

[29] Grávalos Castro C. *et al.* Estudio de minimización de costes de panitumumab frente a cetuximab en combinación con quimioterapia en primera línea y segunda línea en el cáncer colorrectal metastásico KRAS nativo en España. *Pharmacoekon Span Res Artic* (2014) 11:135–145.

[30] Meads C. *et al.* Cetuximab for the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Health Technol Assess*.2010 May;14 Suppl 1:1-8.

[31] Moreno V. *et al.* Análisis de coste-efectividad de cetuximab y panitumumab en primera línea para el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico en España. *Gac Sanit*. 2012; 26(*EspecCongr 1*):62.

[32] Belda-Iniesta C. *et al.* Análisis coste-efectividad basado en predictores de respuesta para terapias de primera línea en cáncer colorrectal metastásico en España. *Gac Sanit*. 2012; 26(*EspecCongr 1*):61.

[33] Gea S. y Gasquet J.A. Análisis coste-efectividad de panitumumab y cetuximab para el tratamiento de primera línea de cáncer colorrectal metastásico en España. *AMGEN. •1er. Congreso Nacional de Oncología Médica y Farmacia Oncológica, Toledo; 28-30 Noviembre, 2013.*

[34] Belda C. *et al.* Análisis coste-efectividad de cetuximab y panitumumab para el tratamiento de primera línea de cáncer colorrectal metastásico (CCRm) en pacientes RAS WT en España. *XXXV Jornadas de Economía de la Salud. 17-19 junio 2015.*

[35] Marín Pozo J.F. *et al.* Estudio de utilización de cetuximab en cáncer colorrectal metastásico en un hospital de tercer nivel. Servicio de Farmacia, Complejo Hospitalario Jaén, Jaén, España. *Farm Hosp. 2009; 33(2):72-9.*

[36] Sociedad Española de Oncología Radioterápica (SEOR). Grupo médico SEOR y GEORCC. Grupo de enfermería SEOR. El cáncer de Cabeza-Cuello y sus cuidados. Definición y tratamiento de radioterapia, prevención y cuidados.

[37] Tratamiento para cáncer de cabeza y cuello. 6 Páginas. Copyright© 2016, RadiologyInfo.org Repasada en May-13-2016.

[38] Cárdenas Aranzana M. *et al.* Cetuximab en cáncer de células escamosas de cabeza y cuello. Hospital Universitario Reina Sofía. Hospital “Blanca Paloma” de Huelva. Revisado por el Comité de Actualización de la Guía Farmacoterapéutica de Hospitales de Andalucía. *Informe de evaluación Fecha 19/10/06.*



ANEXO IV

COSTES ASOCIADOS AL
TRATAMIENTO CON
TRASTUZUMAB (HERCEPTIN®)

1. COSTES ASOCIADOS AL TRATAMIENTO CON TRASTUZUMAB

TTZ (Herceptin®) es un mAb IgG1 humanizado, producido por células de mamífero (ovario de hámster chino) cultivadas en suspensión y purificadas por cromatografía de afinidad y cromatografía de intercambio iónico (IEC), incluyendo inactivación viral específica y procedimientos de eliminación, que actúa contra HER-2.

La sobre-expresión de HER-2 se observa en el 20-30 % de los cánceres de mama primarios. Por tanto, y debido a su mecanismo de acción, TTZ está indicado en el tratamiento del cáncer de mama (CM), cáncer de mama metastásico de pacientes adultos HER-2 positivo (CMM HER-2 (+)), cáncer de mama precoz (CMP) y cáncer gástrico metastásico (CGM), solo o en combinación con otros agentes terapéuticos, administrado por vía intravenosa o subcutánea.

El precio en abril de 2017 de 150 mg de TTZ en Europa es de 678,53 € (PVP + IVA 4 %); 440 mg cuestan 7.000 soles en Perú (año 2016) y 2.740,78 \$ en USA (año 2016).

Dado su elevado coste, son muchos los análisis realizados con la finalidad de determinar el coste-eficacia que supone el tratamiento con este mAb, quedando descritos a continuación algunos de los estudios llevados a cabo sobre el coste-efectividad de los tratamientos con TTZ en diferentes patologías.

Anexo IV

→ ***Costes asociados al tratamiento del cáncer de mama (CM) y del cáncer de mama metastásico HER-2 positivo (CMM HER-2 (+)) con Trastuzumab***

Tal y como quedó descrito en el Anexo II de la presente Tesis Doctoral, el CM es una enfermedad en su mayoría hormono dependiente (65 %), debido al crecimiento anormal y desordenado de células del epitelio de los conductos o lobulillos mamarios y que tiene la capacidad de diseminarse.

Entre sus múltiples agentes causales se reconocen factores genéticos, familiares y conductuales. Así, cerca del 5-10 % obedece a causas genéticas y sobre un 80 % son esporádicos.

La incidencia del CM ha ido en aumento durante los últimos 30 años. Durante el año 2012 se diagnosticaron poco más de un millón y medio de nuevos casos de CM a nivel mundial, con una tasa estandarizada de 43,3 por 100 mil mujeres. Se estima que anualmente, fallecen 521.817 mujeres por esta causa, alcanzando una tasa estandarizada por edad de 12,9 por 100.000 mujeres. Sólo en EE.UU. mueren unas 43.000 personas al año debido a esta enfermedad [2]. Según género y edad, el CM puede afectar tanto a mujeres como hombres, preferentemente mayores de 15 años.

Aproximadamente el 25 % de los CM son tipo HER-2 positivo. Este tipo de CM tiende a ser más agresivo, con peor pronóstico y con mayores tasas de recaída.

A pesar de las mejoras en atención en las últimas décadas, el 45-50 % de los pacientes diagnosticados de CM desarrolla un estadio refractario o la enfermedad resistente. Conseguir una mayor supervivencia y mejor calidad de vida son los principales objetivos de los nuevos tratamientos del CM, especialmente en el CMM.

El tratamiento del CM se basa en una combinación de enfoques, incluyendo la cirugía, la radioterapia, la terapia hormonal, quimioterapia y tratamientos de apoyo. En CMM, la terapia hormonal

y la quimioterapia son los pilares del tratamiento debido a la naturaleza sistémica de la enfermedad. Sin embargo, en muchos casos, especialmente en CM avanzado, este no responde al tratamiento convencional, siendo los principales obstáculos para el éxito, la presencia o desarrollo de resistencia por parte de las células tumorales a los fármacos y la falta de tratamientos con suficiente selectividad del tumor. Varios agentes usados en quimioterapia del cáncer tienen efecto citotóxico o actividad citocida. Sin embargo, ya que no son selectivos, pueden destruir no sólo las células cancerosas, sino también los tejidos y células normales del paciente. Así, los fármacos citotóxicos convencionales parecen estar cerca de sus límites terapéuticos. Por tanto, existe una necesidad continua de encontrar nuevas terapias contra el cáncer y regímenes con mayor eficacia, así como la mejora de la tolerabilidad. Aunque las nuevas combinaciones de fármacos y la detección precoz han dado lugar a una disminución concomitante de la mortalidad en los últimos años en muchos países, es probable que se consigan mejores resultados a través de la identificación de nuevas dianas terapéuticas, mayor comprensión de la etiología molecular de la enfermedad [3] y el desarrollo de agentes antitumorales con nuevos mecanismos de acción [2]. Así, en la actualidad, el estándar de asistencia aprobado para el CM HER-2 (+) en estadios localizados es el mAb TTZ [4].

Desde su comercialización, TTZ ha sido utilizado en más de 230.000 mujeres con CM HER-2 (+) alrededor del mundo; no obstante, se ha estimado que sólo el 8 % de las candidatas lo reciben en los países en vía de desarrollo, ya que su elevado coste limita su utilización, suponiendo el coste de TTZ y su administración unos 40.000 € (32.000 £) para un año de tratamiento [5].

El coste mensual de TTZ en Brasil es de unos 4.500 \$ americanos, lo que significa un gasto de 20 millones de dólares mensuales para tratar los 20.000 nuevos casos con CM HER-2 en este país. Esto representa cerca del 9 % del dinero destinado para cubrir mensualmente el programa de alimentación de familias que viven en la pobreza absoluta (se utilizó como fuente el Instituto Nacional de Cáncer del Brasil [INCA]). En Colombia, la incidencia anual de CM es de 4.677 casos

Anexo IV

(30 casos/100.000 mujeres) y la mortalidad es de 1.905 casos (12,4 casos/100.000 mujeres). En Bogotá, el 12 % de las muertes por cáncer en mujeres cada año son atribuibles a esta enfermedad (5,6).

El CM representa un problema de salud pública, y los sistemas de seguridad social de estos países tienen importantes limitaciones para el uso de nuevas terapias. En Bogotá, en vista de que cerca del 30 % de los casos incidentes tendrán sobreexpresión del receptor HER-2, es posible esperar que anualmente se presenten 600 casos nuevos candidatos para recibir el mAb durante el escenario adyuvante, lo que representa un gasto anual de 23 millones de dólares [6].

Por tanto, el CM es una patología que puede ser muy costosa en términos financieros y en términos de calidad de vida, sobre todo cuando se llega a estadios avanzados, por ello, es importante realizar análisis coste-efectividad de los tratamientos empleados en el mismo.

Un estudio realizado en el Sistema de Salud de Perú, indica que la eficacia del tratamiento del CM medida como el porcentaje adicional de pacientes que tendrán sobrevida libre de enfermedad, es de 6,3 %. Esto equivale a decir que si anualmente se reciben 128 casos, TTZ tendrá una respuesta favorable en 103 pacientes, mientras que si no se usa TTZ, este número se reduce hasta 96 pacientes. El coste ponderado del tratamiento con TTZ durante el primer año es 112.851 \$. A partir del segundo año el coste del tratamiento se reduce considerablemente, puesto que ya no es necesario utilizar TTZ. Llevando los resultados a un tratamiento de 3 años, se obtiene que el tratamiento para un paciente que usa TTZ es de 156.703 \$ suponiendo un ahorro de 13.275 \$ con respecto a un paciente que no recibe TTZ. Por tanto, y a pesar de que en un principio el coste de este tratamiento es más elevado que si se usa terapia convencional, debe considerarse que el beneficio de este tratamiento no solo está compuesto por los ahorros financieros que supone en tratamientos a largo plazo, sino también por el beneficio de una mejor calidad de vida.

Las tablas 4.1 y 4.2 muestran el coste que supone el tratamiento con y sin TTZ a lo largo de 3 años [6] [7].

Tabla 4.1. Coste promedio unitario durante el primer año de tratamiento con y sin TTZ en Perú. Fuente: adaptada de [7]

Coste promedio unitario 1 ^{er} año tratamiento	Si usa TTZ			Si no usa TTZ		
	% (a)	Coste \$/ (b)	Total \$/ (a x b)	% (a)	Coste \$/ (b)	Total \$/ (a x b)
Paciente con SLE	80,6	108.192	87.203	74,3	-----	-----
Paciente con progresión	11,8	127.330	15.025	15,4	233.901	36.021
Paciente con progresión y muerte	7,6	139.777	10.623	10,3	235.971	24.305
			112.851			60.326

Considerando que TTZ se usa solo el primer año de tratamiento, se observa que el coste se reduce significativamente a partir del segundo año, tal y como se aprecia a continuación.

Tabla 4.2. Coste promedio unitario durante el segundo año de tratamiento con y sin TTZ en Perú. Fuente: adaptada de [7]

Coste promedio unitario 2 ^o año tratamiento	Si usa TTZ			Si no usa TTZ		
	% (a)	Coste \$/ (b)	Total \$/ (a x b)	% (a)	Coste \$/ (b)	Total \$/ (a x b)
Paciente con SLE	80,6	----	----	74,3	-----	-----
Paciente con progresión	11,8	127.330	15.025	15,4	233.901	36.021
Paciente con progresión y muerte	7,6	139.777	10.623	10,3	235.971	24.305
			25.648			60.326

Considerando que el segundo y tercer año de tratamiento generan iguales costes, se obtienen los siguientes resultados actualizados:

Anexo IV

Tabla 4.3. Coste del tratamiento durante tres años con y sin TTZ en Perú. Fuente: adaptada de [7]

Coste en dólares (\$) del tratamiento de pacientes que usan TTZ								
		1	2		3		Total	
Costes	\$	112.851	\$	25.648	\$	25.648	\$	164.147
Tasa de descuento anual 3,23 %		1.0323		1.0656		1.1001		
Valor actual	\$	109.320	\$	24.068	\$	23.315	\$	156.703
Coste en dólares (\$) del tratamiento de pacientes que no usan TTZ								
		1	2		3		Total	
Costes	\$	60.326	\$	60.326	\$	60.326	\$	180.978
Tasa de descuento anual 3,23 %		1.0323		1.0656		1.1001		
Valor actual	\$	58.438	\$	56.610	\$	54.839	\$	169.887

Como se ha comentado anteriormente, son múltiples los estudios coste-efectividad realizados con objeto de comparar la eficacia entre TTZ y algunos de los fármacos empleados para la misma patología o estudiar el impacto presupuestario que supone usado como tratamiento adyuvante.

Así, un análisis del impacto presupuestario que supone la incorporación de pertuzumab con actividad anti-Her-2 positivo en el tratamiento del CMM [8], en un hospital de tercer nivel, mediante el empleo de datos demográficos de peso y superficie corporal obtenidos de las pacientes diagnosticadas de CM en el año 2012 (n=179), con un peso medio de 68,5 kg y una superficie corporal de 1,7 m², indica que el coste anual del tratamiento con docetaxel + TTZ + pertuzumab ascendió a 87.715 € frente a los 28.625 € por paciente que supuso el tratamiento con docetaxel + TTZ. La razón de coste-eficacia incremental (RCEI) fue 115.862 €. El análisis de sensibilidad mostró los costes y las RCEI presentadas en la siguiente tabla 4.4, para descuentos del 20, 30 y 40 % sobre el precio de entrada de pertuzumab.

Tabla 4.4. Costes y razón de coste-eficacia incremental (RCEI) para pertuzumab en Europa. Fuente: adaptada de [8]

Precio asignado a pertuzumab	Coste anual con los 3 fármacos (docetaxel + TTZ + pertuzumab)	SLP (meses)	RCEI (€)
3.110	87.715	18,5	115.862
2.490 (- 20 %)	75.897		92.690
2.177 (-30 %)	69.988		81.103
1.866 (-40 %)	64.079		69.517

*SLP: supervivencia libre de progresión

Los autores concluyen que la incorporación de pertuzumab al esquema docetaxel / TTZ para el tratamiento del CMM ha mostrado un aumento en la SLP. Sin embargo, el impacto presupuestario que supone este nuevo fármaco, hace necesaria una exhaustiva selección de pacientes que se beneficien del tratamiento. Igualmente, afirman que las autoridades sanitarias tendrán que valorar si resulta coste-eficaz un tratamiento con RCEI como las descritas en este trabajo [8].

Otra evaluación económica de TTZ como tratamiento adyuvante en CM HER-2 (+) realizada en el año 2013 en Colombia [9], reveló que la utilización de TTZ como tratamiento adyuvante, prolongaba la expectativa de vida ajustada por calidad (QALY) en 0,8 años, en comparación con la quimioterapia sin TTZ; a una RCEI de 71.491 \$ americanos por año de vida ganado ajustado por calidad de vida (AVAC ganado). Por tanto, el tratamiento con TTZ durante un año no era coste-efectivo en Colombia, utilizando la definición de coste-efectividad de la OMS en la que indica que la RCEI debe ser de menos de dos a tres veces el PIB per cápita por AVAC ganado [9].

Por su parte, J.W. Gallegos *et. al.* [10] realizaron un estudio sobre el consumo de TTZ en la Unidad de Mezclas Oncológicas (UMO) del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins (HNERM) (Lima, Perú) en el año 2009, mediante un análisis descriptivo-retrospectivo de las hojas de trabajo de la UMO, la utilización del Sistema de Gestión

Anexo IV

Hospitalaria (SGH) y el análisis de recetas prescritas y dispensadas. Los resultados obtenidos mostraron que el coste que representaban los esquemas de quimioterapia fue 72.798,21 \$ por paciente, siendo de mayor consumo la mezcla TTZ + ixabepilona con un coste promedio para seis ciclos de 68.684,52 \$. La UMO atendió 542 prescripciones y realizó 521 preparaciones de TTZ, las cuales generaron un gasto de 3.798.426 \$ y las devoluciones ascendieron a 704.442 \$, lo cual generó un ahorro de 18,55 %.

En la siguiente tabla 4.5 se puede observar el coste que supone el tratamiento con TTZ (\$) en combinación con diferentes fármacos para un diagnóstico de CM HER-2 (+++) [10].

Tabla 4.5. Coste del tratamiento del CM HER-2 (+++) en combinación con diferentes fármacos en Perú. Fuente: adaptada de [10]

Nº esquema	Esquema terapéutico	Dosis/ mg	Coste mínimo	Coste máximo	Mínimo en 6 ciclos	Máximo en 6 ciclos
1	TTZ	90-648	6583,57	13167,14	39501,42	79002,84
2	TTZ + Paclitaxel	90-440	6624,31	6665,05	39745,86	39990,3
3	TTZ + Docetaxel	130-648	6759,37	13518,54	40556,22	81111,24
4	TTZ + Gemcitabina	640	13348,21	13529,28	80089,26	81175,68
5	TTZ+ Ixabepilona	440	11447,42	11447,42	68684,52	68684,52
6	TTZ + Vinorelbina	110-375	7141,17	7698,77	42847,02	46192,62
7	TTZ + Gemcitabina + Vinorelbina	120-440	7322,24	8060,91	43933,44	48365,46
8	TTZ + Carboplatino + Docetaxel	300-440	6833,56	7113,75	41001,36	42682,5
9	TTZ + Carboplatino + Paclitaxel	490	13282,27	13397,4	79693,62	80384,4
10	TTZ + Doxorubicina + Ciclofosfamida	440	6623,23	6669,66	39739,38	40017,96

→ *Costes asociados al tratamiento del cáncer de mama precoz HER-2 positivo (CMP HER-2 (+)) con Trastuzumab*

El CM es una de las pocas enfermedades cancerosas que se pueden diagnosticar precozmente antes de que se note algún síntoma.

Diagnosticado en etapa inicial (carcinoma in situ) es decir, sin invasión o infiltración del tejido que rodea al conducto mamario, las posibilidades de curación son prácticamente del 100 %, lo que indica la importancia de realizar pruebas de diagnóstico precoz a todas las mujeres en edad de riesgo o con antecedentes familiares de cáncer de mama.

El cáncer de mama precoz a menudo no causa síntomas. Por esta razón, los exámenes regulares de las mamas son importantes.

Para la detección precoz del cáncer de mama la técnica más eficaz es la mamografía, capaz de detectar lesiones muy incipientes, no palpables y cuando aún no han invadido en profundidad ni se han diseminado a los ganglios ni a otros órganos.

Entre los tratamientos empleados actualmente para el CMP se encuentra el empleo de terapias biológicas, entre las que destaca el uso de TTZ, cuyo coste, tal y como ha quedado descrito anteriormente, es muy elevado, suponiendo un gasto sanitario que en algunos países en vías de desarrollo no puede ser afrontado, haciendo por tanto que no todos los pacientes pertenecientes a dichos países tengan acceso a este tipo de tratamientos. De ahí la necesidad de realizar estudios coste-efectividad para determinar si realmente el uso de las nuevas terapias es beneficioso, en cuanto a lo que su coste-beneficio se refiere.

De tal manera, Essers *et al.* realizaron un estudio de transferibilidad a los Países Bajos del modelo coste-eficacia de TTZ para el tratamiento adyuvante del CMP HER-2 (+) usado en el Reino Unido. El estudio fue realizado en tres etapas sucesivas: Paso 1: Reunir la información disponible en relación con el modelo original, y evaluar la transferibilidad geográfica del uso de las listas de control existentes en

Anexo IV

Reino Unido. Paso 2: Adaptación de los factores limitantes identificados de transferibilidad y Paso 3: Obtener una estimación del coste-efectividad de TTZ en la configuración holandesa. Como resultados obtuvieron que la estructura del modelo del Reino Unido era transferible geográficamente, aunque eran necesarias algunas adaptaciones. Desde el punto de vista de la salud, la estimación holandesa ascendió a 5.828 €/AVAC ganados. Desde una perspectiva social, la RCEI fue dominante. Los resultados indicaron que desde el punto de vista de la salud, el tratamiento con TTZ conduce a una ganancia de 2,79 años y 2,25 AVAC (con descuento). En términos de coste-eficacia, el uso de TTZ en pacientes de 50 años supone un coste de 5.828 € por AVAC ganado (con descuento). Desde una perspectiva social (incluyendo costes indirectos), la RCEI es dominante. El uso de tasas de descuento como se recomienda en los Países Bajos aumentó ligeramente la probabilidad de un beneficio neto positivo. Por tanto, los resultados de este estudio, mostrados en la tabla 4.6, apoyan el uso de esta transferencia de TTZ como tratamiento adyuvante rentable para los pacientes con CMP HER-2 (+) en los Países Bajos [11].

Tabla 4.6. Resultados obtenidos del análisis (paciente de 50 años, 20 % HER-2 (+). Fuente: adaptada de [11]

	Reino Unido							Estimación basada en el modelo de análisis de Reino Unido para Holanda						
	TTZ		Sin tratamiento		Incremental			TTZ		Sin tratamiento		Incremental		
	Coste (€)	QALYs	Coste (€)	QALYs	Coste (€)	QALYs	RCEI (€)	Coste (€)	QALYs	Coste (€)	QALYs	Coste (€)	QALYs	RCEI (€)
Punto de vista de la salud														
Con descuento	115.264	10,68	108.900	8,78	6.364	1,91	3.336	89.838	12,98	76.697	10,72	13.142	2,25	5.828
Sin descuento	148.306	15,90	139.119	12,49	9.187	3,41	2.694	112.034	15,73	95.893	12,71	16.140	3,02	5.346
Punto de vista de la sociedad														
Con descuento								123.727	12,98	132.182	10,72	- 8.455	2,25	Dominante
Sin descuento								154.295	15,73	165.266	12,71	- 10.971	3,02	Dominante
	Coste (€)	LY	Coste (€)	LY	Coste (€)	LYG	RCEI (€)	Coste (€)	LY	Coste (€)	LY	Coste (€)	LYG	RCEI (€)
Punto de vista de la salud														
Con descuento	115.264	13,57	108.900	11,69	6.364	1,88	2.417	89.838	17,11	76.697	14,32	13.142	2,79	4.718
Sin descuento	148.306	20,20	139.119	11,65	9.187	3,55	1.846	112.034	20,70	95.893	16,96	16.140	3,74	4.315
Punto de vista de la sociedad														
Con descuento								123.727	17,11	132.182	14,32	- 8.455	2,79	Dominante
Sin descuento								154.295	20,70	165.266	16,96	- 10.971	3,74	Dominante

QALY: años de vida ajustados por calidad; RCEI: razón coste-efectividad incremental; LY: vida-año; LYG: años de vida ganados.

Anexo IV

Un estudio realizado en el año 2009 [12], también estimó el coste-utilidad de TTZ como tratamiento adyuvante tras recibir quimioterapia en mujeres con CMP HER-2/Neu positivo a una edad de unos 25 años. Los datos fueron ajustados en términos de coste-eficacia por AVAC ganados. Mediante el modelo de Markov calcularon los costes incrementales y los resultados de 12 meses de tratamiento con TTZ como adyuvante. El modelo incorporó cuatro estados generales de salud (libre de enfermedad, recidiva local [LCR], recurrencia distante [DCR] y muerte), estratificada con o sin cardiotoxicidad sintomática. En el análisis se consideró el beneficio del tratamiento a los 3 y 5 años. El análisis se basó en los costes en dólares del año 2007 para Canadá. Los costes y los AVAC fueron descontados en un 3 % anual. La media del coste-utilidad secuencial de TTZ como tratamiento adyuvante en mujeres con una edad alrededor de los 25 años fue, 72.292 \$ por AVAC ganado para 5 años de tratamiento y 127.862 \$ por AVAC adquirida durante 3 años [12].

Por su parte, When Chen *et al.* [13] llevaron a cabo un estudio similar al anterior en las ciudades de Beijing, Shanghai, y Guangzhou. Mediante un modelo de transición del estado de salud de Markov, simularon el desarrollo natural del CM basado en el uso de Herceptin® usado como adyuvante, estimando los costes y la progresión de la enfermedad con los ciclos anuales de transición, y evaluando la relación coste-eficacia de 1 año de tratamiento con TTZ en comparación con un grupo que recibía quimioterapia adyuvante estándar. Desde la perspectiva de un sistema de seguro de salud de China, el coste se calculó sobre la base de una encuesta de paneles de expertos clínicos, aplicando una tasa de descuento del 3 % para descontar los gastos médicos que ocurrieron en diferentes años. Los resultados para pacientes con un peso medio de 58 kg demostraron que la utilización del tratamiento con TTZ adyuvante en el CMP prolongaba en 2,87 los años de vida, en comparación con el grupo de quimioterapia estándar. Teniendo en cuenta que un año de tratamiento con TTZ suponía un coste de 54.043 \$, el coste adicional para un año de vida ganado (AVG) era de 7.564 \$, 7.933 \$ y 7.929 \$ en Pekín, Shanghai, y Guangzhou, respectivamente. Si se medía por AVAC, la RCEI era 7.676 \$, 8.049 \$ y 8.046 \$, respectivamente. Los resultados

indicaron que TTZ adyuvante durante 1 año era rentable, siendo tanto los beneficios clínicos como económicos superiores para el grupo de pacientes tratados con TTZ adyuvante durante 1 año, en comparación con el grupo que recibió quimioterapia adyuvante estándar [13].

→ *Costes asociados al tratamiento del cáncer gástrico metastásico (CGM) con Trastuzumab*

El cáncer de estómago es el quinto en frecuencia en el mundo con grandes diferencias geográficas en su incidencia. China es el país con mayor incidencia del mundo y en Japón es el cáncer más frecuente en varones. En occidente, su incidencia ha ido disminuyendo en los últimos 60 años, salvo en la localización de la unión esófago-gástrica y cardias. La tasa estandarizada por edad es de 7,8 casos por 100.000 habitantes en España, en la que hay grandes diferencias geográficas, siendo las tasas de incidencia particularmente altas en algunas zonas de Castilla-León y Galicia, llegando a alcanzar tasas de incidencia de las más altas de Europa. Aunque la mortalidad por cáncer de estómago descende a un ritmo del 3 % desde 1975, en España el cáncer de estómago es la sexta causa de muerte por cáncer, tanto en mujeres como en varones. El descenso en las tasas de incidencia y mortalidad se interpreta como reflejo del desarrollo socio-económico [14].

El cáncer de estómago afecta principalmente a las personas de edad avanzada. Al momento del diagnóstico, la edad promedio de las personas es de 69 años. Alrededor de 6 de cada 10 personas diagnosticadas con cáncer de estómago cada año, tienen 65 años o más. El riesgo promedio de que una persona padezca cáncer de estómago en el transcurso de su vida es de alrededor de 1 en 111. El riesgo es ligeramente mayor en los hombres que en las mujeres, y también puede ser afectado por otros factores.

El cáncer de estómago es mucho más común en países menos desarrollados, siendo una de las principales causas de muerte por cáncer en el mundo. En EE.UU. para el año 2016, los cálculos de la Sociedad Americana contra el Cáncer para este tipo de cáncer

Anexo IV

indicaron que se diagnosticarían aproximadamente 26.370 casos de cáncer de estómago (16.480 hombres y 9.890 mujeres) y aproximadamente 10.730 personas (6.540 hombres y 4.190 mujeres) morirían a causa de este cáncer.

Los cánceres de estómago tienden a desarrollarse lentamente en un período de muchos años. Antes de que se forme un verdadero cáncer, a menudo ocurren cambios precancerosos en el revestimiento interno (mucosa) del estómago. Estos cambios tempranos casi nunca causan síntomas y, por lo tanto, no se detectan. Los tumores cancerosos que comienzan en diferentes secciones del estómago podrían producir síntomas diferentes y tienden a tener consecuencias diferentes. La localización del cáncer también puede afectar las opciones de tratamiento. Los cánceres de estómago se pueden propagar (metástasis) de varias maneras. Éstos pueden crecer a través de la pared del estómago e invadir los órganos cercanos. También pueden propagarse a los vasos linfáticos y a los ganglios linfáticos adyacentes. Cuando el cáncer de estómago se torna más avanzado, puede viajar a través del torrente sanguíneo y propagarse a órganos como el hígado, los pulmones y los huesos. Si el cáncer se ha propagado a los ganglios linfáticos o a otros órganos, el pronóstico del paciente no es tan favorable.

Los diferentes tipos de cáncer de estómago incluyen: adenocarcinoma (90-95 % de los cánceres de estómago), linfoma (4 %), tumores del estroma gastrointestinal (GIST) (poco comunes), tumores carcinoides (3 %) y otros tipos de cáncer como carcinoma de células escamosas, carcinoma de células pequeñas y leiomioma (poca frecuencia).

Los tratamientos principales para el cáncer de estómago son: cirugía, quimioterapia, terapia dirigida y radioterapia. Generalmente se usan dos o más de estos métodos de tratamiento. Actualmente el uso de TTK ya está aprobado contra el cáncer avanzado de estómago. Otros medicamentos que atacan la proteína HER-2, tal como el lapatinib (Tykerb[®]), el pertuzumab (Perjeta[®]) y TTK emtansina (Kadcyla[®]) están siendo investigados. También pueden emplearse medicamentos que bloquean el EGFR como panitumumab (Vectibix[®]) y otros

medicamentos dirigidos contra diferentes partes de las células cancerosas como sorafenib (Nexavar[®]) y apatinib [15].

Dado que TTZ es una de las opciones terapéuticas existentes para tratar el CGM, la Comisión de Farmacia y Terapéutica del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, España, elaboró un informe de evaluación sobre el empleo de TTZ en este tipo de cáncer, siendo los costes que supone el tratamiento con el mismo los descritos en la siguiente tabla 4.7 [16].

Tabla 4.7. Comparación de costes del tratamiento con TTZ evaluado frente a otra/s alternativa/s. Fuente: adaptada de [16]

	Trastuzumab Herceptin [®] 150 mg/vial	No procede comparación, se añade a la quimioterapia
Precio unitario (PVL+IVA)	620,38 €	
Posología	Dosis de carga: 8mg/kg Dosis de mantenimiento: 6mg/kg Pauta cada 21 días	
Coste por ciclo (70 kg)	Dosis de carga: 2.318,4 € Dosis de mantenimiento: 1.738,8 €	
Coste tratamiento completo (8 ciclos: mediana de nº de ciclos recibidos en el EECC)	14.490 €	
Costes asociados a **	Determinación del HER-2?	
Coste incremental (diferencial) **** respecto a la terapia de referencia	14.490 €	

La relación coste-eficacia de TTZ en pacientes adultos también fue comprobada por Nguyen *et al.* [17]. Para ello, utilizaron un modelo de cohorte de Markov para tres estados de salud. Los costes se calcularon a partir de la perspectiva de la sociedad de EE.UU. A través de la bibliografía obtuvieron el coste que suponía el uso de otros fármacos, cuidadores, cuidados paliativos, y los costes de eventos adversos, así como a través de tablas de tarifas. Se empleó una tasa de descuento para los costes y los resultados del 3 %. Como resultados obtuvieron que TTZ en combinación con quimioterapia como tratamiento de primera línea para tratar el CGM, tenía una RCEI de 150.452 \$ por AVAC ganado en comparación con la quimioterapia sola. De tal forma

Anexo IV

que concluyeron que es probable que el uso de TTZ + quimioterapia fuese rentable para estos pacientes, con un coste por AVAC ganado justo por encima de los 150.000 \$ a pagar, umbral recomendado por la OMS [17].

Bin Wu *et al.* [18] también llevaron a cabo un estudio coste-efectividad similar al anterior, para estimar los efectos de añadir TTZ a la quimioterapia estándar en pacientes con cáncer gástrico avanzado HER-2 (+) en China. Mediante el desarrollo de un modelo de Markov simularon la evolución clínica de los pacientes. Tras cinco años de AVAC, se estimaron los costes y las RCEI. Los costes directos se estimaron desde la perspectiva de la sociedad china. Como resultado obtuvieron que la adición de TTZ aumentaba el coste y AVAC en 56.004,30 \$ (año 2010) y 0,18, respectivamente, en relación a la quimioterapia convencional, lo que resultaba en una RCEI de 251.667,10 \$/ AVAC ganado. Determinaron por tanto, que la adición de TTZ no era rentable. Además, mediante un análisis de impacto presupuestario, estimaron que el aumento anual de los gastos fiscales sería aproximadamente de 1 billón de dólares americanos [18].

En el año 2014, también W. Sun and W. Chen [19] revisaron sistemáticamente la eficacia, la seguridad y el coste-eficacia de TTZ en el tratamiento del CGM en China. Para ello realizaron un método de revisión sistemática, obteniendo los datos necesarios principalmente a través de las bases de datos PubMed, MEDLINE y CNKI entre otras, y el estado del seguro de salud de TTZ en China. Los resultados clínicos mostraron que TTZ en combinación con quimioterapia era eficaz y bien tolerado en la población objeto de estudio, mejorando sustancialmente la supervivencia global (13,8 frente a 11,1 meses) y la supervivencia libre de progresión (6,7 vs. 5,5 meses). Un estudio reveló que la rentabilidad desde la perspectiva del Sistema Nacional de Salud del Reino Unido (NHS) de TTZ más quimioterapia, era de 66.982-71.637 £ por AVAC, en comparación con la quimioterapia sola. El cáncer gástrico había traído una pesada carga de morbilidad a China aumentando el gasto medio de hospitalización por paciente. En la primera mitad del año 2013, había más de 6 provincias y ciudades de China que proporcionaban reembolso público de TTZ, pero sólo 2

para la indicación de cáncer gástrico. Como conclusión, determinaron que TTZ con quimioterapia podía ser considerado como una nueva opción estándar para los pacientes con CGM HER-2 (+), pero sin embargo, eran necesarias más evidencias sobre la eficacia, la seguridad y la rentabilidad de TTZ para apoyar la toma de decisiones públicas locales en la actualización de los beneficios del seguro médico en China [19].

De igual manera, González-Vacarezza *et al.* [20] evaluaron la eficacia y seguridad de TTZ asociado con quimioterapia combinada, como primera línea de tratamiento para el adenocarcinoma gástrico y de la unión gastroesofágica en estadio avanzado en pacientes HER-2 (+). Sin embargo, y a pesar de determinar también los costes que suponía la inclusión de TTZ en el tratamiento, estos no fueron publicados.

2. POSIBLES MEDIDAS DE AHORRO

La revisión bibliográfica realizada muestra que el tratamiento con TTZ, tanto en CM como en cáncer gástrico, resulta beneficioso para los pacientes, aumentando los AVAC ganados con respecto al uso de quimioterapia sola. Sin embargo, su inclusión supone un incremento del gasto sanitario, sobre todo durante el primer año de tratamiento, el cual podría ser reducido mediante la adopción de algunas medidas como:

- Realización de estudios que indiquen qué pacientes se van a beneficiar realmente del tratamiento con el mismo.
- Estudios coste-efectividad sobre el uso de nuevas formulaciones de TTZ: conjugados o diferentes combinaciones con quimioterapia.
- Sustitución de TTZ por otras terapias que presenten una eficacia-seguridad igual a la de este mAb, pero con menor coste.
- Establecimiento de protocolos de actuación y tratamiento.

Anexo IV

- Facilitar el acceso al tratamiento con TTZ, en la medida de lo posible, en países en vías de desarrollo, ya que a la larga su uso resulta rentable.
- Realización de estudios de estabilidad de TTZ conservado bajo diferentes condiciones a las indicadas por el fabricante y similares a las condiciones habituales de uso hospitalario, con objeto de determinar su vida media útil y evitar la creación excesiva de remanentes.
- Obtención de nuevas técnicas de diagnóstico precoz.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Agencia Europea de Medicamentos (EMA). Ficha técnica de Herceptin® (Trastuzumab). <http://www.ema.europa.eu>
- [2] Leyland-Jones B. Review. Trastuzumab: hopes and realities. *Lancet Oncol.* 2002 Mar;3(3):137-44.
- [3] Jamieson D. *et al.* Development and validation of cell-based ELISA for the quantification of trastuzumab in human plasma. *Journal of Immunological Methods* 345 (2009) 106–111.
- [4] Subsecretaría de Salud Pública. Subsecretaría de Redes Asistenciales. División Jurídica PROTOCOLO 2015 .Tratamiento con Trastuzumab en personas con cáncer de mama que sobreexpresan el gen HER2. *Ministerio de Salud. Gobierno de Chile.*
- [5] Neyt M. *et al.* Trastuzumab in early stage breast cancer: a cost-effectiveness analysis for Belgium. *Health Policy* 2008; 87(2):146–59.
- [6] Carranza H. *et al.* Tratamiento con trastuzumab en diversos escenarios del cáncer de mama: experiencia en la Fundación Santa Fe de Bogotá. *Rev Colomb Cancerol* 2007; 11(1):23-31.
- [7] Ige M. *et al.* Ventajas de un buen manejo de la terapia adyuvante para cáncer de mama. *Diagnóstico. Volumen 46, Número 1. Enero-Marzo 2007.*
- [8] Viña M.M. *et al.* Impacto presupuestario con la incorporación del pertuzumab en el tratamiento del cáncer de mama metastásico HER2+. *I Congreso Nacional de Oncología Médica y Farmacia oncológica 2013.*
- [9] Buendía J.A. *et al.* An economic evaluation of trastuzumab as adjuvant treatment of early HER2-positive breast cancer patients in Colombia. *Biomédica* 2013; 33:411-7.
- [10] Gallegos J.W. *et al.* Consumo de trastuzumab en la Unidad de Mezclas Oncológicas del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins, Enero-Diciembre 2009. *Ciencia e Investigación* 2011; 14(2): 22-28.
- [11] Essers B.A.B. *et al.* Transferability of Model-Based Economic Evaluations: The Case of Trastuzumab for the Adjuvant Treatment of HER2-Positive Early Breast Cancer in the Netherlands. *Value in Health. Volume 13, Number 4, 2010.*

Anexo IV

[12] Skedgel C. *et al.* The Cost-Utility of Sequential Adjuvant Trastuzumab in Women with Her2/Neu-Positive Breast Cancer: An Analysis Based On Updated Results from the HERA Trial. *Value in Health, Volume 12, Number 5, 2009.*

[13] Chen W. *et al.* An Economic Evaluation of Adjuvant Trastuzumab Therapy in HER2-Positive Early Breast Cancer. *Value in Health, Volume 12, Supplement 3, 2009.*

[14] AEMPS. Departamento de medicamentos de uso humano. Informe de Posicionamiento Terapéutico de ramucirumab (Cyramza®) en cáncer gástrico. 18 de diciembre de 2015.

[15] American Cancer Society. Cáncer de estómago. 2014. www.cancer.org

[16] Comisión de Farmacia y Terapéutica del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, España. TRASTUZUMAB en cáncer gástrico metastásico. Marzo 2011.

[17] Nguyen A. *et al.* PCN109–Cost-Effectiveness of Trastuzumab in Adult Metastatic Gastric Cancer Patients with an Overexpression of HER2. *Value in Health. Volume 19, Issue 3, May 2016, Pages A153.*

[18] Wu B. *et al.* Costs of Trastuzumab in Combination With Chemotherapy for HER2-Positive Advanced Gastric or Gastroesophageal Junction Cancer: An Economic Evaluation in the Chinese Context. *Clinical Therapeutics. Volume 34, Issue 2, February 2012, Pages 468–479.*

[19] Sun W. and Chen W. PCN171–Efficacy, Safety and Cost-Effectiveness of Trastuzumab in Metastatic Gastric Cancer Treatment in China. *Value in Health. Volume 17, Issue 3, May 2014, Pages A97–A98.*

[20] González-Vacarezza N. *et al.* Eficacia y seguridad de trastuzumab para el tratamiento de cáncer gástrico. Grupo de Evaluación de Tecnologías Sanitarias (gETS), División Evaluación Sanitaria, Dirección General de la Salud, Ministerio de Salud Pública, Uruguay. IP-01-013-39, Enero 2014.



ANEXO V

PUBLICACIONES
REALIZADAS

➤ **Artículo publicado:** “Development and use of specific ELISA methods for quantifying the biological activity of bevacizumab, cetuximab and trastuzumab in stability studies”. *Journal of Chromatography B. Volume 1032, 1 October 2016, Pages 155-164. Special issue: Analytical characterization of biopharmaceuticals. Impact Factor: 2,687. Quartiles: Analytical Chemistry: Q1; Biochemistry: Q2; Cell Biology: Q3; Clinical Biochemistry: Q2.*

Este artículo se realizó a petición de la revista para ser incluido en el citado número especial.

Journal of Chromatography B, 1032 (2016) 155–164

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jchromb

Development and use of specific ELISA methods for quantifying the biological activity of bevacizumab, cetuximab and trastuzumab in stability studies

Inmaculada Suárez^a, Antonio Salmerón-García^b, José Cabeza^b, Luis Fermín Capitán-Vallvey^a, Natalia Navas^{c,*}

^a Departamento de Química Analítica, Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Campus Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain
^b ICG (Instituto de Investigación en Ciencias Químicas, “San Cecilio Hospital”), Biomedical Research Institute in Granada, Hospital Universitario de Granada, University of Granada, E-18012 Granada, Spain
^c Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Biomedical Research Institute in Granada, University of Granada, Campus Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 26 February 2016
 Received in revised form 25 May 2016
 Accepted 26 May 2016
 Available online 27 May 2016

Keywords:
 ELISA
 Stability study
 Monoclonal antibody based medicines
 Bevacizumab
 Cetuximab
 Trastuzumab

ABSTRACT

Bevacizumab (BVZ), cetuximab (CTX) and trastuzumab (TZ) are monoclonal antibodies (mAbs) used worldwide for the treatment of several widespread kinds of cancer. They are marketed as medicines under their respective trademarks: Avastin®, Erbitux® and Herceptin®. The aim of this research was to develop in-house specific enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) to assess the long-term stability of these three mAbs. These assays assess the biological functionality of the mAbs by quantifying their biological activity. For this purpose, we developed an indirect ELISA procedure whereby the specific antigens against which the mAbs are directed are used as specific “capturing” antibodies on the ELISA plates. We therefore used vascular endothelial growth factor (VEGF) in the ELISA for BVZ; human epidermal growth factor receptor (HER2/ErbB2) in the ELISA for CTX and human receptor HER2 (hHER2) in the ELISA for TZ. After the mAbs had attached to their antigens, we used an anti-human IgG (whole molecule) peroxidase-conjugate and a 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride substrate. The reaction was stopped using sulphuric acid and absorbance was recorded at a wavelength of 450 nm. The three ELISA methods were validated in terms of calibration models, range of the assay, limits of detection and quantitation, intra- and interday precision and accuracy, and specificity by cross reactions. Period degradation studies were also conducted on the medicines, providing useful information. Finally, the proposed ELISA were successfully used in a long-term stability study to quantify the remaining biological activity in medicines that had been opened and then stored under two different storage conditions, i.e. refrigerated at 4 °C and frozen at -20 °C. Results indicated that BVZ (Avastin®) is the most stable of the three in terms of its biological functionality.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The biopharmaceuticals Bevacizumab (BVZ), Cetuximab (CTX) and Trastuzumab (TZ) are therapeutic monoclonal antibodies (mAbs). They are the active ingredient in Avastin® [1], Erbitux® [2] and [3] (Herceptin®) respectively, medicines used all over the world. BVZ (Avastin®) is directed against the vascular endothelial growth factor (VEGF) and is indicated for the treatment of several kinds of cancer such as metastatic carcinoma of the colon or rectum, breast cancer, lung cancer, renal cancer, epithelial ovarian, fallopian tube and primary peritoneal cancer and cervical cancer [1]. It is also frequently used off-label in intravitreal injections for treating age-related macular degeneration (AMD) [4,5], choroidal neovascularisation [6], diabetic retinopathies [7] and neovascular glaucoma [8]. CTX (Erbitux®) is directed against the human epidermal growth factor receptor (HER2). It is a powerful chemotherapeutic/human mAb approved worldwide for the treatment of colon, head and neck cancers [2]. TZ (Herceptin®) is directed against the human receptor HER2 (hHER2) and is indicated for the treatment of patients with metastatic breast cancer whose tumours overexpress hHER2 (25% of the patients) [3]. The three mAbs share the same general IgG1 structure, differing above all in the variable region, which is where the complementary determining region (CDR) that gives each mAb its specific identity is located.

* Corresponding author.
 E-mail address: natalia@ugr.es (N. Navas).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.05.045>
 1570-0232/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Anexo V

➤ *Artículo pendiente de publicación (en fase de escritura):
“ELISA methods for quantify and biological activity assessing of the
monoclonal antibody infliximab” (Revista: Journal pharmaceutical
and biomedical analysis)*



Congreso Internacional

20th Congress of the

European Association of Hospital Pharmacists – EAHP.

“The Hospital Pharmacist’s agenda-patient safety first”.

25-27 Marzo 2015. Hamburgo, Alemania.

- Trabajos presentados:

➤ Comunicación oral. **Trabajo de investigación GANADOR DEL PRIMER PREMIO OTORGADO POR EAHP: PP028 “Long-term stability of diluted solutions of the monoclonal antibody Infiximab”**. Eur J Hosp Pharm 2015; 22 (Suppl 1): A1-A230. *Impact factor: 0,432. Cuartil: Pharmacology, Toxicology and Pharmaceutics (miscellaneous): Q3.*

➤ Poster. Título:

▪ PP017 **“Evaluation of long-term biological activity of Bevacizumab 25 mg ml-1 (Avastin®) by an ad hoc ELISA method”**. Eur J Hosp Pharm 2015; 22 (Suppl 1): A1-A230. Page A127. doi:10.1136/ejhpharm-2015-000639.311

▪ PP022 **“Evaluation of long-term biological activity of Cetuximab 5.0 mg ml-1 (Erbix®) by an ad hoc ELISA method”**. Eur J Hosp Pharm 2015; 22 (Suppl 1): A1-A230. Page A129. doi:10.1136/ejhpharm-2015-000639.316

▪ PP026 **“Evaluation of long-term biological activity of Trastuzumab 15.0 mg ml-1 (Herceptin®) by an ad hoc ELISA method”**. Eur J Hosp Pharm 2015; 22 (Suppl 1): A1-A230. Page A131 doi:10.1136/ejhpharm-2015-000639.320

Anexo V

▪ PP027 “*Long-term stability of solutions of the monoclonal antibody Cetuximab*”. Eur J Hosp Pharm 2015; 22 (Suppl 1): A1-A230. Page A131 doi:10.1136/ejhpharm-2015-000639.321
doi:10.1136/ejhpharm-2015-000639.321

▪ PP028 “*Long-term stability of diluted solutions of the monoclonal antibody Infliximab*”. Eur J Hosp Pharm 2015; 22 (Suppl 1): A1-A230. Pages A131-132 doi:10.1136/ejhpharm-2015-000639.322.

Production and preparation

REFERENCE

1. Sessitt PJ, Trahan J, Coyne JW. Reduction in surface contamination with antimicrobial drags in 22 hospital pharmacies in the US following implementation of a closed-system drug transfer device. *Hosp Pharm* 2013;48(3):204-12.

Conflict of interest

PP-016 VALIDATION OF A NEW METHOD OF STERILITY TESTING FOR THE VITAMIN AND LIPID MIXTURES DESTINED FOR THE NEONATOLOGY DEPARTMENT

¹S. Thevenaz, ²M. Masard, ³E. Biemond, ⁴C. Chana, ⁵L. Milla, ⁶J. Alasouch, ⁷A. Cassata, ⁸M. Poupat, ⁹M. Brunet, ¹⁰Chast. ¹Hôpital Cochin APHP, Pharmacy, Paris, France; ²Hôpital Cochin APHP, Hygiene, Paris, France; ³Hôpital Cochin APHP, Bacteriology, Paris, France

10.1136/opharm-2015-000639.310

Background Three vitamin and lipid mixtures are produced by the parenteral nutrition unit. Besides the checks performed on these preparations, a membrane filtration sterility test (STERITEST) is carried out as required by the European Pharmacopoeia (EP). Due to constraints associated with these tests (duration, visual interpretation) alternative methods are available such as those for septicaemia diagnosis: Bac/ALERT 3D. It consists of directly inoculating a culture medium followed by automated microbial detection. This method doesn't meet all the criteria required by the EP, but seems acceptable if validated.

Purpose. To compare the two methods and to assess their respective efficiency.

Material and methods Growth promotion tests of aerobic, anaerobic micro-organisms (MO) and fungi were performed with 5 colony-forming units (CFU) of *S. aureus*, *B. subtilis*, *C. sporogenes*, *A. brasiliensis*, *C. albicans*, and *P. aeruginosa* seeded in two different media. Afterwards the three kinds of mixture were produced in a microbiological safety cabinet. Both methods were tested at the same time on three samples of each MO and mixture (54 pairs of samples). Daily readings and identifications of MO were then performed in collaboration with the bacteriology department. The averages of the growth period of each method were compared using a t-test.

Results 100% of MO seeded on the 54 pairs of Bac/ALERT were detected versus 91% on STERITEST. The t-test showed a significant difference between the two methods: the average growth period with STERITEST (5.9 days) was longer than that with Bac/ALERT (2.5 days) ($p = 1.27 \times 10^{-18}$).

Conclusion Bac/ALERT is more efficient than STERITEST for the detection of MO: increased sensitivity and reproducibility, faster detection and identification of MO, less bias of readings. All these reasons drove us to choose the new Bac/ALERT sterility test instead of STERITEST.

REFERENCE

1. European Pharmacopoeia 7.7 sterility 2.6.1

No conflict of interest.

PP-017 EVALUATION OF LONG-TERM BIOLOGICAL ACTIVITY OF BEVACIZUMAB 25 mg/ml BY AN AD-HOC ELISA METHOD

¹ **Suzanne Goussier**, ² N. Navas Iglesias, ³ A. Salmerón García, ⁴ J. Cabrera Barrios, ⁵ I. Capitán Yubero, ⁶ University of Granada-Faculty of Science, Analytical Chemistry, Granada, Spain; ⁷ Department of Analytical Chemistry – Science Faculty, Biomedical Research Institute IIS, Granada, University of Granada, Campus Fuentenueva s/n; ⁸UCG Intercentro Intermedicines Farmacia Granada – San Cecilio Hospital; ⁹ Biomedical Research Institute IIS, Granada, Hospitales Universitarios de Granada, E-18012 Granada, Spain

10.1136/opharm-2015-000639.311

Eur J Hosp Pharm 2015;22(suppl 1):A1-A230

Background Bevacizumab (BVZ), the active substance of Avastin (25 mg/ml, BVZ), is a humanised anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) monoclonal antibody indicated in the treatment of several cancers.

Purpose To evaluate the biological activity (BA) that remains in the medicine Avastin after opening single-use vials in a long-term study.

Material and methods An indirect non-competitive ELISA was developed for this and validated to test the stability of BA of BVZ. Cross-reaction with other monoclonal antibodies was tested. ELISA plates were sensitised with recombinant VEGF. Calibration function was between 0.01 and 25.0 µg/ml; detection and quantification limits were 0.10 and 0.35 µg/ml; precision – as intraday and interday reproducibility (%RSD) – was <10% and accuracy (% of recovery) >95%. Stress study included mild basic, acidic, oxidative and ionic-strength conditions: temperature 50 and 70°C, and light exposure. Surplus samples of Avastin from the daily use of the Hospital Pharmacy Unit were stored at 4°C and -20°C in the dark. The BA was tested up to 57 days.

Results The BA of Avastin was higher than 98% at day 1, and higher than 95% at day 2, but decreased by 15% of the initial BA at day 3. This value was maintained throughout the study (57 days) for the two storage conditions tested. Residual BA remained in all samples submitted to the stress except in samples heated at 70°C. There were no cross reactions with similar IgG1.

Conclusion Regarding BA, the stability of Avastin in the conditions used (both refrigerated (4°C) and frozen (-20°C)) was maintained for two days. Considering the limit of $\pm 10\%$ used in practical stability studies, it cannot be considered stable from day 3 since the loss of BA was 15%. These results will be further investigated by flow cytometry.

REFERENCES AND/OR ACKNOWLEDGEMENTS

1. Financial support: P110/0021 (MICINN, Government of Spain).

No conflict of interest.

PP-018 PREPARATION OF EYE DROPS FOR VERNAL KERATOCONJUNCTIVITIS: THE PHARMASOT ADDED TO A TEAM ACTS AS A FLUCURIM BETWEEN DOCTOR AND PATIENT

¹V. Bassi, ²C. Sgama, ³L. Scali, ⁴G. Scialino, ⁵A. Calvari, ⁶N. Di Simone, ⁷G. La Marca, ⁸R. Cacciatini, ⁹N. Pucci, ¹⁰C. De Lorenz. ¹University of Florence, Specialisation School in Hospital Pharmacy, Florence, Italy; ²“A. Meyer” University Children's Hospital, Department of Pharmacy, Florence, Italy; ³“A. Meyer” University Children's Hospital, Department of Paediatric Neurosciences, Florence, Italy; ⁴“A. Meyer” University Children's Hospital, Department of Paediatric Hematology and Oncology, Florence, Italy; ⁵“A. Meyer” University Children's Hospital, Department of Paediatric Allergology, Florence, Italy; ⁶“A. Meyer” University Children's Hospital, Department of Clinical Ophthalmology, Florence, Italy

10.1136/opharm-2015-000639.312

Background Vernal Keratoconjunctivitis (VKC) is an allergic conjunctivitis, often not easily diagnosed and properly treated. The disease is very debilitating for patients, may be complicated by corneal lesions and can evolve to keratoconus.

Purpose The exponential increase in VKC patients led us to start a close collaboration between pharmacists and allergists, ophthalmologists, and chemists. The goal was to address and solve problems caused by the lack of adequate knowledge of VKC, in order to find a diagnostic-therapeutic course, improve patient

A127

Production and preparation

PP-021 READY-TO-USE MEDICINES SAFETY? NATIONAL EVALUATION OF STANDARDISED DRUG SOLUTIONS IN THE INTENSIVE CARE MEDICINE

¹M. Masóka, ²A. Esert, ³M. Baehr, ⁴S. Kluge, ⁵H. Hilgert, ⁶C. Langrabakke, ⁷University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Pharmacy, Hamburg, Germany; ⁸University Hospital Barm Herzberg, Pharmacy, Aachen, Germany; ⁹University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Department of Intensive Care Medicine, Hamburg, Germany; ¹⁰University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Pharmacy – Department of Intensive Care Medicine, Hamburg, Germany

10.1136/opharm-2015-000639.315

Background Ready-to-use drug-solutions for syringe pumps produced by industry or hospital pharmacies have advantages over solutions prepared manually on the ward in terms of accuracy of drug concentration and microbiological aspects. A key prerequisite for large-scale productions is to standardise concentrations, as treatment varies at the local level.

Purpose To assess the different concentrations that are being used in intensive care units nationally and the variety of ready-to-use solutions that are being manufactured by hospital pharmacists.

Material and methods Two surveys were conducted among the hospital pharmacies and intensive care units (ICU) in the national university hospitals. The answers were evaluated descriptively.

Results Overall 100 different drugs were used in 262 different locally standardised concentrations in the responding 17 hospitals. Of those, only 21 drugs were mentioned by at least two thirds of the ICUs: e.g. catecholamines, hypnotics, insulin, heparin, hydrocortisone and amiodarone.

Among the 24 different drugs prepared by the responding 19 hospital pharmacies, the main ones reported were expensive drugs and/or preparations that are extremely prone to error (argatroban, caspofungin). There was only a little overlap ($n = 6$) between the standardised drugs used in the ICU and the hospital pharmacy-based manufacturing of ready-to-use preparations. Out of these only potassium chloride and heparin were being manufactured by at least five pharmacies.

Conclusion The observed gap might be due to limited manufacturing capacities of the pharmacies and/or limited stability data of the ready-to-use preparations (concentration, diluent and primary container). Standardising the drug concentrations on a national, or even European level might enable hospital pharmacies to cooperate in overcoming the lack of stability data. The capacity deficit at the hospital pharmacies could be lessened by shifting high-turnover-drugs towards pharmaceutical companies. For nationwide recommendations of standardised concentrations of drugs used in intensive care an extensive survey among ICUs is being planned.

REFERENCES AND/OR ACKNOWLEDGEMENTS

No conflict of interest.

PP-022 EVALUATION OF LONG-TERM BIOLOGICAL ACTIVITY OF CETUXIMAB 5.0 mg/ml (ERBITUX), BY AN AD-HOC ELISA METHOD

¹ **Suzanne Goussier**, ² N. Navas Iglesias, ³ A. Salmerón García, ⁴ J. Cabrera Barrios, ⁵ I. Capitán Yubero, ⁶ University of Granada-Faculty of Science, Analytical Chemistry, Granada, Spain; ⁷ Department of Analytical Chemistry, Science Faculty, Biomedical Research Institute IIS, Granada, University of Granada, Campus Fuentenueva s/n; ⁸UCG Intercentro Intermedicines Farmacia Granada – San Cecilio Hospital; ⁹ Biomedical Research Institute IIS, Granada, Hospitales Universitarios de Granada, E-18012 Granada, Spain

10.1136/opharm-2015-000639.316

Eur J Hosp Pharm 2015;22(suppl 1):A1-A230

Background Cetuximab (CTX) (Erbixm) is a chimeric mouse-human monoclonal antibody IgG1 targeting epidermal growth factor receptor (EGFR). It is approved for use as treatment for metastatic colorectal cancer and squamous cell carcinoma of the head and neck.

Purpose To evaluate the biological activity (BA) that remains in Erbixm after opening single-use vials in a long-term study. It was also to evaluate the remaining activity when the opened medicine was exposed to different stress conditions to test the risk associated with accidental exposure to light, heat, etc.

Material and methods An indirect non-competitive ELISA was developed for the purpose based in the use of human EGFR to test the BA of CTX. Calibration function was between 0.4–50.0 µg/ml; detection and quantification limits were 0.1 and 0.4 µg/ml; precision - as intraday and interday reproducibility (%RSD) - was <10% and accuracy (% of recovery) >90%. Cross-reaction with similar antibodies was tested. Surplus samples of Erbixm from the daily use of the Hospital Pharmacy Unit were stored at 4°C and -20°C protected from light. BA was tested up to 30 days. A drug degradation study (mild experimental conditions) was also conducted.

Results The BA of Erbixm decreased 5% when stored for 24 h at 4°C. The decrease was 14% after 3 days, 20% after 7 days and 85% on the last day checked. For CTX samples stored frozen at -20°C, the BA decreased from 16% (24 h) to 85% on the last day checked. Residual BA remained in all samples submitted to the stress except in samples heated at 70°C. There were no cross reactions.

Conclusion Regarding the BA of Erbixm, it is stable within the 24 first hours after opening of the vial when stored at 4°C. These results will be further investigated by flow cytometry.

REFERENCES AND/OR ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support: P110/00201 (MICINN, Government of Spain).

No conflict of interest.

PP-023 EVALUATION OF THE PERFORMANCE OF AN AUTOMATED SYSTEM FOR THE PREPARATION OF CYTOTOXIC BAGS

¹A. Vemy, ²L. Camis, ³L. Falachi, ⁴L. Bouchoud, ⁵P. Bonnaville, ⁶University Hospital of Geneva, Pharmacy, Geneva, Switzerland; ⁷University of Geneva – University of Lausanne, School of Pharmaceutical Sciences, Geneva, Switzerland

10.1136/opharm-2015-000639.317

Background The increased use of chemotherapy drugs forces hospitals to rationalise their production. Automated systems are one of the possible solutions.

Purpose To evaluate the performance of the PharmaHelp (Fresenius) automated system for accuracy (trueness and repeatability) and productivity comparing different working conditions.

Material and methods Accuracy was studied by automated filling of 10 different volumes of IV bags from 0.5 to 250 mL. Working conditions studied were the filling position, size of syringes (20/60 mL), working day and manufacturing methods (dose banding/individualised doses). Gravimetric and chemical analyses (phenylephrine as tracer) were used for the measure of accuracy. Productivity was evaluated by the production time for bags of 10 IV bags of different filling volumes. Results were discussed according to accuracy limits of $\pm 3\%$, $\pm 5\%$, $\pm 10\%$ (IC95).

A129

	Production and preparation	Production and preparation	REFERENCES AND/OR ACKNOWLEDGEMENTS
<p>PP-026 EVALUATION OF LONG-TERM BIOLOGICAL ACTIVITY OF TRASTUZUMAB 15.0 mg/ml (Herceptin) BY AN AD HOC ELISA METHOD</p> <p>1 Sastre González, ² Ni Naves Iglesias, ³ A. Salmerón García, ⁴ Cabeza Barrea, ⁵ Capellán Vallby, ⁶ University of Granada-Faculty of Science, Analytical Chemistry, Granada, Spain; ⁷Department of Analytical Chemistry, Science Faculty, Biomedical Research Institute IIS, Granada, University of Granada, Campus Fuencarral s/n, UGC Intercentro Intervenciones Farmacia Granada, "San Cecilio Hospital", Biomedical Research Institute IIS, Granada, Hospitales Universitarios de Granada, E-18012 Granada, Spain</p> <p>10.1136/epharm-2015-000639.320</p> <p>Background Trastuzumab (TRZ) (Herceptin) is a humanised monoclonal antibody IgG1 that acts against human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). It is indicated in the treatment of early and metastatic breast cancer and metastatic gastric cancer.</p> <p>Purpose To evaluate the biological activity (BA) that remains in Herceptin after single-use vials have been opened in a long-term study. We also evaluated the remaining activity when TRZ was exposed to different stress conditions.</p> <p>Material and methods An indirect non-competitive ELISA was developed for this purpose and validated to test the stability of BA of TRZ. ELISA plates were sensitised with recombinant human HER2. Calibration function was between 100.0 and 500.0 ng/mL; detection and quantification limits were 31.8 and 100.0 ng/mL; precision – as intraday and interday reproducibility (%RSD – was <10% and accuracy (% recovery) >95%. Stress study at 100 ng/mL included basic (NaOH 0.1M), acidic (HCl 0.1M), oxidative (H₂O₂ 10%) and ionic-strength (NaCl 1M) conditions (33% v/v); temperature 50°C and 70°C and light exposure. Surplus samples of Herceptin were stored at 4°C, –20°C and –80°C in the dark. The BA was tested up to 15 days.</p> <p>Results The BA of Herceptin decreased by 25%, 30% and 47% the initial activity 24 h after opening when vials were stored at 4°C, –20°C and –80°C respectively. The decrease was 50–60% after 2 days for the three storage conditions and it was maintained along the study (up to 15 days). Residual BA remained in all samples submitted to the stress except in samples heated at 70°C. There was no cross reaction with similar IgG1.</p> <p>Conclusion Herceptin lost a significant percentage of the BA when tested by ELISA after 24 h of storage both refrigerated (4°C) and frozen (–20°C and –80°C). Nevertheless, these results will be further investigated by flow cytometry.</p> <p>REFERENCES AND/OR ACKNOWLEDGEMENTS</p> <p>Financial support: PI10/00201 (MICINN, Government of Spain).</p> <p>No conflict of interest.</p>	<p>Background Cetuximab (CTX) (Erbixux) is a chimeric mouse-human monoclonal antibody IgG1 targeting epidermal growth factor receptor (EGFR). It is approved for use as treatment for metastatic colorectal cancer and squamous cell carcinoma of the head and neck.</p> <p>Purpose To assess the stability of CTX during storage (in dark glass bottles at 4°C refrigerated and at –20°C (frozen) once the single-dose vial (5 mg/mL) had been opened and when diluted (2 mg/mL in saline solution) in the centralised preparation unit.</p> <p>Material and methods Methods were developed for this purpose and ICH validated (to indicate stability; in addition to calibration, precision, accuracy, etc., stress studies were also conducted) for assessing the physicochemical and the biological stability: ELISA (to test biological activity), (RP)HPLC-DAD (to quantify), (CX)HPLC-DAD (to obtain isoforms profile), (SEC)HPLC-DAD (to detect aggregates) and ESI-qTOF-MS (to assay changes in the molecular weight).</p> <p>Results The decrease of biological activity was only 5% 24 h after the vial had been opened (5 mg/mL), rising to 14% at day 3, 20% after a week, with a final decrease of 83% for the last day we checked (30 days). The overall quantity of CTX was unchanged for the month assessed. No formation of aggregates was detected in the two weeks tested. Changes in the chromatographic isoforms profile (2 mg/mL) were detected after a week, with significant variations in the isoforms from week 2 up to the end of the study (two months). Molecular weight indicated no major changes in the CTX structure (one month).</p> <p>Conclusion Both the physicochemical and the biological properties assessed indicated good stability of CTX within 24 h after the vial had been opened. There was not even an important decrease in the biological activity a week after the opening of the medicine (20% decrease) with unchanged physicochemical properties for six days.</p> <p>REFERENCES AND/OR ACKNOWLEDGEMENTS</p> <p>Financial support: PI10/00201 (MICINN, Government of Spain).</p> <p>No conflict of interest.</p>	<p>chromatography coupled with a Flame Ionisation Detector (GC-FID).</p> <p>Results Over the 14 days, the clarity and lack of colour of the solutions were maintained. ¹⁹F-NMR signals identical to those of the original product were observed in all samples, corresponding to the chemical structure of unchanged sevoflurane. Meanwhile, in the GC-FID analysis, no additional peaks occurred at the storage temperature. No degradation products were observed by either analytical techniques.</p> <p>Conclusion Pure sevoflurane preserved in amber polypropylene syringes was stable for 14 days at room temperature. This enables it to be stored in a more convenient way, and provides greater comfort in drug installation onto the uker bed from the syringe.</p> <p>REFERENCES AND/OR ACKNOWLEDGEMENTS</p> <p>University of Almería.</p> <p>No conflict of interest.</p> <p>PP-029 NON-COMEDOGENIC FORMULATION OF TOPICAL SIROLIMUS FOR TUBEROUS SCLEROSIS PATIENTS WITH FACIAL ANGIOFIBROMAS DEVELOPING ACNE COSMETICA</p> <p>G Ros Bernaldo, ¹ A De Baizogü Gorroño, ² A Belustegui Foronda, ³ I Bilbao Menegar, ⁴ M Castiño López, ⁵ LR López Giménez, ⁶ B San Jose Ruiz, ⁷ A Bustiza Txertadi, ⁸ Z Bakaran - Khatunata, ⁹ S Sorola Aisa, Hospital Universitario Cruces, Pharmacy Department, Barakaldo, Spain</p> <p>10.1136/epharm-2015-000639.323</p> <p>Background Patients with tuberous sclerosis often develop facial angiofibromas that can be successfully treated with topical 1% sirolimus ointments. Nevertheless, this ointment's greasy nature can produce acne, causing patients to refuse the treatment.</p> <p>Purpose To devise a non-oily formula for topical sirolimus for patients with tuberous sclerosis and facial angiofibromas who develop acne due to this ointment.</p> <p>Material and methods We reviewed the literature searching for standard procedures for making alternative topical formulations of sirolimus. In addition, the physicochemical properties of sirolimus were considered in order to find the most suitable formulation for this particular case.</p> <p>Results No standard ways were found of producing oil-free formulations of sirolimus. We decided to compound a 0.2% sirolimus gel with the following procedure. First, prepare a 2% carmellose gel. For this, heat aqua conservans (Nipagin 0.25 g + Nipsalol 0.11 g + distilled water 500 mL) to 50°C. In a mortar, mix 2 g of sodium carboxymethylcellulose and 10 g of glycerol. Then, add the content of the mortar to 88 g of heated aqua conservans and stir the mixture until room temperature is reached. Once the carmellose gel has been prepared, weigh 0.2 g of sirolimus and add a few drops of glycerol to it. Slowly, pour the carmellose gel onto the sirolimus, mixing them by stirring, until 100 g has been added. Let it stand for 12 h until the gel is homogeneous. We give it an expiry date of 2 months, stored in an opaque container and at room temperature (below 25°C). Mask and gloves must be used throughout the procedure.</p> <p>Conclusion We found a way to formulate sirolimus in non-oily excipients in order to diminish the development of acne with its use. Further studies will be needed to determine the efficacy of this formula in the treatment of facial angiofibromas of patients with tuberous sclerosis and the improvement of the acne presented by these patients.</p>	<p>REFERENCES AND/OR ACKNOWLEDGEMENTS</p> <p>No conflict of interest.</p> <p>PP-030 100,000 TREATMENTS PREPARED BY ROBOT: WHAT HAVE WE LEARNED?</p> <p>C Baldiri, ¹ A Molinero, ² S Guglielmi, ³ S Leon, ⁴ L Losako, ⁵ D Pasolun, ⁶ AD Céspedes Riancho, Pharmacy, Ancona, Italy</p> <p>10.1136/epharm-2015-000639.324</p> <p>Background In 2007, the University Hospital of Ancona started the journey in automating IV compounding. At the end of 2009, the clinical validation process and workflow reorganisation ended, the second robot was introduced to set up a fully automated IV oncology pharmacy. The laboratory is composed of two APOTECachemo systems and a laminar airflow cabinet which work from 8 am to 4 pm. There are 3 technicians from 8 am to 2 pm and 1 technician from 10 am to 4 pm. We work in a just-in-time production (80% for outpatients and 20% inpatients) and the rush hours go from 9 am to 1 pm. Two systems are used until 2 pm and one system works for the entire day.</p> <p>Purpose To take stock of 7 years of experience in automated IV compounding.</p> <p>Material and methods The production data were analysed in terms of doses and type of preparations delivered, by means of the statistical tools of APOTECachemo.</p> <p>Results Before 2010 10,400 treatments were produced automatically in a year and in 2010 this increased to 16,300 (80% of our annual production). In the following years, production increased with 19,300, 19,600 and 20,300 treatments in 2011, 2012 and 2013 respectively. In August 2014, we passed the threshold of 100,000 treatments compounded with APOTECachemo, representing 95% of the treatments compounded. The annual production consists of 85% in bags, 10% in syringes and 5% in elastomeric pumps. 56 different acute ingredients are used.</p> <p>Conclusion</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Automation ensures the highest quality standards because every step of the compounding process is controlled and traced 2. Automation can cover more than 90% of daily preparations even in a just-in-time system. 3. Automation allows a more intelligent and efficient management of human resources: for every 10,000 treatments automated, one FTE technician can be elevated to higher value-added tasks 4. To take advantage of automation, the workflow should be redesigned (i.e. introduce multi-dose vials and drug days). <p>REFERENCES AND/OR ACKNOWLEDGEMENTS</p> <p>No conflict of interest.</p>
<p>PP-027 LONG-TERM STABILITY OF SOLUTIONS OF THE MONOCLONAL ANTIBODY CETUXIMAB</p> <p>1 Sastre González, ² Ni Naves Iglesias, ³ A. Martínez Ortega, ⁴ Hernández Jiménez, ⁵ A Salmerón García, ⁶ Cabeza Barrea, ⁷ University of Granada-Faculty of Science, Analytical Chemistry, Granada, Spain; ⁸Department of Analytical Chemistry, Science Faculty, Biomedical Research Institute IIS, Granada, University of Granada, Campus Fuencarral s/n, UGC Intercentro Intervenciones Farmacia Granada, "San Cecilio Hospital", Biomedical Research Institute IIS, Granada, Hospitales Universitarios de Granada, E-18012 Granada, Spain</p> <p>10.1136/epharm-2015-000639.321</p> <p>Background The use of an alternative liquid anaesthetic sevoflurane has recently been reported in the literature on vascular ulcers. Topical application for management of analgesia appears to be successful.</p> <p>Purpose To evaluate the stability of sevoflurane in pure polypropylene amber syringes.</p> <p>Material and methods Commercial solutions of sevoflurane (Sevorange) were packed in polypropylene syringes. The syringes were stored at 23°C for 14 days in a digitally temperature-controlled chamber. The physical parameters monitored were clarity and colour. Chemical stability was determined by means of 19-Fluorine Nuclear Magnetic Resonance (¹⁹F-NMR) and gas</p>	<p>PP-028 LONG-TERM STABILITY OF DILUTED SOLUTIONS OF THE MONOCLONAL ANTIBODY INFlixIMAB</p> <p>1 Sastre González, ² Ni Naves Iglesias, ³ A. Martínez Ortega, ⁴ Hernández Jiménez, ⁵ A Salmerón García, ⁶ Cabeza Barrea, ⁷ University of Granada-Faculty of Science, Analytical Chemistry, Granada, Spain; ⁸Department of Analytical Chemistry, Science Faculty, Biomedical Research Institute IIS, Granada, University of Granada, Campus Fuencarral s/n, UGC Intercentro Intervenciones Farmacia Granada, "San Cecilio Hospital", Biomedical Research Institute IIS, Granada, Hospitales Universitarios de Granada, E-18012 Granada</p> <p>10.1136/epharm-2015-000639.322</p> <p>Background The use of an alternative liquid anaesthetic sevoflurane has recently been reported in the literature on vascular ulcers. Topical application for management of analgesia appears to be successful.</p> <p>Purpose To evaluate the stability of sevoflurane in pure polypropylene amber syringes.</p> <p>Material and methods Commercial solutions of sevoflurane (Sevorange) were packed in polypropylene syringes. The syringes were stored at 23°C for 14 days in a digitally temperature-controlled chamber. The physical parameters monitored were clarity and colour. Chemical stability was determined by means of 19-Fluorine Nuclear Magnetic Resonance (¹⁹F-NMR) and gas</p>	<p>10.1136/epharm-2015-000639.323</p>	<p>PP-031 THE USE OF GUIDELINES IN THE CYTOTOXIC DRUGS PREPARATION UNIT: WHAT IS THE REAL WORKLOAD FOR PHARMACY TECHNICIANS?</p> <p>B Kadić, ¹ P Čurk, ² R Urošević, ³ N Sainović, ⁴ J Ponić, ⁵ M Desouzares, Centre Hospitalier Victor Dapuy Argentineuil, Pharmacy, Argentineuil Cedex, France</p> <p>10.1136/epharm-2015-000639.325</p>

Congreso Nacional
II Workshop de Jóvenes Biotecnólogos

Divulga, conoce y comparte
6 de noviembre de 2014,
Granada, España.

- Trabajo presentado:

➤ Poster. Título: P19 “*Caracterización y análisis de fármacos biotecnológicos*”. II Workshop de Jóvenes Biotecnólogos. ISBN: 978-84-16292-09-7. DL- GR- 2178 / 2014 Pág. 29 y 30.

II Workshop de Jóvenes Biotecnólogos

P19. CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE FÁRMACOS BIOTECNOLÓGICOS

Inmaculada Suárez González, Antonio Martínez Ortega, Natalia Navas Iglesias,
Antonio Salmerón García, José Cabeza Barrera

FQM-118: Espectrometría en Fase Sólida

La presente línea de investigación comprende la caracterización y estudio específico de fármacos biotecnológicos empleados en el tratamiento de diferentes tipos de cánceres y otras patologías de tipo inmune.

Proyecto en el que se encuadra la línea de investigación actualmente

Los medicamentos de estructura proteica, como los anticuerpos monoclonales (mAbs) y sus derivados, suponen en la actualidad un impacto económico importante en la factura farmacéutica de los Sistemas Sanitarios. Si además se considera que actualmente constituyen la punta de lanza en la innovación de la terapéutica farmacológica, es de gran interés el disponer de metodologías analíticas rigurosas y validadas que permitan de una manera fiable evaluar su estabilidad en condiciones diferentes a las indicadas por los fabricantes.

Propuesta

El objetivo principal del proyecto en el que se encuadra la presente línea de investigación, es el estudio de la estabilidad de diferentes mAbs de forma que pueda ser optimizado su empleo.

Materiales y métodos

Para abordar este estudio rigurosamente, y siguiendo las indicaciones de organismos internacionales (ICH), se requiere el desarrollo y propuesta del perfil indicador de la estabilidad de estos medicamentos biotecnológicos (BD), que será el aplicado en los estudios de estabilidad. La propuesta de este perfil implica el desarrollo de metodologías analíticas avanzadas que permitan comprobar la identidad molecular de los mAbs, y por otra, de técnicas de inmunoanálisis que comprueben su actividad biológica. Además, estudios de estrés acelerados permitirán conocer las pautas de degradación de los mAbs, contribuyendo así a determinar sus mejores condiciones de almacenamiento. Se abordarán también estudios similares en fármacos tradicionales.

Resultados

En principio, y sin ser excluyentes, los BD seleccionados y su principio activo son: Remicade® (Infliximab), Mabthera® (Rituximab), Herceptin® (Trastuzumab), Erbitux® (Cetuximab) y Avastin® (Bevacizumab).

Para cada uno de estos mAbs han sido desarrollados y validados diferentes métodos analíticos para determinar la estabilidad fisicoquímica y biológica: ELISA (actividad biológica), (RP)HPLC-DAD (cuantificación), (CX)HPLC-DAD (perfil de isoformas), (SEC)HPLC-DAD (detección de agregados) y ESI-qTOF-MS (cambios en el peso molecular), estudios de degradación acelerada (actividad remanente y formación de agregados).

Estos métodos son aplicados en estudios de estabilidad en el tiempo.

29

II Workshop de Jóvenes Biotecnólogos

Conclusiones

Mediante los análisis desarrollados se pueden aportar datos que contribuyan al conocimiento de la estabilidad de diferentes BD, así como contribuir con nuevos protocolos de trabajo en los estudios de estabilidad en el tiempo de los mismos.

Estos estudios permitirán establecer recomendaciones sobre la reutilización de los mAbs, lo cual incidiría enormemente en la factura farmacéutica.

Agradecimientos

Proyecto PI 101/00201 (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, España). Agradecemos a la Unidad de Farmacia del Hospital Universitario San Cecilio de Granada la cesión de todas las muestras de BD empleadas en el mismo.

No existe conflicto de interés.



- Trabajo presentado:

➤ Poster. Título: EP-95 “*Desarrollo y validación de un método ELISA para cuantificar la actividad biológica del anticuerpo monoclonal Infliximab*”. Pág. 340.

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ELISA PARA CUANTIFICAR LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ANTICUERPO MONOCLONAL INFlixIMAB

Inmaculada Suárez González¹, Natalia Navas Iglesias¹, Antonio Salmerón García³, José Cabeza Barrera², Luis Fermín Capitán Vallvey¹

1. Dto. Química Analítica. Fdad. De Ciencias, Universidad de Granada
2. Servicio de Farmacia Hospitalaria. Hospital Universitario San Cecilio, Granada
3. Unidad de Farmacia. Hospital de Baza, Granada.
Avda. Fuente Nueva s/n. CP: 18071. Granada. Tlf: 958240796. e-mail: inmasg82@correo.ugr.es
corresponding author: Inmaculada Suárez González

RESUMEN

Infliximab (IFX) (Remicade®), es un anticuerpo monoclonal quimérico (Ab) tipo IgG1 que se une de forma específica al factor de necrosis tumoral α (TNF- α), principal mediador en enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Por tanto, IFX es usado en el tratamiento de diversas patologías en las que los niveles de TNF- α están aumentados.

Debido a su naturaleza y a su elevado coste, se ha desarrollado y validado un ELISA que permite cuantificar específicamente su actividad biológica, de manera que pueda ser aplicado en estudios de estabilidad en el tiempo para poder así establecer datos de uso posteriores a los indicados por el fabricante.

Es un ELISA indirecto basado en la reacción entre TNF- α e IFX. La cantidad biológicamente activa de IFX se pone de manifiesto mediante la señal de absorbancia obtenida (450 -650 nm).

El método ha sido validado de acuerdo con las recomendaciones de la International Conference on Harmonization (ICH guidelines), evaluando linealidad (0.2-50.0 μ g/mL), límite de detección y cuantificación (0.6 y 0.2 μ g/mL), precisión (reproducibilidad intra-día CV <10%), exactitud (% recuperación > 90%) y especificidad, estimada mediante estudios acelerados de degradación, al objeto de evaluar la actividad biológica remanente del Ab.

El método ha sido aplicado en un estudio de estabilidad en el tiempo (15 días) de disoluciones de IFX preparadas en las condiciones habituales de uso hospitalario: 10.0 y 5.0 mg/mL. Todas las muestras presentaron actividad biológica (7 días de ensayo actividad biológica del 56% y 76% respectivamente).

Actualmente siguen llevándose a cabo más experimentos para confirmar dichos resultados.

➤ Comunicación oral: CO-19 “*Estudio de la actividad biológica de Cetuximab mediante ELISA*”. Pág 61-68.

CO-19 Estudio de la Actividad Biológica de CETUXIMAB mediante ELISA

Inmaculada Suárez González¹, Natalia Navas Iglesias², Antonio Salmerón García³, José Cabeza Barrera⁴, Luis Fermin Capitán Vallvey¹

1. Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada
2. Departamento de Química Analítica e Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada
3. UGC Farmacia Granada e Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada
4. UGC Farmacia Granada e Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada, Hospital Universitario San Cecilio, Granada.

Avda. Fuentenueva s/n. CP: 18071. Granada. Tlf: 958240796. e-mail: inmasg82@correo.ugr.es
corresponding author: Inmaculada Suárez González

RESUMEN

Cetuximab (CTX) (Erbix[®]), es un anticuerpo monoclonal quimérico (Ab) tipo IgG1, usado en el tratamiento de patologías como el cáncer colorrectal metastásico (CCRM) y otros tipos de cánceres de células escamosas que afectan a la cabeza y el cuello. Se une de forma específica al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) bloqueándolo. La sobreexpresión o hiperactivación de EGFR da lugar a diferentes tipos de cánceres, por tanto, CTX, debido a su mecanismo de acción es usado en el tratamiento de los mismos.

Debido a la naturaleza y el elevado coste de CTX, en el presente trabajo se ha desarrollado y validado un método ELISA de tipo indirecto para cuantificar específicamente su actividad biológica, de manera que pueda ser aplicado en posteriores estudios de estabilidad. Esta investigación se enmarca en los estudios requeridos para extender su uso más allá de la fecha de caducidad indicada por el fabricante. El inmunoanálisis propuesto se basa en la reacción específica entre EGFR y CTX. La cantidad biológicamente activa del Ab se pone de manifiesto mediante espectrofotometría, por medidas de absorbancia.

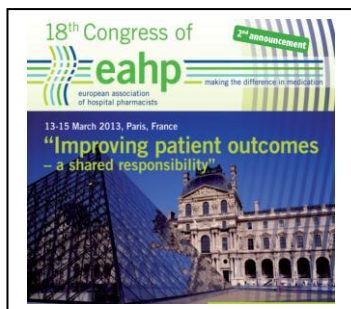
Teniendo en cuenta que CTX es un fármaco, el método ELISA desarrollado ha sido validado de acuerdo con las recomendaciones de una de las principales organizaciones internacionales que regulan los requisitos que deben cumplir los fármacos de uso humano, incluidos los métodos mediante los cuales se estudian. Por tanto, se han seguido las recomendaciones de la International Conference on Harmonization (ICH guidelines), evaluando linealidad, límite de detección y cuantificación, precisión (reproducibilidad intra-día e inter-día), exactitud (% recuperación) y especificidad, estimada mediante estudios acelerados de degradación, al objeto de evaluar la actividad biológica remanente del Ab.

El método está siendo aplicado en un estudio de estabilidad en el tiempo de disoluciones de CTX preparadas en las condiciones habituales de uso hospitalario: esto es 5.0 mg mL⁻¹.

Palabras clave: Cetuximab, Cáncer colorrectal, EGFR, ELISA

1. INTRODUCCIÓN

Cetuximab (Erbix[®]) (CTX) es un anticuerpo IgG1 monoclonal quimérico (humano-murino) producido en una línea de células de mamíferos (Sp2/0) mediante tecnología de ADN recombinante, cuya forma farmacéutica es una solución para perfusión. Cada mL de solución para perfusión contiene 5 mg de CTX (cada vial de 100 mL contiene 500 mg). Actúa de forma específica frente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) mediante su unión al dominio extracelular de éste con una afinidad aproximadamente 5 a 10 veces superior a la de los ligandos endógenos, lo cual da lugar al bloqueo de la unión de los ligandos endógenos al EGFR, provocando la inhibición de la función del receptor. Además induce la internalización de EGFR lo que puede conllevar una disminución de los receptores disponibles en la superficie celular (*downregulation*). Dado este mecanismo de acción, CTX está indicado en España, en combinación con irinotecan, para el tratamiento de pacientes



**Congreso Internacional
18th Congress of the European
Association of Hospital Pharmacists –
EAHP.**

"Improving patient outcomes: a shared
responsibility
13-15 Marzo 2013 Paris, Francia.

- Trabajo presentado:

➤ Poster. Título: TCH-014 “*Evaluation of long-term biological activity of infliximab 10 mg/ml and 5 mg/ml in NaCl 0.9 % by ELISA*”. European Journal of Hospital Pharmacy. Science and Practice. March 2013 Volume 20 Supplement 1. Pages A73-74 doi:10.1136/ejhpharm-2013-000276.205. *Impact factor: 0,471. Quartil: Pharmacology, Toxicology and Pharmaceutics (miscellaneous): Q3.*

Technology

TCH-017 DIFFERENCES IN PURITY BETWEEN BIOSIMILAR FILGRASTIMS AND COPY BIOLOGICAL FILGRASTIMS

doi:10.1136/epharm-2013-000278.202

M. Valdic, A. Skrin, Hospira Zagreb d.o.o., Quality Department, Zagreb, Croatia

Background Biosimilars are follow-on versions of peptide biological drugs, and differences in manufacturing and formulation can result in variations in physicochemical and clinical profiles. The European Medicines Agency (EMA) has set stringent standards (Ph Eur) that must be met for the approval of a biosimilar.

Purpose Standards of manufacture may differ between biosimilars approved via EMA pathways, and copy biologicals that lack approval pathways. Therefore, we undertook comparative characterisation tests of a range of biosimilar products from different global regions to determine if variations exist. This study is the first of its kind.

Materials and Methods Samples of Nivestim (N), Neupogen (Ne), Tpegarastim (T), Ratiogastim and Zarzo (Z) were obtained from the EU region, and Leucostim (L), GeSynin (G), Filgrin (F) and Neistine (Ns) were obtained from the Middle East and Africa (MENA) region. All samples were within the expiry date. Samples were analysed for impurities using iso-electric focussing (IEF) to identify differences in charge, size-exclusion high-performance liquid chromatography (SEC-HPLC) to identify differences in higher molecular weight impurities, reverse phase HPLC (RP-HPLC) to identify differences in total and individual related impurities, and ion chromatography (IC) to detect differences in F-met filgrastim and related, more acidic, impurities.

Results All biosimilars met EMA standards for IEF and SEC-HPLC analysis. Total impurities (RP-HPLC) for the EU products were in the range 1.8-2.6% and within EMA requirements (≤5.9%); however, the MENA samples contained impurities in the range 5.9% (G) - 8.2% (L), which is beyond the Ph Eur range. IC analysis revealed F-met and acidic impurities to be <0.20% for most EU products (threshold 1.0%) and 0.4% for Ne. However, for MENA compounds, these impurities comprised 0.4% (Ns) - 1.7% (G) of the samples.

Conclusions Copy biologicals from MENA have higher levels of impurities than biosimilars from the EU and do not meet EMA standards for approval.

No conflict of interest.

TCH-013 DISINFECTANT EFFICACY OF ULTRAVIOLET LIGHT IRRADIATION IN AN AUTOMATED SYSTEMS FOR THE ASEPTIC COMPOUNDING.

doi:10.1136/epharm-2013-000278.204

V. Balazic, A. Marozic, D. Prizmic, V. Ruzic, A. Paretic, N. Sabotic, AO Ospedalea, Biella, Pharmacy, Ancona, Italy; Taccioni Group, HumanCare, Mole di Masello (AN), Italy; University of Udine, Toxicological Hygienic and Environmental Section, Udine, Italy

Background Ultraviolet (UV) light irradiation is used in a variety of applications, such as food, air and water purification. The mechanism of UV disinfection differs considerably from chemical disinfectants: UV is mutagenic to bacteria, viruses and other microorganisms by damaging nucleic acids and preventing replication. However, the effectiveness of UV disinfection depends on a number of factors: time of UV exposure, power of the UV source, presence of UV barriers like airborne particles; microorganism resistance.

Purpose To study the effectiveness of UV disinfection inside APO-TECAchemo, the robot for preparing antitumour drugs in use at the University Hospital of Ancona. The Killing Rate (KR) and optimal exposure time were determined.

Eur J Hosp Pharm 2013;20(Suppl 1):A1-238

A/3

Materials and Methods 5 different microorganisms were chosen for the study in order to cover all the most common families of microbes: *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Different concentrations of each organism (from 10⁷ CFU/ml to 0.5 CFU/ml) were subjected to UV radiation for different exposure times. The plates were located inside the APO-TECAchemo compounding room, using the robot's UV equipment. The KR (logarithmic ratio of the concentration of microorganisms after and before irradiation) was plotted against the exposure time in order to chart the inactivation curves.

Results With a four-hour exposure, the UV irradiation kills all microorganisms at the highest concentrations. The location of the plates inside the system showed only a slight effect on the killing rate, probably thanks to the mirror effect of the stainless steel surfaces. *Bacillus subtilis* confirmed the strongest UV resistance, indeed 4-hour exposure was necessary to kill 10⁷ CFU/ml. The least resistant microorganism was *Escherichia coli*, which required 2 hours of UV irradiation.

Conclusions UV radiation is a fundamental step in the sterilisation of workplaces. In fact, 4-hour exposure showed an effective sterilisation (KR < 7) outcome, even for very resistant microorganisms (*Bacillus subtilis*).

No conflict of interest.

TCH-014 EVALUATION OF LONG-TERM BIOLOGICAL ACTIVITY OF INFILIXIMAB 10 MG/ML AND 5 MG/ML IN NACL 0.9% BY ELISA

doi:10.1136/epharm-2013-000278.205

V. Sabino, G. Lavotto, N. Novoa Iglesias, A. Salasmon Garcia, U. Cabana Barrera, U. Capitan Volney, University of Granada, Analytical Chemistry, Granada, Spain; Bana Hospital, Hospital Pharmacy Unit, Bana, Spain; University Hospital San Cecilio, Hospital Pharmacy Unit, Granada, Spain

Background Tumour necrosis factor alpha (TNF-α) is a pro-inflammatory cytokine, the main mediator in inflammatory and autoimmune diseases, as well as during various attacks on cells such infections. It is therefore involved in the course of a large number of pathologies such as rheumatoid arthritis, Crohn's disease, psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis, plaque psoriasis and ulcerative colitis. Infliximab (Remicade) is a chimeric monoclonal antibody (75% human, 25% murine) which acts by binding to TNF-α and blocking its effect. The cost of treatment with infliximab is quite high and the stability indicated by the manufacturer once the vial is opened is 24 hours.

Purpose The purpose of this research has been to evaluate the biological activity of infliximab when reconstituted and diluted to 10.0 mg/ml and 5.0 mg/ml in NaCl 0.9% in a long term stability study up to 15 days. A study of the drug degradation has been also tackled to check any remaining activity.

Materials and Methods An indirect non-competitive ELISA immunoassay was developed based on the use of ELISA plates sensitised with TNF-α. The plates were incubated 'overnight' at 4°C using recombinant TNF-α from E. Coli at a concentration of 1 μg/ml. The immunoassay was validated in terms of calibration function (from 0.2 to 50.0 μg/ml), detection limit (0.06 μg/ml), precision as within-day reproducibility (relative standard deviation lesser than 10%), and accuracy as percentage of recovery (higher than 90%). The infliximab solutions of 10.0 mg/ml and 5.0 mg/ml in NaCl 0.9% were stored refrigerated at 4°C protected from daylight. The biological activity of these solutions was tested periodically up to 15 days by the ELISA method developed. The ELISA was also used to study the drug degradation in a stress study involving the exposure of samples of infliximab (50.0 mg/ml) for 24 hours to different stress conditions: basicity (NaOH 0.1M), acidity

Technology

(HCl 0.1M), oxidation (H₂O₂ 1% and 10%), temperature (50°C and ultraviolet light (250 mW, 25°C).

Results All the samples analysed showed considerable biological activity, this biological activity was surprisingly even observed in those samples subjected to strongly stressed conditions. For the reconstituted sample of 10.0 mg/ml, a remaining activity of 52% was observed. In the case of the 5.0 mg/ml sample, the remaining activity decreased to 85%.

The biological activity measured using the samples submitted to stress conditions indicated a remaining activity at least equal to the upper concentration studied in the calibration function, i.e. 50 μg/ml. These samples were analysed directly, without dilution, because they had been expected to lose their biological activity totally.

Conclusions The biological activity of infliximab solutions of 10.0 mg/ml and 5.0 mg/ml in NaCl 0.9% when stored refrigerated at 4°C protected from the daylight was maintained at 52% and 85% respectively up to 7 days. The biological activity was also shown in infliximab samples submitted to stress conditions. More experiments are currently being conducted to confirm these results.

Acknowledgement Financial support was provided by the Project P110/00021 (Istituto Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Spain). We want to thank the Hospital Pharmacy Unit of the University Hospital of San Cecilio who kindly supplied all the infliximab samples.

No conflict of interest.

TCH-019 EVALUATION OF THE CHEMICAL AND PHYSICAL STABILITY OF SODIUM DICHLOROACETATE. AN ORPHAN DRUG FOR RARE METABOLIC DISEASES

doi:10.1136/epharm-2013-000278.208

V. Capozzi, A. Tomasi, P. Florio, M. Cristani, G. Rizza, ASP of Reggio, Hospital Pharmacy Reggio, Italy; University of Messina, Pharmaceutical biological Department Faculty of Pharmacy, Messina, Italy

Background Sodium dichloroacetate (Na-DCA), not a patented substance, which is used in the treatment of rare diseases with congenital defects of the pyruvate-dehydrogenase complex (PDHC), produces a marked reduction in acid-base imbalance and lactic acid levels toxic to the brain parenchyma.

Purpose To evaluate the physical-chemical stability of sodium dichloroacetate in aqueous solution.

Materials and Methods Six grammes of sodium dichloroacetate were dissolved in 60 ml of water for injections (WFI). The exact concentration of the solution obtained was calculated by extrapolation from a calibration curve, recording the absorbance value at the wavelength of 198 nm of suitable standard solutions (5-50 μg/ml) of sodium dichloroacetate dissolved in water for injections (WFI). The solution was divided between 3 dark glass containers. The first container was kept at room temperature (r.t.), the second one in a refrigerator at +4°C, the third one in a freezer at -20°C. The stability of the samples, kept at different temperatures, was checked at 51, 45, 54 and 60 days, for each sample, using appropriate dilution, absorbance values were recorded (λ = 198 nm) and through the sodium dichloroacetate calibration curve made daily, the concentrations of the substance being analysed were calculated. The results were expressed as percentages of sodium dichloroacetate in solution.

Results Samples kept at +4°C were stable throughout the observation period. Samples kept at r.t. were stable until 30 days from preparation, while afterwards a slow and gradual decay could be observed. Samples kept at -20°C showed a progressive increase in concentration.

Conclusions The observed increase in samples at -20°C can be explained by the formation of a secondary species with a higher extinction coefficient than sodium dichloroacetate. Data suggest that sodium dichloroacetate solutions should not be stored at -20°C or at r.t. for more than 30 days.

No conflict of interest.

TCH-016 EXTENDED CHEMICAL-PHYSICAL STABILITY OF 25 mg/ml AZACITIDINE SUSPENSION

doi:10.1136/epharm-2013-000278.207

C. Gallo, V.G. Azara, G. Luardi, Spedini Civil Hospital, Pharmacy, Brescia, Italy

Background Azacitidine biological activity of infliximab solutions of 10.0 mg/ml and 5.0 mg/ml in NaCl 0.9% when stored refrigerated at 4°C protected from the daylight was maintained at 52% and 85% respectively up to 7 days. The biological activity was also shown in infliximab samples submitted to stress conditions. More experiments are currently being conducted to confirm these results.

Purpose To assess the chemical-physical stability of azacitidine suspension 25 mg/ml.

Materials and Methods Analysis followed an approved protocol.

The validity of the reference material (azacitidine-Sigma Aldrich-batch-SLBD1299V) was checked before starting the analysis. 100 mg of drug was reconstituted with 4 ml of refrigerated (2-8°C) WFI. The sample and standard suspension were stored at 5°C in a temperature-controlled refrigerator.

For International Conference Harmonization guideline the solution can be considered stable if the % assay of azacitidine with respect to the initial value is reduced by less than 5%.

Azacitidine concentrations were determined by a stability-indicating HPLC method under the following conditions: X-Terra RP18 column (150 x 4.6 mm, 5 μm); 4°C autosampler temperature; phosphate buffer pH = 6.5 and acetonitrile/water = 40/60 as mobile phase; 0.8 ml/min flow rate; 230 nm UV detection; 20 μl injection volume.

At these conditions the sample and a standard suspension were analysed at 0/22/24/48/72/96/168 hours.

The % assay of azacitidine was calculated at each cheque point and the results were compared with the assessed 100% values for assay at t₀.

Results The azacitidine assay (%) determined by HPLC is reported in the table below.

Average values obtained by triplicate injections at each cheque point are reported.

Conclusions The variation of the % assay of azacitidine with respect to the initial value is less than 5% for at least 48 hours.

A microbiological study on azacitidine suspension is ongoing at our hospital. Positive results will allow us to use unopened azacitidine suspension within 48 hours of reconstitution with considerable cost savings.

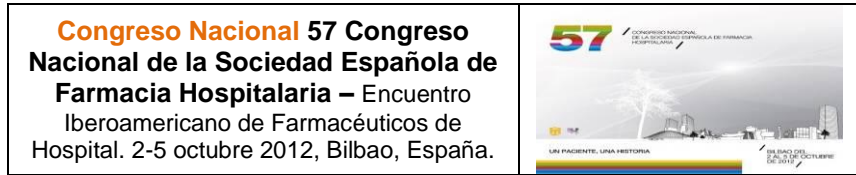
Abstract TCH-016 Table 1

Time(hour)	% Azacitidine assay	% Azacitidine assay vs. t ₀ initial value
0h	110.73	102.62
22h	108.97	101.80
24h	107.90	100.90
48h	103.87	96.27
72h	98.61	90.89
96h	101.04	93.64
168h	87.18	80.80

No conflict of interest.

Eur J Hosp Pharm 2013;20(Suppl 1):A1-238

A/4



- Trabajo presentado:

➤ Poster. Título: 1352 “*Desarrollo de un inmunoensayo para el estudio de la estabilidad de Infiximab*”. LIBRO DE ABSTRACT: **Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria**. Encuentro Iberoamericano de Farmacéuticos de Hospital “Un paciente, Una historia”. Comunicaciones Científicas: Depósito Legal: BI-1629/2012. ISBN: 978-84-695-6370-0. Pág. 436.



1352. DESARROLLO DE INMUNOENSAYO PARA ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE INFILIXIMAB

AUTORES: Salmerón-García A, Suárez González I, Navas Iglesias N, Medarde Caballero C, Cabeza Barrera J, Capitán Vallvey LF.

Hospital de Baza. Granada. España

OBJETIVOS: El objetivo del presente trabajo es el desarrollo de un inmunoensayo tipo ELISA que permita cuantificar específicamente la actividad biológica del fármaco biotecnológico Infiximab. De esta forma podrá evaluarse la misma en condiciones diferentes a las indicadas específicamente por el fabricante.

MATERIALES Y MÉTODOS: Se ha evaluado el empleo del Factor de Crecimiento Tumoral alfa (TNF- α), dado que es la proteína frente a la cual se une específicamente el anticuerpo Infiximab, siendo esta unión la base de su acción farmacológica. Se ha desarrollado un método ELISA tipo sándwich basado en el uso de placas de microtitulación sensibilizadas con TNF- α e incubadas "overnight" a 4°C. Tras dicha incubación, sobre estas placas se adiciona el anticuerpo monoclonal, Infiximab reconstituido en condiciones de uso hospitalario, diluido de forma apropiada en tampón hidrogenocarbonato/carbonato de sodio pH 9,6 0,1M, y se determina la cantidad biológicamente activa de éste adicionando como conjugado un anticuerpo IgG antihumano marcado con peroxidasa. El sustrato de la reacción usado es OPD (Orto-fenil diamino tetrahidroclorido). La reacción termina mediante la adición de ácido sulfúrico 1M como reactivo de parada. La absorbancia obtenida es el resultado de la diferencia de las medidas realizadas a 450 y 620 nm mediante el uso de un lector de placas de 96 pocillos y los resultados son analizados con el software XFluor4TM. El tratamiento estadístico de los datos para llevar a cabo la validación del método se hace mediante el uso del software Statgraphics Plus 5.1

RESULTADOS: El ensayo ELISA desarrollado ha sido validado en términos de reproducibilidad, rango dinámico del ensayo, incluyendo la estimación de la función de calibrado, precisión (como estudio de recuperación), precisión del ensayo "intradía e interdía" (como %CV) y sensibilidad (como límites de detección y cuantificación), obteniéndose en todos los casos valores satisfactorios.

CONCLUSIONES: El método ELISA desarrollado permite cuantificar la actividad biológica de Infiximab reconstituido en condiciones de uso hospitalario, así como la realización de estudios de estabilidad del mismo a largo plazo.

AGRADECIMIENTOS: Este trabajo ha sido financiado por fondos recibidos mediante el proyecto FIS PI10/00201 Instituto Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad. Agradecemos también las facilidades para la realización del mismo a FIBAD (Fundación pública andaluza para la investigación biosanitaria de andalucía oriental Alejandro Otero).

1011. DISEÑO Y EJECUCIÓN DE UN PLAN DE PETICIÓN NORMALIZADO PARA MEDICAMENTOS INTRAVITREOS EN CONDICIONES ESPECIALES

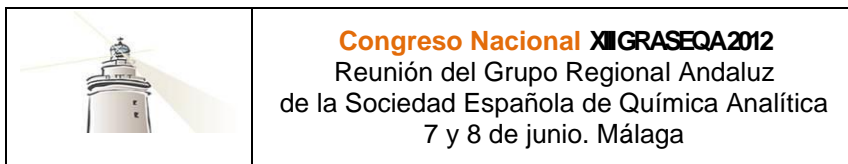
AUTORES: Pérez León, M, Sangil Monroy, N, Diaz Pestano, M, Herrera Ortega, G, Molero Gómez, R, Varela González, M.

Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín. Las Palmas. España

OBJETIVOS:

- Diseño de un sistema informatizado de petición, control, seguimiento y dispensación para medicamentos de administración intravitrea en oftalmología y con condiciones especiales de dispensación (medicamentos en situaciones especiales, petición individualizada).
- Compatibilización, adaptación e integración del sistema diseñado en la Historia Clínica informatizada del Hospital.
- Evaluar el impacto de la aplicación en la práctica diaria de la prescripción, validación y dispensación de estos medicamentos.

MATERIAL Y MÉTODOS: Antea la complejidad de los trámites necesarios (prescripción individualizada, hoja de solicitud por medicamento), el elevado número de peticiones, de pacientes y de médicos implicados en la solicitud de tratamientos por parte del servicio de oftalmología, se acordó por parte de ambos servicios, y conjuntamente con el servicio de informática, la creación de una herramienta específica de solicitud.



- Trabajo presentado:

➤ Poster. Título:

▪ AC10 ***“Caracterización proteómica del fármaco biotecnológico Infliximab en condiciones de uso hospitalario mediante mapa peptídico por MALDI-TOF-MS”.***

CARACTERIZACIÓN PROTEOMICA DEL FÁRMACO BIOTECNOLÓGICO INFLIXIMAB EN CONDICIONES DE USO HOSPITALARIO MEDIANTE MAPA PEPTÍDICO POR MALDI-TOF-MS

Autores: Inmaculada Suárez González¹, Natalia Navas Iglesias¹, Antonio Salmerón García², José Cabeza Barrera², Antonio Lario Simón³, M. Victoria Longobardo Polanco³, Luis Fermin Capitán Vallvey³

1. Dto. Química Analítica. Fdad. De Ciencias, Universidad de Granada

2. Servicio de Farmacia Hospitalaria. Hospital Universitario San Cecilio, Granada

3. CSIC (Centro Superior Investigaciones Científicas), Unidad Proteómica, Instituto de Parasitología y Biomedicina “López Neyra”, Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, Granada.

Avda. Fuentenueva s/n. CP: 18071, Granada. Teléfono: 958/240796, fax 958/243328, e-mail: inmasg82@correo.ugr.es

Resumen:

Infliximab es el principio activo del medicamento comercial Remicade®. Es un anticuerpo monoclonal quimérico dirigido contra la acción del factor de necrosis tumoral α (TNF- α), implicado en el curso de patologías de tipo inmune e inflamatorio. Remicade® se presenta como un polvo concentrado para solución por perfusión (100 mg/vial). Se reconstituye con agua para inyectables, se diluye con solución salina y es administrado mediante infusión intravenosa.

El objetivo del presente estudio es la caracterización molecular mediante huella peptídica de Infliximab reconstituido y diluido en las condiciones habituales de uso hospitalario, usando para ello la técnica de espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF-MS).

Infliximab fue reconstituido a partir del medicamento Remicade®, en agua para inyectables a una concentración final de 10,0 mg/ml, y diluido en una solución de cloruro sódico al 0,9% obteniéndose concentraciones finales de 2,0 mg/ml y 0,5 mg/ml. Estas muestras de Infliximab fueron sometidas a reducción mediante el uso de ditioneitol (DTT) para la eliminación de los puentes disulfuro entre las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo, y alquiladas con yodoacetamida en oscuridad durante 30 minutos. Una vez libres y alquiladas las cadenas peptídicas, se someten a digestión con tripsina y se analizan mediante MALDI-TOF-MS obteniéndose así las correspondientes huellas peptídicas.

Mediante el estudio detallado de las correspondientes huellas peptídicas se evalúan cambios en la integridad molecular del anticuerpo como consecuencia del medio en el que se encuentra.

AGRADECIMIENTOS:

- Apoyo financiero proporcionado por el Proyecto PI 101/00201 (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, España).
- Grupo FQM-118. Dto. Química Analítica, Fac. de Ciencias, Universidad de Granada.

- PF15 **“Caracterización proteómica del fármaco biotecnológico Rituximab en condiciones de uso hospitalario mediante mapa peptídico por MALDI-TOF-MS”**.

**CARACTERIZACIÓN PROTEÓMICA DEL FÁRMACO
BIOTECNOLÓGICO RITUXIMAB EN CONDICIONES DE USO
HOSPITALARIO MEDIANTE MAPA PEPTÍDICO POR
MALDI-TOF-MS**

Autores: Natalia Navas Iglesias, Antonio Salmerón García, José Cabeza Barrera, Antonio Lario Simón, M. Victoria Longobardo Polanco, Inmaculada Suárez González, Raquel Ortega López, Luis Fermín Capitán Vallvey

*Dto. Química Analítica. Ftad. De Ciencias, Universidad de Granada
Avda. Fuentenueva s/n. CP: 18071. Granada. Teléfono: 958/243388, fax, e-mail:natalia@ugr.es*

Resumen:

Rituximab constituye el principio activo del medicamento comercializado Mabthera®. Se trata de un anticuerpo monoclonal quimérico murino/humano obtenido mediante ingeniería genética. Actúa uniéndose de forma específica al antígeno transmembrana CD20, fosfoproteína no glucosilada expresada tanto en células B normales como tumorales. Está implicado por tanto en ciertos tipos de linfomas, siendo el más conocido el Linfoma no HodgKins de células B. Por tanto, y debido a su mecanismo de acción, Rituximab está indicado en el tratamiento de varios linfomas foliculares. Mabthera está disponible en viales de un solo uso que contienen 100mg/10ml y 500mg/50ml de concentrado para solución para perfusión.

Mediante el presente estudio se puso a prueba la integridad molecular de Rituximab en su forma de presentación y diluido en las condiciones habituales de uso hospitalario mediante un estudio proteómico llevado a cabo con el uso de espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz detectada por tiempo de vuelo (MALDI-TOF).

Rituximab (100mg/10ml) fue diluido en solución salina fisiológica (SSF) para obtener concentraciones finales de 4.0 y 1.0mg/ml. Los tres tipos de muestras fueron sometidas a reducción mediante el uso de ditioneitol (DTT) y alquiladas con yodoacetamida en oscuridad durante 30 minutos. A continuación, dichas muestras son digeridas con tripsina a pH 8,5 durante 4 horas a 37°C. Las muestras digeridas se cargaron sobre las placas MALDI usando para ello 5mg/ml de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en 0,1% de ácido trifluoroacético, usando como matriz acetonitrilo 50%. Cada muestra digerida fue analizada cinco veces por espectrometría de masas MALDI-TOF usando un vuelo DE-PRO (Applied Biosystems) en modo reflector positivo.

Mediante este estudio se logró obtener la huella peptídica para los tres tipos de muestras del fármaco biotecnológico Rituximab inmediatamente después de su preparación. Por tanto, podemos afirmar que la integridad molecular de Rituximab puede ser descrita y caracterizada mediante esta técnica analítica. Además, dicho análisis puede ser utilizado para la realización de un estudio de estabilidad a largo plazo del anticuerpo monoclonal Rituximab diluido con SSF y almacenado bajo refrigeración a 4°C y congelado a -20°C, ya que los posibles cambios en la estructura del mismo pueden ser detectados por los cambios en la PFM correspondiente.

AGRADECIMIENTOS:

- Apoyo financiero proporcionado por el Proyecto PI 101/00201 (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, España).
- Grupo FQM-118. Dto. Química Analítica, Ftad. de Ciencias, Universidad de Granada.

➤ Presentación Flash: **PF18 “Factor de necrosis tumoral α (TNF- α) como indicador de la actividad del fármaco biotecnológico Infliximab en un inmunoensayo ELISA”.**

FACTOR DE NECROSIS TUMORAL α (TNF- α) COMO INDICADOR DE LA ACTIVIDAD DEL FÁRMACO BIOTECNOLÓGICO INFlixIMAB EN UN INMUNOENSAYO ELISA

Autores: **Inmaculada Suárez González¹**, Natalia Navas Iglesias¹, Antonio Salmerón García², José Cabeza Barrera², Luis Fermín Capitán Vallvey¹

2. Dto. Química Analítica. Ftad. De Ciencias, Universidad de Granada

3. Servicio de Farmacia Hospitalaria. Hospital Universitario San Cecilio, Granada
Avda. Fuentenueva s/n. CP: 18071. Granada. Teléfono: 958/240796, fax 958/243328,
e-mail:inmasg82@correo.ugr.es

Resumen:

Infliximab es un anticuerpo monoclonal quimérico (75% humano-25% murino) IgG1 constituido por una región constante de tipo humano y regiones variables de tipo murino. Es el principio activo del medicamento comercial Remicade®. Actúa uniéndose con alta afinidad tanto a la forma soluble como a la de transmembrana del factor de necrosis tumoral α (TNF- α), inhibiendo de esta forma la actividad biológica del mismo, ya que evita que el TNF- α pueda unirse a sus receptores. Está indicado en el tratamiento de pacientes con artritis reumatoide, enfermedad de Chron, artritis psoriásica, psoriasis en placas, espondilitis anquilosante y colitis ulcerosa.

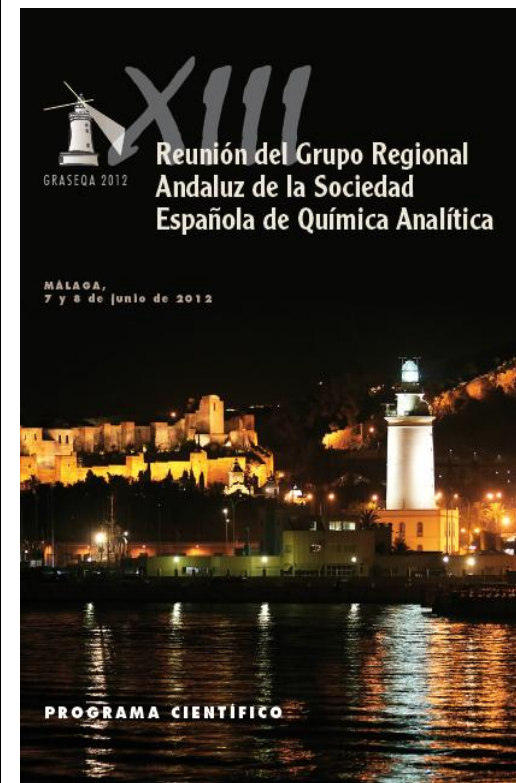
Debido a la naturaleza proteica de este fármaco, su análisis debe contemplar no sólo aspectos químicos, sino también aquellos relacionados con su actividad biológica. El objetivo del presente trabajo es el desarrollo de un inmunoensayo tipo ELISA que permita cuantificar específicamente la actividad biológica del fármaco biotecnológico Infliximab. De esta forma podrá evaluarse la misma en condiciones diferentes a las indicadas específicamente por el fabricante. Para ello, se ha evaluado el empleo de TNF- α , dado que es la proteína frente a la cual se une específicamente, siendo esta unión la base de su acción farmacológica.

Se propone por tanto el desarrollo de un método ELISA tipo sándwich basado en el uso de placas de microtitulación sensibilizadas con TNF- α . Sobre estas placas se adiciona el anticuerpo monoclonal, Infliximab, y se determina la cantidad biológicamente activa de éste adicionando como conjugado un anticuerpo IgG antihumano marcado con peroxidasa. El sustrato de la reacción usado es OPD (Orto-fenil diamino tetrahidroclorhidro). La reacción termina mediante la adición de ácido sulfúrico 1M como reactivo de parada. La absorbancia obtenida es el resultado de la diferencia de las medidas realizadas a 450 y 620 nm mediante el uso de un lector de placas de 96 pocillos y los resultados son analizados con el software XFluor4™.



AGRADECIMIENTOS:

- Apoyo financiero proporcionado por el Proyecto PI 101/00201 (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, España).
- Grupo FQM-118. Dto. Química Analítica, Ftad. de Ciencias, Universidad de Granada.



XIII
Reunión del Grupo Regional
Andaluz de la Sociedad
Española de Química Analítica

GRASEQA 2012

MÁLAGA,
7 y 8 de junio de 2012

PROGRAMA CIENTÍFICO

PROGRAMA CIENTÍFICO

JUEVES 7 DE JUNIO

- 9:00 Recogida de la documentación
- 10:00 Inauguración de la Reunión: Sra. Adhaida de la Calle Martín, Rectora Magnífica de la Universidad de Málaga
- 10:30 CI-1: *Over company deals: la Universidad*
Prof. Dr. Agustín Costa García (Universidad de Oviedo)
Moderador: Prof. Dr. José Luis Martínez Vidal (Universidad de Almería)
- 11:30 CAPE
- Sesión I. Moderador: Prof. Dr. Antonio Molina Díaz**
- 12:00 CO-1: *Determinación simultánea de residuos de plaguicidas y veterinarios en pinos mediante espectrometría de masas de alta resolución; comparación entre Q-TOF y Orbitrap.* María del Mar Aguilera Lutz (Universidad de Almería)
- 12:20 CO-2: *Array CSP-galvanostático basado en porfirinas para el análisis de muestras líquidas.* Sonia Capel Cuevas (Universidad de Granada)
- 12:40 CO-3: *Determinación directa en muestras sólidas mediante espectrometría de absorción atómica de alta resolución y con fuente continua.* Ramón Esteban Traid (Inycom)
- 13:00 CO-4: *Determinación de 15 micotoxinas en cardo mariano mediante HPLC-MS/MS empleando tratamientos de muestra alternativos.* Natalia Arroyo Manzanares (Universidad de Granada)
- 13:20 CO-5: *Cromatografía iónica capilar: un nuevo avance en la determinación de bromatos en aguas.* Jessica Lozano Gallego (Vertec Technical)
- 13:40 CO-6: *Cuantificación de aceite de oliva en vínegras usando un modelo PLS de mezclas binarias de aceites vegetales, a partir de zonas seleccionadas de la huella dactilar de los fitosteroles.* Estefanía Pérez Castaño (Universidad de Granada)
- 14:00 ALMUERZO
- Sesión II. Moderadores: Prof. Dra. M. Teresa Siles Contero y Prof. Dra. Elisa Yerrada Alonso**
- 15:45 PF-1: *Determinación sensible de LSD y sus meta-bolitos en muestras de orina y sangre mediante microextracción líquido-líquido dispersiva y electroforesis capilar con detección por fluorescencia inducida por láser.* Diego Alrado Rodríguez (Universidad de Granada)
- 15:50 PF-2: *Study of bioavailability of heavy metals in sediments from Guadalupe River and Malaga Bay, Malaga (Spain).* Manuel L. Alonso Castillo (Universidad de Málaga)
- 15:55 PF-3: *Método sensible y selectivo para la determinación de plaguicidas en fruta mediante GC-NCI-MS/MS.* Noelia Edmondo Valle (Universidad de Almería)
- 16:00 PF-4: *Flow injection solid phase extraction coupled with online hybrid generation inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of Sb, Sn and Bi in environmental water.* Ana Galvo Fornieles (Universidad de Málaga)
- 16:05 PF-5: *La Electroforesis Capilar para la detección de materiales de apresto en el patrimonio documental.* M. Esther Castillo Valdívila (Universidad de Granada)
- 16:10 PF-6: *Microextracción en fase sólida dispersiva usando sílice modificada con ligando iónico para la determinación de plaguicidas organofosforados en aguas.* Francisco Galán Caro (Universidad de Córdoba)
- 16:15 PF-7: *Determination of halonitroethanes in treated water.* Isabel Montesinos González (Universidad de Córdoba)
- 16:20 PF-8: *Estudio metabólico del ratón de laboratorio Mus musculus sometido a exposiciones controladas a arsénico inorgánico. Aplicación al ratón de vida libre Mus spectus.* Miguel Ángel García Sevillaño (Universidad de Huelva)
- 16:25 PF-9: *Caracterización de complejos metálicos de metalotioínas en hígado y riñón de Mus musculus sometido a exposiciones de arsénico a cadavero.* Raúl González Domínguez (Universidad de Huelva)
- 16:30 PF-10: *Aplicación de la microextracción en fase líquida mediante electroembranas (EME) para la determinación de fluorquinolonas en aguas residuales urbanas.* Miguel Ángel Bello López (Universidad de Sevilla)
- 16:35 PF-11: *Aplicación de la extracción líquido-líquido dispersiva a la determinación de 5-nitroimidazoles en muestras acuosas mediante cromatografía capilar electrocinética micelar.* Maykel Hernández Mesa (Universidad de Granada)

- 16:40 PF-12: *Evaluación de los nanocuernos de carbono de pared simple como material absorbente en microextracción en fase sólida dispersiva.* Juan Manuel Jiménez Soto (Universidad de Córdoba)
- 16:45 PF-13: *Quantitative determination of TiO₂ for the optimization of the synthesis biogenic TiO₂ ceramics.* María del Mar López Guerrero (Universidad de Málaga)
- 16:50 PF-14: *Determinación de 2,4,6-tricloroanisoles en muestras de agua y vino combinando la microextracción en gota de líquido iónico y la espectrometría de movilidad iónica.* Isabel Mirques Sillero (Universidad de Córdoba)
- 16:55 PF-15: *Caracterización proteómica del fármaco biotecnológico Ritzimab en condiciones de uso hospitalario mediante mapa peptídico por MALDI-TOF/MS.* Natalia Navas Iglesias (Universidad de Granada)
- 17:00 PF-16: *Determinación de compuestos orgánicos volátiles en agua mediante microextracción con frías agudas acoplada a cromatografía de gases-espectrometría de masas.* Mercedes Bokilén Pijuan (Universidad de Córdoba)
- 17:05 PF-17: *Determination of ultra-trace amounts of Cd, Pb and Hg in environmental water by SPME-HG-AAS-MS.* Irene Sánchez Trujillo (Universidad de Málaga)
- 17:10 PF-18: *Factor de necrosis tumoral a (TNF- α) como indicador de la actividad del fármaco biotecnológico Infliximab en un inmunosuegro.* Elisa Inmaculada Suárez González (Universidad de Granada)
- 17:15 **SESIÓN DE CARTELES Y CAPE**
- Sesión III. Moderador: Prof. Dra. M. Luisa Cabalín Robles**
- 18:00 CO-7: *Simplificación del tratamiento de muestra en análisis quiral con el uso de disolventes nanoestructurados.* María del Carmen Caballo Linares (Universidad de Córdoba)
- 18:20 CO-8: *Micro liquid liquid extraction combine d with large-volume injection gas chromatography for the determination of halobutaldehydes in treated water.* María Serrano Ortiz (Universidad de Córdoba)
- 18:40 CO-9: *Contaminantes: nuevas fronteras en el análisis.* Claudia P.B. Martins (Thermo Fisher Scientific)
- 19:00 CO-10: *Microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca: una alternativa verde para la preparación de muestras.* Carolina Menéndez de la Portilla (Universidad de Cádiz)
- 19:20 CO-11: *Comparación de tres métodos multiresiduo para el análisis de plaguicidas en té mediante GC y LC acopladas a espectrometría de masas en tandem. Validación y seguimiento de muestras reales usando un método QuEChERS modificado.* Ana Lozano Perálvarez (Universidad de Almería)
- 21:30 Cena GRASEQA 2012. Real Club Mediterráneo

VIERNES 8 DE JUNIO

- Sesión IV. Moderador: Prof. Dr. Luis Fermín Capitán Vallvey**
- 09:30 CO-12: *Control Espectroscópico de Cambios Químicos en Acetiles de Fritura.* Diego L. García González (Instituto de la Grasa, Sevilla)
- 09:50 CO-13: *GC/Q-TOF para análisis dirigidos, no dirigidos y desconocidos: los beneficios de la alta resolución, exactitud de masa y velocidad de adquisición para MS y MS/MS.* Jaume Carles Morales Sediles (Agilent)
- 10:10 CO-14: *Microextracción Equilada con membrana agitada.* María del Carmen Alcañal León (Universidad de Córdoba)
- 10:30 CO-15: *Nuevas herramientas para nuevos retos en espectrometría de masas: análisis de SWATH.* Antonio Serra Sana (AB Sciex Spain)
- 10:50 CO-16: *Metabolómica y espectrometría de masas en el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer.* Raúl González Domínguez (Universidad de Huelva)
- 11:10 CAPE
- 11:45 CI-2: *Análisis Verde sin Química?*
Prof. Dr. Miguel de la Guardia Ciganda (Universidad de Valencia)
Moderador: Prof. Dr. José Manuel Cano Pavón (Universidad de Málaga)
- 12:45 **Asamblea General del GRASEQA**
- 13:45 Cierre de la Reunión y cóctel de despedida

<p>Congreso Internacional</p>	 <p>“Special patients groups-hospital pharmacists creating standardas for care”. 21-23 March, 2012 Milan, Italy</p>
<p>17th Congress of  eahp european association of hospital pharmacists</p>	

- Trabajo presentado:

➤ Poster. Título: TCH038: ***“Development of an ELISA assay for the determination of the antibody Infliximab in hospital conditions of use”.*** European Journal of Hospital Pharmacy. Science and Practice. April 2012 Volume 19 Issue 2. Pages 150-151. doi:10.1136/ejhpharm-2012-000074. *Impact factor and Quartil: Pharmacology, Toxicology and Pharmaceutics (miscellaneous) ongoing.*

Abstracts

heparine prepared in ringer lactate solution has been proposed to be used.

Purpose The purpose of this research has been to study the mixture daptomicine/heparine sodium prepared in ringer lactate solution since no information upon its chemical and physical compatibility has been found in the consulted bibliography. A high performance liquid chromatography method (HPLC) has been developed following the International Conference on Harmonisation guidelines (ICH) for this purpose.

Materials and methods The chromatographic separation was performed in a C-18 column. Due to the complexity of the mixture, it was necessary to apply a gradient in the mobile phase to achieve complete separation of the compounds, also to get separation from the degradation products of daptomicine. The started mobile phase composition was water acetonitrile containing 0.1% of trifluoroacetic (60%/40%). The entire compounds were separated in 10 min. The detection was performed using a Diode Array Detector.

Results The linearity, accuracy, reproducibility, robustness and specificity of this HPLC method have been validated following the ICH guidelines. In fact, the HPLC method considered the degradation products that were detected when the mixture was submitted to accelerated stress conditions. The method was optimised to ensure that degradation products will not interfere in the determination of daptomicine/heparine when analysing the mixture. Recoveries higher than 90.0% of the initial concentration were found when analysing the mixture daptomicine/heparine in ringer sodium lactate in preloaded syringes in a long term stability study (15 days).

Conclusions The method here propose has been validated following the ICH guidelines to be used as indicating stability one. Thus, it has been used in the stability study of the mixture daptomicine/heparine in ringer sodium lactate in preloaded syringes since no information has been previously published about its chemical and physical compatibility. This study has demonstrated the stability of the mixture during the time tested (15 days).

Competing interests None.

TD1027 STABILITY OF TWO METHOTREXATE ORAL FORMULATIONS

J.F. Muñoz Vázquez, S. Valero García, M. Amat Díaz, E. López Biri, M.N. Vila Clotegues, J.L. Poveda Acosta Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Servicio de Farmacia, Valencia, Spain

10.1136/ajpharm-2012-000074.173

Background Pharmaceutical industry does not always provide suitable preparations for paediatric population. In these situations formulations should be developed for small scale compounding in hospital pharmacies, especially when cytotoxic drugs are involved.

Purpose Some guidelines for non-sterile pharmaceutical compounding preparations (eg, USP797) recommends in absence of stability information, an expiry date of 14 days under refrigeration for liquid preparations. The aim of the study is to develop a methotrexate oral formulation that yields stable for at least 25 days, an adequate period for three weekly administrations of one chemotherapy cycle.

Materials and methods Two formulations of 2.5 mg/ml were prepared by dissolving respectively tablets or injectable solution of methotrexate with Ora-Plus and Ora Sweet SF mixed in a 1:1 ratio. Preparations packed in amber coloured bottles were kept at 2-8° C. Samples were taken at 1, 7, 15, 25 days, and were analysed for appearance, pH, microbiological growth

and methotrexate concentrations by Fluorescence Polarisation Immunoassay (FPIA) and ultraviolet-visible spectroscopy (UV-S) at 370 nm only with the solution (no supported for suspension). Assays were specific for methotrexate (without cross-reactivity with metabolites) and calibrated with a known concentration. A stability study has been performed on these two formulations. Samples were diluted 1/100 with Xystrans Dilution Buffer. In FPIA was also performed the 1:100 dilution protocol of TDX/7DxFLx analyser.

Results Both formulations show stability for at least 25 days, with remaining content of methotrexate of 96.76% in suspension and 97.06% (FPIA) or 96.20% (UV-S) in solution. Appearance assay (no odour or colour changes), pH (5.0) and microbiological growth (negative) in all samples were appropriate and similar for both formulations.

Conclusions Methotrexate can be extemporaneously prepared in suspension or solution and stored at least 25 days under refrigeration without significant degradation. For paediatric patients who cannot swallow tablets, these formulations provide an accurate and suitable option for administering oral methotrexate.

Competing interests None.

TD1028 DEVELOPMENT OF AN ELISA ASSAY FOR THE DETERMINATION OF THE ANTIBODY INFILIXIMAB IN HOSPITAL CONDITIONS OF USE

A. Saborido, A. Saborido, J. Caboz, L.F. Capitán, N. Navas University of Granada, Analytical Chemistry, Granada, Spain; Hospital Universitario San Cecilio, Servicio de Farmacia Hospitalaria, Granada, Spain

10.1136/ajpharm-2012-000074.174

Background Infliximab (Remicade®) is a chimeric human-murine antihuman tumour necrosis factor (TNF) monoclonal antibody (75% human; 25% murine). It is composed of human constant and murine variable regions. It is produced by a recombinant cell line cultured by continuous perfusion. Infliximab binds to the soluble and transmembrane forms of tumour necrosis factor α (TNF α) and inhibits binding of TNF α with its receptors. It is approved for patients with rheumatoid arthritis, Crohn's disease, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, plaque psoriasis and ulcerative colitis. People with certain diseases have too much TNF α that can cause the immune system to attack normal healthy parts of the body. Thus, infliximab can block the damage caused by too much TNF α .

Purpose The purpose of this research has been to develop an ELISA assay for the quantification of infliximab when reconstituted in sterile water for injection to give final concentrations of 10.0 mg/ml, 2.0 mg/ml and 0.5 mg/ml.

Materials and methods A direct and non-competitive ELISA test has been developed to determine infliximab. This immunometric test has been based the use of coated ELISA plates with infliximab. The plates were incubated overnight at 4°C using samples of the reconstituted infliximab diluted appropriately in buffer carbonate/bicarbonate pH 9.6 (1:1). The final concentrations between 1.0 and 500.0 ng/mL. Blocker was then added and incubated for two h at 37°C. Then plates were incubated 30 min after the addition of antihuman IgG prototype conjugated to the sensitised infliximab plates. At the end of the incubation period the substrate (OPD - o-phenylenediamine dihydrochloride) was added to each well. The reaction terminated by addition of sulphuric acid (1.0 M). The absorbance was obtained by subtracting the measurements at 450 and 620 nm using a 96-well plate reader and the results

analysed using the XFluor4 software. Statistical data treatment for the validation of the method were performed using Stargraphics Plus 5.1 software.

Results The infliximab ELISA method has been validated in terms of coating reproducibility, dynamic range of the assay including the estimation of the calibration function, accuracy (as recovery), intra- and inter-assay precision (as %CV), and sensitivity (as detection and quantification limits). Specificity was not included in the validation, since no cross-reactions are expected when analysing reconstituted infliximab.

Conclusions The method here propose is ready to be used in further long term stability studies of infliximab reconstituted in sterile water for injection to give the hospital conditions of use.

Competing interests None.

TD1029 CYTOTOXIC SURFACE CONTAMINATION IN A ROBOTIC SYSTEM COMPARED WITH MANUAL PREPARATION

N. García, I. Kiskan University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, Pharmacy, Mainz, Germany

10.1136/ajpharm-2012-000074.175

Background The preparation of cytotoxic drugs involves an occupational risk of contamination by aerosolised drug or contact contamination. To work with a robot could be an option to reduce risk to the operator, assuming that automation causes less contamination than manual preparation on a workbench.

Purpose To compare the surface contamination with cytotoxic drugs during automated preparation and manual preparation.

Materials and methods The contamination level of 5 predetermined areas in the CytoCare cabinet was investigated with swab tests by a known method (Schierl *et al.*). Samples were analysed by gas chromatography-mass spectrometry or inverse voltammetry after UV digestion. In the first series, 15 bags of 5-FU and 15 bags of platinum-containing cytotoxic drugs were prepared over two consecutive days. All surfaces were swabbed before (directly after the cleaning procedure) and after the preparation process. A second series was prepared and in addition the outer surface of each bag was swabbed. In parallel, the surface contamination during the manual preparation was studied. 15 bags of 5-FU and 15 bags of platinum-containing cytotoxic drugs were prepared over two consecutive days. 4 particular areas of the laminar air flow, the gloves of the technician and all bags prepared were swabbed by the same method.

Results Contamination with cytotoxics was observed in the working area of the CytoCare and on the outer surface of several automatically compounded products. The contamination levels were similar or higher in the robot to those in the manual preparation process.

Conclusions The cleaning procedure of the CytoCare turned out to be insufficient and must be improved. Further investigations are necessary to identify the origin(s) of the contamination and reduce them.

Competing interests None.

TD1040 PILAR COMPARISON BETWEEN MANUAL AND AUTOMATED PROCESSES IN THE PREPARATION OF INTRAVENOUS MIXTURES

M.P. Flux Betanzos, A. Ferrás Alonso, M.C. Pareda López, P. Pérez Castán, M. Sanjaño Saiz Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Pharmacy, Madrid, Spain

10.1136/ajpharm-2012-000074.176

Abstracts

Background Automated systems have shown increased efficiency and safety in preparation processes and quality control of intravenous mixtures (IVMs).

Purpose To evaluate the differences, in terms of efficiency and safety, between manual and automated processes in the preparation and quality control of IVMs.

Materials and methods Comparative descriptive study of manual versus automated IVMs preparation (IVM Station robotic system). The procedures for the manual workflow and the automated system were compared. Quality control procedures for the final product were also compared.

Results The manual process comprises five stages: 1) Preparing the relevant material (eg, drugs, solvents, consumables, packaging material) 2) Checking the material gathered 3) IVM production (following the relevant standard operating procedure) 4) Packaging and labelling of the final product 5) Quality control of the final product by a different member of staff: drug and solvent (name, volume), label (patient, drug and dosage, solvents, volume, infusion rate, storage conditions, batch, expiry date, visual inspection, packaging). The automated process includes five stages: 1) Preparing the materials specified in a software-generated list 2) Loading and automatic material checking by optical recognition and barcode checks 3) IVMs preparation and gravimetric control of intermediate components (eg, vials) and final product through a robot-integrated precision balance 4) Automatic labelling and downloading of final product 5) Label check and visual inspection of final product by nursing staff.

Conclusions Although preliminary results show the same number of steps for both processes, the robotic system achieves 60% automation of the quality control. Optical and barcode recognition, gravimetric control and automated labelling represent the main advantages of the robotic system compared with the manual preparation and also the best guarantees for the IVMs production process. Robotic systems give added value to production in terms of efficiency and safety.

Competing interests None.

TD1041 SAFER LABELLING OF PREPARED MEDICINES: INTRODUCTION OF COLOUR AND GRAPHIC DESIGN ELEMENTS TO MANAGEMENT SOFTWARE

J. Alonso Barja, J. Asálzar Ruiz, J. Dima Hospital Universitario Reina Sofía, Pharmacy, Murcia, Spain

10.1136/ajpharm-2012-000074.177

Background Patient safety is one of the most important subjects today. The correct differentiation of labels of all products is one of the first steps in this objective.

Purpose To describe the introduction of colour and other graphic design elements into the labelling of prepared medicines to improve the identification and differentiation of preparations, and thus improve patient safety. To introduce label design management software in order to design labels to differentiate between these elements.

Materials and methods A cycle of improvement has been introduced in the pharmacotechnology area, initially identifying products whose labels could potentially pose a risk to the patient. Then colour combinations, pictograms and graphic design resources were chosen that allow their differentiation. Changes in the software were introduced using Microsoft Access.

Results The authors identified the following groups of formulations in which differentiated labelling would improve

150

European Journal of Hospital Pharmacy April 2012 Vol 19 No 2

13_ajpharm-2012-000074.indd 150

3/9/2012 12:26:44 PM

European Journal of Hospital Pharmacy April 2012 Vol 19 No 2

13_ajpharm-2012-000074.indd 151

3/9/2012 12:26:44 PM

