



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO  
TÍTULO: MEDICAMENTOS  
BIOTECNOLÓGICOS**

Autor: Laura Torroba Vicario

Fecha: 29/06/2019

Tutor: Giorgio Giorgi

## Índice

1	Resumen .....	3
2	Introducción y antecedentes .....	3
2.1	Antecedentes, historia y actualidad .....	4
2.2	Tipos de medicamentos biotecnológicos y obtención .....	6
2.3	Biosimilares.....	7
2.4	Hemofilia y su relación con la biotecnología .....	9
3	Objetivos .....	11
4	Metodología.....	11
5	Resultados y discusión .....	11
5.1	Desarrollo del factor VIII recombinante .....	12
5.2	Desarrollo del factor IX recombinante.....	14
5.3	Otros factores recombinantes y terapias biotecnológicas.....	15
5.4	Seguridad de los factores de coagulación recombinantes .....	15
6	Conclusiones .....	19
7	Bibliografía.....	19

## 1 Resumen

Desde finales del siglo XX, cuando se empezó a utilizar la biotecnología para el desarrollo de fármacos e identificación de dianas se han encontrado una gran cantidad de tratamientos para múltiples patologías que previamente no lo tenían, y en estos momentos está revolucionando el tratamiento de enfermedades oncológicas y autoinmunes. El desarrollo de los mismos y las técnicas utilizadas son complejas y en ellas ha habido un gran avance desde que se empezó a usar a esta tecnología. Su naturaleza proteica hace que haya muchos tipos de medicamentos biotecnológicos, desde hormonas como la insulina a anticuerpos monoclonales o inhibidores específicos de enzimas. El ejemplo que se trata para explicar el desarrollo y técnicas utilizadas es de los factores de coagulación utilizados en el tratamiento de la hemofilia.

Palabras clave. Biotecnología, biosimilar, anticuerpo monoclonal, hemofilia, factor de coagulación.

### *Abstract*

*Since late 20th century, when biotechnology began to be used in drug development and identification of new targets, a great number of new treatments used in multiple pathologies has been found, and currently it is transforming the treatment in oncology and autoimmune diseases. The development of this kind of drugs and the techniques used are complex and there has been an important breakthrough since this technology began to be used. As these drugs are proteins there are many varieties, from hormones like insulin to monoclonal antibodies or specific enzyme inhibitors. The example used in this essay to explain the development and techniques used are recombinant coagulation factors used in haemophilia treatment.*

*Key words: Biotechnology, biosimilar, monoclonal antibody, haemophilia, clotting factor,*

## 2 Introducción y antecedentes

Un medicamento biotecnológico es un producto medicinal, terapéutico, profiláctico o de diagnóstico in vivo cuyo principio activo es de naturaleza biológica y que ha sido producido por algún proceso biotecnológico (1), entre los que se encuentran la ingeniería genética,

tecnología del ADN recombinante e hibridomas, siendo necesaria en todas ellas la participación de organismos vivos (2).

Cabe diferenciar entre medicamento biológico y medicamento biotecnológico, un medicamento biológico es aquel que es producido y extraído por un ser vivo, por este motivo todos los medicamentos biotecnológicos van a ser medicamentos biológicos, pero un medicamento biológico no tiene por qué ser biotecnológico (3).

El uso de la ingeniería genética nos permite obtener como medicamentos proteínas de alto peso molecular y por tanto gran complejidad, lo cual supone una gran diferencia con los medicamentos obtenidos por síntesis química, que, siendo más o menos complejos, tienen un peso molecular y un tamaño mucho menor. Por este motivo los medicamentos biotecnológicos tienen una mayor inmunogenicidad y menor estabilidad (3).

## **2.1 Antecedentes, historia y actualidad**

Históricamente, la biotecnología empieza a ser usada en la década de los 80, cuando se sintetizan las primeras vacunas, hormonas del crecimiento, anticuerpos, interferones y péptidos. Es en 1982 cuando se aprueba el uso del primer medicamento biotecnológico, la insulina, que hasta ese momento se extraía de animales. En la década de los 90, el avance tecnológico permite una gran evolución en cuanto a este tipo de medicamentos al iniciarse la ingeniería molecular. Durante esta década algunas farmacéuticas cuya actividad estaba centrada en los medicamentos de síntesis química empezaron a comprar empresas biotecnológicas, de forma que actualmente algunas de ellas tienen su actividad centrada en la biotecnología, como es el caso de Novo Nordisk, con un 90% de ventas de productos biotecnológicos, o Roche, con un 75% (4).

A partir de este momento, de los 2000 en adelante, además de investigarse nuevas dianas sobre las que sólo podrían actuar este tipo de medicamentos, los avances tecnológicos permiten nuevas estrategias con los medicamentos biológicos ya existentes, por ejemplo se comienzan a modificar las moléculas para mejorar su actividad, uniendo otros componentes, como puede ser el polietilenglicol (5), de forma que conseguimos reducir la inmunogenicidad de la molécula o cambiar su perfil farmacocinético, un ejemplo de esto es el peg-interferon alfa, usado en la hepatitis C o el certolizumab pegol usado en artritis reumatoide; también, gracias a la ingeniería molecular, se comienzan a utilizar péptidos en lugar de proteínas enteras (4), siendo esta también una forma de reducir su inmunogenicidad a la par que se

aumenta la especificidad. Previamente las agencias reguladoras (FDA, EMA, etc) ya habían intervenido en este tipo de medicamentos, pero es durante los 2000 cuando, al aumentarse significativamente el impacto económico y por tanto el número de fármacos, las agencias regulan más duramente este tipo de fármacos, tanto en los ensayos clínicos, cuyo riesgo hizo que la legislación al respecto fuera más estricta, como en las medidas de seguridad que hay que tener durante la producción. También surgen en este momento los medicamentos biosimilares.

Sólo en la década pasada, surgieron 106 nuevos productos biotecnológicos y 59 nuevas indicaciones para productos biológicos ya existentes. Actualmente se están aprobando y realizando cada vez más estudios sobre medicamentos biotecnológicos para enfermedades autoinmunes, crónicas y en oncología principalmente, con la pretensión de que esta tecnología nos permita llegar a una medicina personalizada. (6)

Actualmente el mercado de los medicamentos biotecnológicos sigue en auge, habiéndose aprobado 129 principios activos de esta índole entre 2014 y 2018. En resumen, hasta 2018 han sido aprobados un total de 374 productos biotecnológicos con 285 moléculas distintas entre la Unión Europea y Estados Unidos. Durante todo el tiempo que llevan comercializados, 58 productos biotecnológicos han sido retirados del mercado, en la mayoría de los casos por motivos comerciales, por lo que actualmente hay 316 productos biotecnológicos comercializados. Todos ellos son de distinto tipo, pero en el último año se ha comercializado el primer RNA de transferencia como fármaco en los Estados Unidos (7).

Desde 1995, la tendencia al auge en la aprobación de nuevos productos había sido constante, sin embargo, en los últimos 5 años se han duplicado en cuanto a los períodos anteriores, no sólo por los biosimilares, si no también por una gran cantidad de nuevas moléculas, siendo la mayoría de ellos anticuerpos monoclonales (7).

En cuanto al futuro, por los ensayos clínicos que se están llevando a cabo ahora mismo, se puede decir que el número de productos biotecnológicos que se van a aprobar va a seguir en aumento, siendo el mayor número de ellos de naturaleza proteica (principalmente anticuerpos monoclonales) y su principal diana va a seguir siendo el cáncer (7). Con respecto a un futuro más lejano, la tecnología de CRISPR/Cas9, que se está desarrollando actualmente va a tener mucho que decir. CRISPR/Cas9 es un sistema descubierto recientemente en algunas bacterias y arqueas que usan como sistema de inmunidad adaptativa frente a algunos virus mediante el reconocimiento de secuencias de DNA como no propias y la eliminación y edición de estas secuencias, con la correcta manipulación de las secuencias a eliminar y editar se puede

conseguir editar genes (8), con el consiguiente avance en el tratamiento y curación de una gran cantidad de enfermedades.

## **2.2 Tipos de medicamentos biotecnológicos y obtención**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) tiene como medicamentos biológicos las vacunas, alérgenos, antígenos, hormonas, citocinas, enzimas, derivados de sangre y plasma humano, sueros inmunes, inmunoglobulinas, anticuerpos y productos de fermentación obtenidos por tecnología recombinante. (3)

Los principales grupos de medicamentos biotecnológicos van a ser anticuerpos monoclonales, proteínas recombinantes y los usados en terapias avanzadas, como son la génica, celular e ingeniería de tejidos, que incluyen enzimas recombinantes y ácidos nucleicos. De tal forma, a día de hoy, los medicamentos biotecnológicos son la base del tratamiento de enfermedades de gran impacto como son la diabetes mellitus, dado que las insulinas producidas actualmente son en su totalidad de origen biotecnológico, además de estar revolucionando el tratamiento de las enfermedades autoinmunes, como es el caso de la artritis reumatoide, y algunos tipos de cáncer mediante el uso de anticuerpos monoclonales. Esto ha llevado a que en el año 2018 aproximadamente un 20% de los medicamentos comercializados a nivel europeo sean de origen biotecnológico, cubriendo prácticamente todas las áreas terapéuticas, como la oncología, diabetes, hematología, reumatología, etc. (7). El gran auge de este tipo de medicamentos es debido a que la investigación ha permitido la identificación de dianas terapéuticas proteicas muy específicas a las cuales se pueden unir una gran variedad de anticuerpos monoclonales. Entre la gran cantidad de dianas que nos encontramos existen, por ejemplo, factores de crecimiento sobre los que actúan fármacos como el bevacizumab, que se une al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), utilizado en combinación con otros medicamentos en terapia antineoplásica (9); inmunoglobulinas, como en el caso del omalizumab que se une selectivamente a la IgE y se usa en enfermedades obstructivas de las vías respiratorias como el asma (10); factores de necrosis tumoral como en el caso de etanercept (11) u otro gran número de ejemplos.

Para la obtención de este tipo de moléculas se llevan a cabo diferentes técnicas, la primera de ellas, la del ADN recombinante, consiste en modificar genéticamente a una población de microorganismos para que produzca la proteína en cuestión. La introducción del gen en la

célula huésped se hace mediante un vector, que normalmente es un virus o un plásmido (3), así obtenemos un ADN recombinante formado por el ADN artificial introducido y el ADN previo del microorganismo. Esta población de microorganismos se optimiza y se cultiva a gran escala para después purificar la proteína producida a partir de esta secuencia de ADN que se ha introducido, que finalmente vamos a tener como solución o liofilizado (5).

Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener también utilizando la técnica del hibridoma, por la que se crea una línea de células B que se ha inmortalizado fusionándola con células de mieloma y que van a producir el anticuerpo correspondiente a esa serie de linfocitos B, siendo este el anticuerpo concreto que queramos producir. (12)

En los últimos años se está viendo como incrementa la tendencia de utilizar líneas celulares de mamíferos en la producción de estos medicamentos, además del uso clásico de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*. Esto se debe a que hay una gran cantidad de nuevos productos que requieren maquinaria de células de mamíferos para su correcta expresión, como sucede con los factores de coagulación (7). También, en los medicamentos que lo requieren se están utilizando líneas celulares humanas, debido a que es la única forma de obtener una expresión y modificaciones post traduccionales en las células idénticas a las que se necesitan.

### **2.3 Biosimilares**

Los medicamentos de origen biotecnológico nos han permitido tratar enfermedades que hasta el momento no tenían tratamiento o cuyo tratamiento era únicamente sintomático, pero el precio de éstos es significativamente más alto que el de los medicamentos de origen químico. Esto se debe a varios motivos: en primer lugar está su complejo desarrollo, hay que identificar y aislar las proteínas responsables de la patología, secuenciarlas e introducir la secuencia de DNA de la proteína que queremos producir en el microorganismo o línea celular que lo va a hacer (4), por otra parte el desarrollo de este tipo de medicamentos es inherentemente caro por los múltiples controles de seguridad y calidad a los que están sometidos, estos se encuentran descritos en el documento *Production and Quality Control of Medicinal Products derived by recombinant DNA Technology* y en guidelines específicas que se encuentran en la página de la EMA . Otro factor que encarece estos medicamentos es que en muchos casos se destinan a poblaciones muy pequeñas, por lo que el precio elevado es una forma de asegurar el retorno

de la inversión inicial realizada por la compañía que lo ha desarrollado (5), provocando que muchos de estos medicamentos sean huérfanos. Un ejemplo de esto son medicamentos que podrían usarse en enfermedades enzimáticas metabólicas relacionadas con un solo gen, enfermedades infantiles muy graves, pero que afectan a grupos de personas muy pequeños (4).

Con esta premisa, al acabar las patentes de los primeros medicamentos biotecnológicos innovadores nace los biosimilares. Un medicamento biosimilar es un medicamento biotecnológico que tiene una estructura y eficacia semejantes a las de los medicamentos biotecnológicos de referencia (4). No se puede utilizar el término genérico en este contexto, dado que un medicamento genérico utiliza el mismo principio activo (la misma molécula) que su medicamento innovador de referencia. Debido al gran tamaño y complejidad de las moléculas que integran los medicamentos biotecnológicos no se puede utilizar ni desarrollar exactamente la misma molécula en dos medicamentos.

A pesar de que para ser comercializados requieren una gran cantidad pruebas, ensayos e informes por se medicamentos de origen biotecnológicos, además de los necesarios para ser considerados biosimilares, la EMA no se ha posicionado en cuanto a si un medicamento biosimilar es intercambiable o no con su innovador, dejando la regulación a cada estado. En España son intercambiables si previamente lo ha aprobado la comisión farmacoterapéutica, excepto en la farmacia comunitaria. (13)

El auge de estos productos es muy notorio, desde 2014 la Unión Europea ha autorizado la venta de 48 productos biosimilares. El uso de este tipo de medicamentos ha sido monitorizado durante todo este tiempo desde su aprobación en la Unión Europea, dónde se ha comprobado que se pueden usar de forma segura y efectiva y no se han visto diferencias relevantes en la naturaleza, frecuencia o efectos adversos causados por éstos y sus medicamentos de referencia. (14)

También se está comenzando a hablar “biobetters”, término que se refiere a un medicamento biofarmacéutico ya aprobado que ha sido modificado de alguna manera para mejorar aspectos farmacocinéticos o farmacodinámicos, como, por ejemplo, factores de coagulación con mayores semividas (7).

## 2.4 Hemofilia y su relación con la biotecnología

La hemofilia es una enfermedad ligada al cromosoma X en la cual hay deficiencia de los factores de coagulación VIII (FVIII) en el caso de la hemofilia a o factor IX (FIX) en el caso de la hemofilia b. La deficiencia de estos factores causa problemas en la cascada de coagulación, por lo que la característica principal de estos enfermos es el sangrado, que nos servirá, junto con los niveles de factores de coagulación en sangre, para definir la gravedad de la enfermedad en cada paciente tal y como se indica en la tabla 1. (15)

Gravedad	Nivel de factores de coagulación	Episodios de sangrado
Severa	<1 UI/dL o < 1% de lo normal	Sangrado espontáneo de articulaciones o músculos.
Moderada	1-5 IU/dL o 1-5% de lo normal	Sangrado espontáneo ocasional, sangrado prolongado en golpes menores o cirugía.
Leve	5-40 UI/dL o 5-40% de lo normal.	Sangrado espontáneo raro. Sangrado grave con golpes mayores y cirugía.

Figura 1: relación de síntomas, nivel de factores de coagulación y gravedad de la hemofilia. (15)

Por la posible gravedad de esta enfermedad, los cuidados que deben recibir son exhaustivos. Entre ellos se encuentra el tratamiento con factores de coagulación, éstos inicialmente eran derivados de plasma de origen animal y humana, pero con el desarrollo de la biotecnología se empezaron a producir factores de coagulación recombinantes (16). Otro posible tratamiento con el que está relacionada la biotecnología es la terapia génica, que se ha usado para intentar conseguir la expresión del FIX en la hemofilia b. (17)

Para entender la importancia de la hemofilia y los factores de coagulación es necesario entender el funcionamiento de la cascada de coagulación.

Los factores de coagulación intervienen en la hemostasia, que se encarga de formar el tapón plaquetario y coagulación cuando se produce una lesión en el circuito cerrado del aparato circulatorio. Cuando se ha reparado la lesión se produce la fibrinólisis o degradación del coagulo. En la hemostasia primaria, la activación de las plaquetas por varias sustancias presentes en el endotelio dañado lleva a la formación del tapón plaquetario.

Con la hemostasia secundaria intervienen los factores de coagulación, ésta se divide en las fases de iniciación y propagación. Los factores de coagulación son proteínas plasmáticas que circulan inactivadas, y que al activarse actúan como serin proteasas. La actividad proteolítica de cada factor activado provoca la activación de otro factor, funcionando como una cascada. La cascada de activación que se produce queda reflejada en la figura 1. El final de esta cascada lleva a la activación de la protrombina (FII) a trombina (FIIa), que es la encargada de transformar el fibrinógeno en fibrina, proteína que establece la formación del trombo plaquetario. A este resultado se puede llegar por dos vías, la vía extrínseca o intrínseca, en función del origen de los componentes que formen parte de ella. En ambos casos se termina con la activación del factor X a factor Xa, que activa el factor II. (18)

Otro factor muy importante en la coagulación es el factor de von Willebrand. El factor de von Willebrand se sintetiza en el endotelio y tiene diversas funciones, como unir las plaquetas unas a otras cuando se activan y al colágeno del endotelio, aunque la principal que vamos a tratar en este trabajo es la de actuar como Carrier del factor VIII. (19)

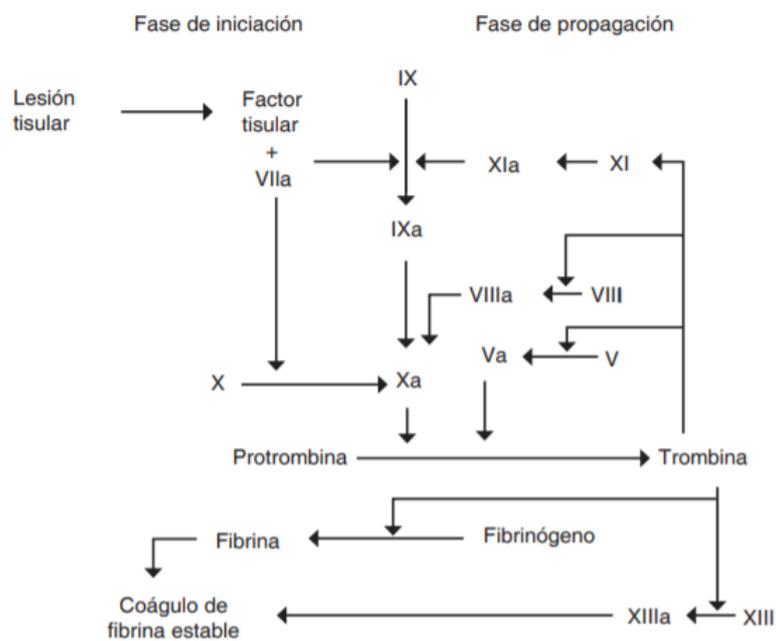


Figura 2: modelo celular de la coagulación. (18)

### 3 Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es ver la aplicación de la biotecnología en el tratamiento de una enfermedad, en este caso la hemofilia, usando proteínas obtenidas por tecnología recombinante, los problemas que se pueden encontrar, tanto en el desarrollo del mismo como en cuanto a su seguridad.

### 4 Metodología

Este trabajo ha sido realizado mediante la búsqueda de revisiones y artículos científicos en las plataformas de PubMed, Google Scholar, y la base de datos de CIMA de la AEMPS para obtener información de las fichas técnicas de medicamentos ya comercializados. Las palabras utilizadas han sido *biotecnología, medicamentos biotecnológicos, biosimilar, hemofilia, factor VIII recombinante, factor IX recombinante y seguridad de medicamentos biotecnológicos*, tanto en castellano como en inglés. Se han utilizado revisiones dada su elevada evidencia y publicaciones de revistas de referencia en el campo de la hematología y biotecnología y se descartaron aquellos cuyo rigor era dudoso.

### 5 Resultados y discusión

Con el auge de la biotecnología surgen equipos de investigación que comienzan a desarrollar factores de coagulación recombinantes. Este proceso, entre otros motivos, se vio favorecido por el alto número de pacientes enfermos con hemofilia que contrajeron VIH al administrarles factores de coagulación derivados de plasma de pacientes enfermos de VIH, VHB o VHC. Este problema también sirvió para aumentar los controles realizados a los donantes. De esta manera, en 1984 ya se había aislado el gen de los factores VIII e IX, clonado y producido por primera vez el FVIII recombinante (17), que posteriormente se optimizaría para su uso en clínica.

También debe de tenerse en cuenta que diferentes sistemas de expresión producen diferentes modificaciones, y por tanto diferentes proteínas, desde la misma cadena de aminoácidos (20). Por la complejidad de estas proteínas, no es sólo necesaria la producción de estas proteínas, si no que también se necesitaban las modificaciones postraduccionales que se producen en las células humanas, como es, por ejemplo, la adición de carbohidratos complejos cuando éstas se sintetizan, por este motivo, para su producción era necesario desarrollar todo este proceso en células de mamífero capaces de llevarlas a cabo. Por otra parte, estas células elegidas para la producción deben de tener una actividad proteolítica baja para que las proteínas producidas

quedasen intactas. Para esto se escogieron, y se siguen usando en la actualidad, las células de ovario de hámster chino, en los últimos años se han desarrollado también factores recombinantes a partir de células humanas que han supuesto una nueva mejora en este ámbito. Además, para que la producción de proteínas por parte de estas células fuera óptima éstas necesitaban estar suplementadas con suero bovino (21), ya que este proporciona una gran cantidad de moléculas que las células utilizan con sustrato en la síntesis. Este suero bovino podía ser portador de virus resistentes a los diferentes procesos de purificación por lo que se optimizó la producción para prescindir del mismo, en primer lugar porque era inaceptable por motivos regulatorios y segundo lugar por su elevado precio, insostenible para la producción industrial a gran escala.

### 5.1 Desarrollo del factor VIII recombinante

Todo el proceso relacionado con el factor VIII recombinante (rFVIII) fue uno de los más complejos y revolucionarios para la industria en su momento, tanto en desarrollo, escalado como en autorización por las autoridades para su comercialización y uso. Éste se vio impulsado porque en ese momento estaba en auge la corriente que quería la eliminación de aditivos proteicos de origen animal de las preparaciones, debido a los posibles patógenos y el impacto de aquel momento de enfermedades priónicas, especialmente en pacientes con hemofilia, ya que previamente los factores que recibían eran de origen animal, aunque el control de estos era exhaustivo.

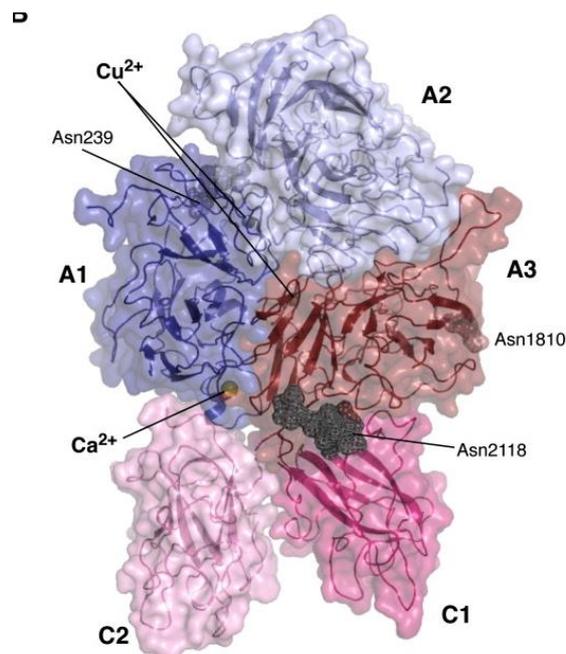


Figura 3: Estructura del factor VIII (22)

En primer lugar, tras su secuenciación e introducción en las células de ovario de hámster chino del ADN recombinante se consiguió una correcta síntesis y producción del factor VIII, sin embargo, tras la eliminación del suero bovino del proceso surgió un problema. Al no contar con éste, la proteína se quedaba adherida a las membranas de las células de ovario de hámster chino, sin salir al exterior de la célula, por lo que era degradado por las proteasas de la propia célula y no se podía aislar y purificar la proteína obtenida. La solución a este problema pasó por hacer que estas células también produjesen factor de von Willebrand recombinante. Se escoge éste porque una de sus múltiples funciones es ir unido de manera natural en la sangre al factor VIII mientras éste está inactivo, de esta manera, al ser producido por las células de ovario de hámster chino, el factor VIII se une con mayor afinidad al factor de von Willebrand que a la membrana de las células, saliendo de ellas y siendo expresado con éxito, pudiendo, ahora sí, aislarse y purificarse para su uso posterior. Por supuesto, este factor de von Willebrand recombinante no sólo ha sido utilizado para esto, sino también en el tratamiento de otras enfermedades relacionadas con la hemostasia como la enfermedad de von Willebrand.

En el año 2000, la Agencia Europea del Medicamento aprueba Refacto<sup>®</sup>, que es el primer factor de coagulación recombinante que cuenta con todos los avances explicados.

Los estudios clínicos se hicieron sobre pacientes tratados previamente y pacientes no tratados previamente, en profilaxis de episodios de sangrado o en episodios agudos de sangrado. En todos ellos, algunos de ellos con duración de varios años, los resultados fueron sido óptimos.

Estas serían las primeras generaciones de factor VIII recombinante, la primera que usaba células de origen animal y albúmina sérica bovina para su correcta producción y la que elimina la albúmina sérica bovina. La última generación de factor VIII recombinante es el desarrollado en células humanas. El primero de ellos ha sido aprobado por la EMA en 2014 y su nombre comercial es Nuwiq<sup>®</sup>(23). Para la obtención de esta proteína se usan células embrionarias de riñón humano. De esta manera, las proteínas que se van a obtener van a tener todas las modificaciones postraduccionales necesarias, y los glicanos que contienen van a ser en su totalidad de origen humano. Esto confiere dos ventajas, en primer lugar, la afinidad de la unión al factor de von Willebrand es mucho mayor, por lo que se aumenta mucho la estabilidad en comparación a los producidos en células de ovario de hámster chino. En segundo lugar, la procedencia humana hace mucho más difícil que se formen los antígenos

inhibidores, ya que no hay presencia de epítomos no humanos (20). Ninguna de estas modificaciones es añadida químicamente de manera posterior, y no se usa ningún tipo de aditivos animales (23).

La obtención de factores cuya procedencia fueran células humanas tenía tres objetivos: reducir la respuesta inmune, mejorar las propiedades funcionales (como la unión al factor de von Willebrand humano) y tener una mayor seguridad teórica ante patógenos potenciales presentes en células de origen no humano (20).

Se han llevado a cabo varios estudios que han determinado que el uso del factor VIII recombinante de origen humano es seguro y efectivo tanto en adultos como en adolescentes, en tratamiento profiláctico y bajo demanda en función de las necesidades. Estos estudios también se han llevado a cabo en niños de diferentes grupos de edad con resultados positivos en todos ellos, tanto en la eficacia para evitar sangrados espontáneos en profilaxis y llegando a la hemostasia en sangrados que ya se habían producido, como en la formación de inhibidores, ya que éstos son potencialmente menos inmunogénicos.

## 5.2 Desarrollo del factor IX recombinante.

Por su parte, el factor IX, aunque más pequeño que el VIII, también tiene importantes modificaciones postraduccionales que son imprescindibles para su funcionamiento, entre ellas la gamma-carboxilación por parte de una enzima hepática dependiente de vitamina K de 12 residuos de glutámico y posterior escisión de varios residuos por parte de una serin proteasa (furina) del aparato de Golgi.

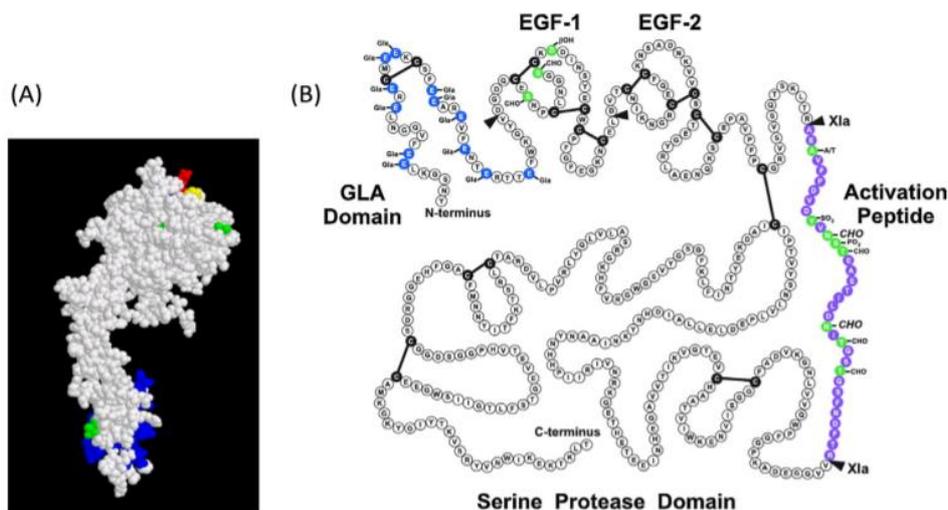


Figura 4: (A) Estructura en 3D y (B) secuencia de aminoácidos del factor IX humano. (24)

De esta forma, la expresión del factor IX sin modificar era buena, pero la del factor IX carboxilado era baja debido a que la furina de las células de ovario de hámster chino se veía saturada. Este problema se solucionó de forma similar al que se presentaba con el factor VIII, haciendo que las células de ovario de hámster chino produjeran también esta enzima. Además, se optimizó la gamma-carboxilación añadiendo vitamina K al medio.

Otras modificaciones postraduccionales de menor importancia para su funcionalidad y que sólo se conseguían en proporciones muy bajas de manera recombinante han hecho que, aunque la coagulación utilizando estos productos sea correcta, su semivida es mucho menor en comparación a los derivados de suero animal, lo cual hizo cambiar la dosificación. A pesar de eso demostró ser seguro y totalmente eficiente en los ensayos clínicos, tanto en población adulta como pediátrica.

El primer medicamento con factor IX recombinante comercializado fue BeneFIX® en 1998.

### **5.3 Otros factores recombinantes y terapias biotecnológicas**

Siendo estos dos los factores de coagulación recombinantes más importantes, hay otros que están empezando a tener peso en el tratamiento de otras enfermedades relacionadas con el sangrado, tal y como se ha comentado con el factor de von Willebrand, que fue desarrollado para la producción de factor VIII pero también se usa en solitario para tratar la enfermedad de von Willebrand, o los factores VIIa y XIII.

Otra forma de aumentar la disponibilidad en la producción de los factores de coagulación ha sido asociar los genes de éstos a zonas de control transcripcional de otros genes altamente expresados de las células de ovario de hámster chino.

En cuanto a la terapia génica, que también se está empezando a utilizar en pacientes con hemofilia, se incluyen entrega *in vivo* de los genes de expresión del factor VIII y el factor IX utilizando vectores virales e introducción del gen *ex vivo* en las células para luego devolverlas al cuerpo, pero sin éxito todavía. (16)

### **5.4 Seguridad de los factores de coagulación recombinantes**

La seguridad de los nuevos factores de coagulación recombinantes se basa en tres principales inconvenientes asociados a éstos: el problema con los virus, con los inhibidores y con las nuevas formulaciones que han ido añadiendo polietilenglicol (PEG) para diversas mejoras farmacodinámicas con respecto a los factores previos.

Los virus de origen animal son algo a tener en cuenta en todos los medicamentos biotecnológicos que se producen en células animales o con algún tipo de complemento procedente de éstos como es el caso de la albúmina sérica. Esto es problemático porque algunos de estos virus son resistentes a los métodos de purificación que se les aplica. En general, se han detectado en ocasiones excepcionales contaminaciones de producto por este tipo de virus, pero no ha existido ninguna infección en algún paciente tratado con ningún medicamento biotecnológico (25).

Con las posteriores generaciones, en las cuales se han usado células animales, pero no albúmina sérica, no ha habido casos de contaminación en humanos por virus animales, debido a los eficientes procesos de inactivación y nanofiltración, pero sin embargo existe la posibilidad (25). También se llevan a cabo todos estos procesos de purificación en los factores recombinantes de origen humano, de forma que se quita del producto final cualquier sustancia no deseada (23).

El problema de los inhibidores es un problema de carácter inmunológico. Se llama inhibidores a anticuerpos anti-factores de coagulación que surgen durante el tratamiento con los factores y reducen la efectividad de este, debido a que se unen a la proteína inactivándola y haciendo que pierda su eficacia, la inhibición será en mayor o menor medida en función del título de anticuerpos.

Esto sucede en alrededor del 30% de los pacientes con hemofilia A que son tratados con factores de coagulación recombinantes y no han sido previamente tratados con factores derivados de plasma y el 2-3% de los pacientes con hemofilia B (tratados previamente con factor IX) (25).

Hay muchos factores implicados en la formación de inhibidores, pudiendo ser genéticos o no genéticos. Dentro de los no genéticos están incluidos los que se intentan mejorar, como la estructura primaria del producto y las modificaciones postraduccionales. Las modificaciones postraduccionales son diferentes en función del tipo de célula que lleve a cabo la traducción, cuanto más cercana esté esta de la humana más afín será y menos problemas de inmunogenicidad tendrá (20), por tanto las diversas mejoras que se han ido haciendo en el proceso de obtención de los factores de coagulación se han ido acercando a esto, por ejemplo empezando a usar células de mamífero (hámster) y por último a células humanas.

Las modificaciones postraduccionales más importantes en este caso son la glicosilación y la sulfatación. Para la funcionalidad del factor VIII es necesario que estén sulfatados los seis sitios de la tirosina 1680, ya que en caso de no ser así éstas no se van a unir al factor de von Willebrand. Estas sulfataciones también son necesarias para la unión con la trombina del factor VIII. También es importante que haya una glicosilación correcta, esta glicosilación va a ser de tipo manosa y tiene, entre otras, la función de “esconder” ciertas regiones de la cadena proteica (20). Una correcta glicosilación está directamente relacionada con que ciertos epítomos estén al descubierto o no, de tal forma que pueda evitar la formación de inhibidores. Esto es lo que sucede con el factor VIII obtenido de células de ovario de hámster chino, que su glicosilación ligeramente diferente a la humana da lugar a la exposición de ciertos epítomos susceptibles de ser inmunogénicos (26).

Estos inhibidores ya habían surgido previamente en pacientes tratados con derivados de plasma sanguíneo, y ha habido una gran cantidad de estudios comparando la aparición de inhibidores en pacientes tratados con un tipo de factores de coagulación u otros, dando en muchos casos resultados contradictorios. También hay múltiples disparidades entre la formación de inhibidores en función de la generación del factor recombinante, es decir, de si ha sido obtenido a partir de células humanas o animales (26). El más importante de estos estudios y que por fin dio lugar a una conclusión fue el estudio SIPPET (Survey of Inhibitors in Plasma-Products Exposed Toddlers), cuyos resultados se publicaron en 2016. En este estudio se analizaron a 250 pacientes, administrándose a 125 de ellos factores recombinantes y a 125 factores derivados de plasma. Como resultado un 44,5% de los tratados con factor VIII recombinante desarrollaron inhibidores frente a un 26,8% en los derivados de plasma (25). La hipótesis de esta diferencia es que los derivados de plasma se administran ya unidos al factor de von Willebrand (26), de tal forma que algunos de los epítomos que dan lugar a la inmunogenicidad no se encuentran al descubierto, por lo que este complejo FVIII-fvW no es reconocido por las células dendríticas que se encargan de la presentación de estos antígenos para la formación de sus respectivos anticuerpos.

En cuanto al futuro, se están tratando de estudiar los factores genéticos que están relacionados con la formación de inhibidores para poder actuar sobre ellos en algún momento. Para ello se está llevando a cabo el “transcriptoma”, que analiza las secuencias de RNA que se transcriben tras la exposición a determinado producto, siendo en nuestro caso al FVIII (20).

El último problema en cuanto a seguridad de los factores de coagulación recombinantes son los posibles problemas derivados de la pegilación. La pegilación consiste en unir de manera no covalente a la proteína moléculas de polietilenglicol (PEG). La molécula de PEG es altamente hidrofílica y añadirla a los fármacos es una técnica muy utilizada en la industria farmacéutica recientemente y que tiene diversas funciones, como por ejemplo incrementar la solubilidad, estabilidad a diferentes temperaturas y pHs o protección frente a proteasas (25). Tanto por esto último como por su modificación de la hidrodinamia de la molécula, va a influir en su vida media (27), como se puede observar en la figura 5.

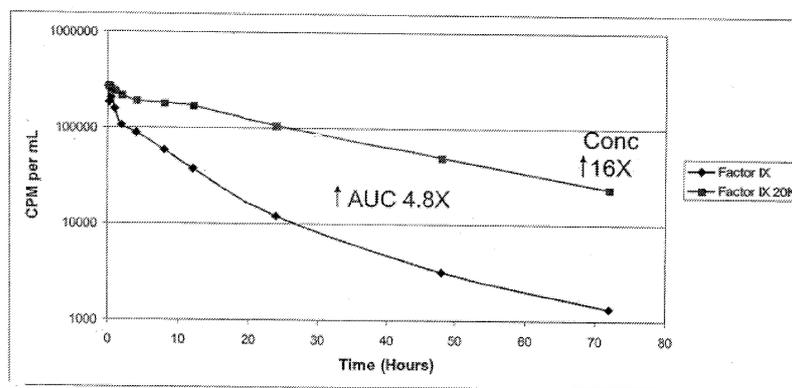


Figura 5: concentraciones plasmáticas in vivo frente al tiempo de factor IX glicopegilado y no glicopegilado. (28)

El PEG es químicamente inerte y por ello teóricamente tiene poca toxicidad, pero hay que tener en cuenta los efectos adversos que puede favorecer de las moléculas a las que acompaña, aumentar la vida media de estas moléculas supone aumentar la repercusión de estos efectos adversos. También hay que tener en cuenta el tamaño del polímero en relación con su eliminación, ya que los más pequeños (<20kDa) se van a eliminar principalmente por vía renal mientras que según va aumentando en tamaño (20-50kDa) va a ir aumentando la eliminación hepática, hasta que aquellos más grandes (>50kDa) se van a eliminar exclusivamente por vía hepatobiliar (25), hay que tener consideración esto en relación con los pacientes con problemas hepáticos que no podrán eliminar correctamente estos productos.

El peso molecular del PEG también va a estar relacionado con dónde se van acumular estos compuestos, aunque lo hagan durante poco tiempo, ya que en función de su tamaño van a penetrar en unos tejidos u otros. Uno de los tipos de acumulación del PEG es formando vacuolas en algunos tipos de células, como por ejemplo macrófagos, estas vacuolas no causan ningún daño y son una manera natural de eliminación de sustancias ajenas al organismo (25). La vacuolación es mayor en polímeros de PEG que se eliminan minoritariamente por vía

renal. La vacuolación de las células de según qué tejidos podría suponer un deterioro en su función (29), pero actualmente no se tienen estudios sobre ello, y debe de ser algo a tener en cuenta en el futuro dado que los pacientes tratados con factores de coagulación recombinantes asociados a polietilenglicol van a recibir este tratamiento durante toda su vida.

Teóricamente, la presencia de PEG podría disminuir la exposición de las proteínas a los anticuerpos que se han formado contra ellas, disminuyendo la inhibición de los factores de coagulación y aumentando su vida media, sin embargo, se están empezado a reportar casos de presencia o de aumento de la presencia de los anticuerpos anti PEG, disminuyendo también la eficacia de la molécula pegilada. La aparición de estos anticuerpos solo está relacionada con la disminución de la eficacia del fármaco, no con un aumento de las alergias al medicamento, ya que son siempre las mismas en el principio activo pegilado y sin pegilar. La aparición de estos anticuerpos no tiene por qué estar estrictamente relacionada con la administración de medicamentos pegilados, ya que también se encuentra presente en otros productos, como cosméticos o comida.

## **6 Conclusiones**

El proceso de desarrollo de un medicamento siempre es complejo y surgen gran cantidad de problemas durante el mismo que tienen que ser solventado para que este sea seguro y eficaz antes de su comercialización y uso. Esto es así en cualquier tipo de medicamento, pero desde luego lo es aún más en los medicamentos de origen biotecnológico, tanto por su gran peso molecular como por su compleja farmacología. A esto se une su complejo desarrollo y producción.

Por otra parte, se ha demostrado con creces la capacidad de resolución de estos problemas, obteniendo productos seguros, eficaces, y de viable producción a gran escala en la industria.

La hemofilia fue una de las primeras enfermedades que se empezaron a tratar con medicamentos de origen biotecnológico, sin embargo, está siendo utilizada en la investigación de fármacos de muchas enfermedades y revolucionando cada campo que toca obtenido grandes resultados.

## **7 Bibliografía**

- (1) Krezen, H; Massey, A. ADN Recombinante y Biotecnología: guía para estudiantes. Acribia S.A. 2001.

- (2) Iglesias-Osma, Maria Carmen, Ja Gonzalez-Correa, Úrsula Medina, y Teresa Tejerina. «Desarrollo y Regulación de Medicamentos Biotecnológicos». *Actualidad en Farmacología y Terapéutica* 11 (1 de diciembre de 2013): 223-28.
- (3) «Dossier medicamentos biológicos | MSD Salud». Accedido 1 de mayo de 2019. <https://www.msdsalud.es/recursos-de-salud/guias-para-pacientes/dossier-medicamentos-biologicos.html>.
- (4) Evens, Ronald, y Kenneth Kaitin. «The Evolution Of Biotechnology And Its Impact On Health Care». *Health Affairs* 34, n.º 2 (febrero de 2015): 210-19. <https://doi.org/10.1377/hlthaff.2014.1023>.
- (5) Ruiz, S., E. Sulleiro, y G. Calvo. «Medicamentos biotecnológicos; from dream to reality». *Farmacéuticos de Atención Primaria* 9, n.º 3 (1 de septiembre de 2011): 85-88.
- (6) Walsh, Gary. «Biopharmaceutical Benchmarks 2014». *Nature Biotechnology* 32 (9 de octubre de 2014): 992-1000. <https://doi.org/10.1038/nbt.3040>.
- (7) Walsh, Gary. «Biopharmaceutical benchmarks 2018». *Nature Biotechnology* 36 (6 de diciembre de 2018): 1136.
- (8) Thurtle- Schmidt, Deborah M., y Te-Wen Lo. «Molecular Biology at the Cutting Edge: A Review on CRISPR/CAS9 Gene Editing for Undergraduates». *Biochemistry and Molecular Biology Education* 46, n.º 2 (2018): 195-205. <https://doi.org/10.1002/bmb.21108>.
- (9) «FICHA TECNICA AVASTIN 25 mg/ml CONCENTRADO PARA SOLUCIÓN PARA PERFUSIÓN» [https://cima.aemps.es/cima/pdfs/ft/04300001/FT\\_04300001.pdf](https://cima.aemps.es/cima/pdfs/ft/04300001/FT_04300001.pdf)
- (10) «FICHA TECNICA XOLAIR 150 mg SOLUCION INYECTABLE». Accedido 17 de abril de 2019. [https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/05319008/FT\\_05319008.html](https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/05319008/FT_05319008.html).
- (11) «FICHA TECNICA BENEPALI 25 mg SOLUCIÓN INYECTABLE» [https://cima.aemps.es/cima/pdfs/ft/1151074005/FT\\_1151074005.pdf](https://cima.aemps.es/cima/pdfs/ft/1151074005/FT_1151074005.pdf)
- (12) García Merino, A. «Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos». *Neurología* 26, n.º 5 (1 de junio de 2011): 301-6. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2010.10.005>.
- (13) Rodríguez Cumplido, Dolores, y Carmen Asensio Ostos. «Fármacos biológicos y biosimilares: aclarando conceptos». *Atención Primaria* 50, n.º 6 (1 de junio de 2018): 323-24. <https://doi.org/10.1016/j.aprim.2018.01.002>.
- (14) «Biosimilars in the EU, Information Guide for Healthcare Professionals», s. f., 38.
- (15) Srivastava, A., A. K. Brewer, E. P. Mauser- Bunschoten, N. S. Key, S. Kitchen, A. Llinas, C. A. Ludlam, et al. «Guidelines for the Management of Hemophilia». *Haemophilia* 19, n.º 1 (2013): e1-47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2012.02909.x>.
- (16) Pipe, Steven W. «Recombinant Clotting Factors». *Thrombosis and Haemostasis* 99, n.º 11 (2008): 840-50. <https://doi.org/10.1160/TH07-10-0593>.
- (17) Nathwani, Amit C., Ulreke M. Reiss, Edward G.D. Tuddenham, Cecilia Rosales, Pratima Chowdary, Jenny McIntosh, Marco Della Peruta, et al. «Long-Term Safety and Efficacy of Factor IX Gene Therapy in Hemophilia B». *New England Journal of Medicine* 371, n.º 21 (20 de noviembre de 2014): 1994-2004. <https://doi.org/10.1056/NEJMoA1407309>.
- (18) Flores-Rivera, Oscar Iván, Karina Ramírez-Morales, José Martín Meza-Márquez, y Jorge Arturo Nava-López. «Fisiología de la coagulación», 2014, 5.
- (19) Lefkowitz, Jerry B. «Coagulation pathway and physiology». *An algorithmic approach to hemostasis testing* 1, n.º 1 (2008): 3-12.

- (20) Valentino, L. A., C. Negrier, G. Kohla, A. Tiede, R. Liesner, D. Hart, y S. Knaub. «The First Recombinant FVIII Produced in Human Cells – an Update on Its Clinical Development Programme». *Haemophilia* 20, n.º s1 (2014): 1-9. <https://doi.org/10.1111/hae.12322>.
- (21) Rasmussen, Brian, Ray Davis, James Thomas, y Pranhitha Reddy. «Isolation, characterization and recombinant protein expression in Veggie-CHO: A serum-free CHO host cell line». *Cytotechnology* 28, n.º 1-3 (noviembre de 1998): 31-42. <https://doi.org/10.1023/A:1008052908496>.
- (22) Ngo, Jacky Chi Ki, Mingdong Huang, David A. Roth, Barbara C. Furie, y Bruce Furie. «Crystal Structure of Human Factor VIII: Implications for the Formation of the Factor IXa-Factor VIIIa Complex». *Structure* 16, n.º 4 (8 de abril de 2008): 597-606. <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.03.001>.
- (23) Winge, Stefan, Louise Yderland, Christoph Kannicht, Pim Hermans, Simon Adema, Torben Schmidt, Gustav Gilljam, et al. «Development, upscaling and validation of the purification process for human-cl rhFVIII (Nuwiq®), a new generation recombinant factor VIII produced in a human cell-line». *Protein Expression and Purification* 115 (1 de noviembre de 2015): 165-75. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.08.023>.
- (24) Desai, Sunil G. «Continuous and semi-continuous cell culture for production of blood clotting factors». *Journal of Biotechnology, Integrated Continuous Biomanufacturing: A New Paradigm for Biopharmaceutical Production*, 213 (10 de noviembre de 2015): 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.02.021>.
- (25) Morfini, Massimo, y Carlo Antonio Paolo Rapisarda. «Safety of recombinant coagulation factors in treating hemophilia». *Expert Opinion on Drug Safety* 18, n.º 2 (1 de febrero de 2019): 75-85. <https://doi.org/10.1080/14740338.2019.1574743>.
- (26) Lai, Jesse, Christine Hough, Julie Tarrant, y David Lillicrap. «Biological Considerations of Plasma-Derived and Recombinant Factor VIII Immunogenicity». *Blood* 129, n.º 24 (15 de junio de 2017): 3147-54. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-11-750885>.
- (27) Harris, J. Milton, y Robert B. Chess. «Effect of pegylation on pharmaceuticals». *Nature Reviews Drug Discovery* 2, n.º 3 (1 de marzo de 2003): 214-21. <https://doi.org/10.1038/nrd1033>.
- (28) DeFrees, Shawn, Robert J. Bayer, Caryn Bowe, y Krishnasamy Panneerselvam. Glycopegylated Factor IX. United States US20160361427A1, filed 19 de agosto de 2016, y issued 15 de diciembre de 2016. <https://patents.google.com/patent/US20160361427A1/en>.
- (29) Rudmann, Daniel G., James T. Alston, Jeffrey C. Hanson, y Shawn Heidel. «High Molecular Weight Polyethylene Glycol Cellular Distribution and PEG-Associated Cytoplasmic Vacuolation Is Molecular Weight Dependent and Does Not Require Conjugation to Proteins». *Toxicologic Pathology* 41, n.º 7 (1 de octubre de 2013): 970-83. <https://doi.org/10.1177/0192623312474726>.