



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat Autònoma
de Barcelona

Validación metodológica para la comparación de versiones de omalizumab

TESIS DOCTORAL

DOCTORADO EN FARMACOLOGÍA

Adrián Urbano Sánchez

Dirigida por: Fernando de Mora Pérez

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, TERAPÉUTICA Y TOXICOLOGÍA

UNIDAD DE FARMACOLOGÍA, FACULTAD DE VETERINARIA



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 2021

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, TERAPÉUTICA Y TOXICOLOGÍA

UNIDAD DE FARMACOLOGÍA, FACULTAD DE VETERINARIA



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN FARMACOLOGÍA

Validación metodológica para la comparación de versiones de omalizumab

El **Dr. Fernando de Mora Pérez**, Catedrático del Departamento de Farmacología, de Terapéutica y Toxicología de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICA:

- Que la memoria titulada “**Validación metodológica para la comparación de versiones de omalizumab**”, cuyo autor es **Adrián Urbano Sánchez**, se ha realizado bajo su dirección, y considerando que cumple con las condiciones exigidas para optar al título de Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona, autoriza su defensa pública para que sea evaluada por el tribunal pertinente.

Y para que conste a los efectos que correspondan, firma el presente certificado en Bellaterra a 17 de noviembre de 2021.

Director de la Tesis

Doctorando

Fernando de Mora Pérez

Adrián Urbano Sánchez

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no hubiera sido posible sin la ayuda y el soporte de muchas personas a las que me gustaría expresar mi gratitud. Durante el transcurso de este viaje me han inspirado y ayudado en cada paso del camino. De alguna manera todos han puesto su granito de arena. Sin ellos este trabajo no habría sido posible.

En primer lugar quiero agradecer a Fernando que me diese la oportunidad de realizar esta tesis con él. Desde el primer día hasta el último tus conocimientos e inquietudes me han guiado para alcanzar el objetivo. He tenido mucha suerte de tenerte como jefe, me has enseñado muchísimo y me has hecho crecer personal y profesionalmente. Gracias por tu paciencia, por creer en mí y por hacer posible este proyecto.

Gracias también a todo el grupo. Sobre todo a ti Cristina, sé que parte del mérito de que Fernando se fijara en mí es tuyo. También a todo el Departamento de Farmacología por todas las herramientas y ayuda que me habéis dado tanto dentro como fuera del laboratorio.

Me gustaría también dar las gracias a Kymos por la experiencia y conocimientos ofrecidos. Sin vuestra ayuda no hubiera llegado al final de este camino.

Por último, quiero agradecer a mi familia, por apoyarme y animarme cuando era necesario. Mama, siempre has estado ahí apoyando y dándome caña. Tu energía me ha permitido llegar hasta el final. Papa, tus comidas los fines de semana y tus bromas han hecho este camino más soportable. Víctor, gracias por hacerme perder el tiempo, entretenerme y hacerme olvidar el trabajo con todas las frikezes que nos gustan. Abuela, gracias por acogerme todo este tiempo y por darme conversación y trabajo... todas estas tardes. Gracias también a Laia que durante todos estos años ha sufrido mis dudas e inseguridades con una paciencia que solo una buena maestra puede tener.

El recuerdo de estos años de aprendizaje y trabajo permanecerá siempre presente en mi vida. Muchas gracias a todos. Esta tesis está dedicada a todos y cada uno de vosotros.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE TABLAS	17
ABREVIATURAS	25
1. RESUMEN	33
2. INTRODUCCIÓN: Comparabilidad Analítica: clave en la anticipación de equivalencia terapéutica	39
2.1. Medicamentos biológicos: variabilidad aceptable	39
2.1.1. Medicamentos biológicos originales: variabilidad entre lotes	39
2.1.2. Variabilidad: potencial impacto clínico	40
2.1.3. Variabilidad aceptada: control regulatorio garantista.....	41
2.2. Omalizumab: caracterización molecular y funcional	42
2.2.1. Omalizumab: actividad y efecto terapéutico	42
2.2.2. Atributos críticos de omalizumab.....	43
2.2.3. Variabilidad aceptada del medicamento original Xolair® (omalizumab)	45
2.3. Versiones con omalizumab: relevancia de la comparabilidad analítica	46
2.3.1. Biosimilares: concepto	46
2.3.2. Biosimilares de Xolair®.....	48
2.3.3. Analítica: clave en la comparabilidad de versiones con omalizumab	49
3. HIPÓTESIS & OBJETIVOS	53
3.1. Hipótesis	53
3.2. Objetivos	53
4. SUB-PROYECTOS	57
Resumen del abordaje experimental	57
4.1. SUB-PROYECTO 1: Obtención de versiones/variante de omalizumab y puesta a punto de estudios clave para la comparabilidad fisicoquímica (Objetivo 1)	61
4.1.1. Introducción: planteamiento experimental	61
4.1.2. Material y métodos	65
4.1.3. Resultados y discusión	77

4.1.4.	Conclusiones.....	97
4.2.	SUB-PROYECTO 2: Desarrollo de una metodología para comparar la actividad biológica de versiones/variantes de omalizumab (Objetivo 2). ...	101
4.2.1.	Introducción: planteamiento experimental	101
4.2.2.	Material y métodos	103
4.2.3.	Resultados y discusión	119
4.2.4.	Conclusiones.....	133
4.3.	SUB-PROYECTO 3: Sinergismo entre versiones/variante de omalizumab y agonismo EP₂ (Objetivo 3).	137
4.3.1.	Introducción: planteamiento experimental	137
4.3.2.	Material y métodos	139
4.3.3.	Resultados y discusión	151
4.3.4.	Conclusiones.....	165
5.	DISCUSIÓN GENERAL	169
5.1.	Versiones y variantes de omalizumab	170
5.1.1.	Selección de versiones y variantes	170
5.1.2.	Confirmación de la estructura primaria	171
5.2.	Caracterización estructural y variabilidad inherente	172
5.2.1.	Glicosilación de omalizumab	172
5.2.2.	Conformación espacial de omalizumab: la luz del sincrotrón	173
5.3.	Sensibilidad de las pruebas funcionales <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	174
5.3.1.	Capacidad discriminatoria de los estudios funcionales	175
5.3.2.	Limitaciones de las técnicas <i>in vivo</i>	177
5.4.	Estudios de actividad sinérgica	178
5.5.	Programa Predictivo de Biosimilaridad (PPB)	178
6.	CONCLUSIONES	185
7.	REFERENCIAS	189
8.	ANEXOS	205
8.1.	Anexo 1. Gráficas de los análisis del estudio de glicosilación	205
8.1.1.	Anexo 1.1. Cromatogramas de los triplicados analizados por HILIC.....	205

8.1.2.	Anexo 1.2. Digestión y caracterización de los <i>N</i> -glicanos	210
8.1.3.	Anexo 1.3. Estudio de unión de los ácidos siálicos	221
8.1.4.	Anexo 1.4. Estudio de unión de la β -galactosa	226
8.1.5.	Anexo 1.5. Análisis de la fucosilación de los brazos exteriores	231
8.1.6.	Anexo 1.6. Resultado del análisis por la técnica WAX.....	236
8.1.7.	Anexo 1.7. Resultados del análisis de espectrometría de masas.....	244
8.2.	Anexo 2. Imágenes cristales de las placas de cribado.....	267
8.3.	Anexo 3. Estadísticas de la colección de los cristales de Fab	268
8.4.	Anexo 4. Tablas resumen con los resultados de SPR	269
8.5.	Anexo 5. Comparación de la actividad <i>in vitro</i> en células RS-ATL8.....	272

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplo de variabilidad intrínseca entre lotes de un fármaco biológico (principio activo etanercept) en el contenido total de ácidos siálicos (TSA).	40
Figura 2. Desviación de ciertos atributos fisicoquímicos al modificarse las condiciones de fabricación del medicamento biotecnológico Rituxan®/Mabthera®.	40
Figura 3. Mecanismo de acción de omalizumab en el asma alérgico.	43
Figura 4. Pasos en la demostración de biosimilaridad.	49
Figura 5. Esquema del ensamblado de los datos obtenidos por LC-MS/MS a partir de las múltiples digestiones enzimáticas del anticuerpo omalizumab de Xolair®.	78
Figura 6. Resultado del análisis de secuenciación mediante PMF de vaOMA.	80
Figura 7. Resultado del ensamblado de los datos obtenidos por LC-MS/MS a partir de las múltiples digestiones enzimáticas del anticuerpo expresado veOMA.	81
Figura 8. Sobreposición de los cromatogramas de la técnica HILIC de las 5 moléculas de omalizumab.	83
Figura 9. Representación gráfica de la estructura de un glicano.	89
Figura 10. Foto de la gota de la placa de optimización con los cristales de la molécula omalizumab intacta.	91
Figura 11. Representación gráfica del resultado al digerir con papaína un anticuerpo.	92
Figura 12. Imagen del gel SDS-PAGE 12% reductor para evaluar la eficiencia de la digestión y purificación.	92
Figura 13. Purificación de la fracción Fab.	93
Figura 14. Empaquetado observado en la estructura cristalina OF.	94
Figura 15. Empaquetado observado en la estructura cristalina MF.	95
Figura 16. Esquema del modelo de anafilaxia cutánea pasiva (PCA) en ratones transgénicos (FcεRI-/-hFcεRI+).	114
Figura 17. Sensorgrama ejemplo del análisis de interacción SPR usando como ligando IgE y como analito omalizumab.	119
Figura 18. Representación gráfica de las constantes obtenidas en los análisis de interacción omalizumab-IgE realizados mediante la tecnología SPR de las moléculas análogas con función anti-hIgE (Xolair®, vaOMA y veOMA).	122

Figura 19. Puntuación de similaridad (%) de las diferentes moléculas anti-IgE evaluadas	123
Figura 20. Representación gráfica de la variabilidad entre lotes de Xolair®.....	126
Figura 21. Comparación la capacidad inhibitoria (%) dosis-dependiente (Cantidad de omalizumab entre cantidad de IgE administrados) de la liberación de β -hexosaminidasa de diferentes versiones/variantes de omalizumab.....	127
Figura 22. Comparación del efecto inhibitor ($\%$) de los anticuerpos anti-IgE en la respuesta inflamatoria mediada por MC en el modelo PCA.....	131
Figura 23. Protocolos experimentales.....	140
Figura 24. Esquema del protocolo del modelo de anafilaxia cutánea pasiva (PCA) para estudiar sinergismo en ratones transgénicos (Fc ϵ RI $^{-/-}$ hFc ϵ RI $^{+}$).....	148
Figura 25. Actividad mastocitaria de ratones WT y TG que sobreexpresan el receptor EP $_2$ en los MC.....	152
Figura 26. Evaluación de la inflamación de las vías aéreas mediante recuento diferencial de células inflamatorias (E, eosinófilos; M, macrófagos; L, linfocitos; N, neutrófilos).....	154
Figura 27. Hiperreactividad de las vías aéreas evaluada mediante un sistema de pletismografía invasiva y expresado como porcentaje de resistencia pulmonar ($\%R_L$).....	156
Figura 28. Efecto del agonista selectivo de EP $_2$ butaprost en la desgranulación mastocitaria en la línea celular humana de mastocitos LAD2.....	158
Figura 29. Efecto del agonista selectivo de EP $_2$ evatanepag en la desgranulación mastocitaria en la línea celular humana de mastocitos LAD2.....	158
Figura 30. Efecto de la combinación entre agonismo EP $_2$ y bloqueo de la IgE.....	161
Figura 31. Efecto inhibitor ($\%$) de la combinación entre agonismo EP $_2$ mediante butaprost y bloqueo de la IgE con omalizumab del producto comercializado Xolair® en la respuesta mastocitaria en el modelo PCA.....	163
Figura 32. Cromatogramas del análisis por triplicado de los glicanos marcados fluorescentemente con 2-AB del lote 1 de Xolair® por la técnica HILIC.....	205
Figura 33. Cromatogramas del análisis por triplicado de los glicanos marcados fluorescentemente con 2-AB del lote 2 de Xolair® por la técnica HILIC.....	206
Figura 34. Cromatogramas del análisis por triplicado de los glicanos marcados fluorescentemente con 2-AB del lote 3 de Xolair® por la técnica HILIC.....	207
Figura 35. Cromatogramas del análisis por triplicado de los glicanos marcados fluorescentemente con 2-AB del lote 4 de Xolair® por la técnica HILIC.....	208

Figura 36. Cromatogramas del análisis por triplicado de los glicanos marcados fluorescentemente con 2-AB de un lote de la molécula veOMA por la técnica HILIC.	209
Figura 37. Cromatogramas de la técnica de separación por HILIC de la muestra de <i>N</i> -glicanos del lote 1 de Xolair®.....	210
Figura 38. Cromatogramas de la técnica de separación por HILIC de la muestra de <i>N</i> -glicanos del lote 2 de Xolair®.....	211
Figura 39. Cromatogramas de la técnica de separación por HILIC de la muestra de <i>N</i> -glicanos del lote 3 de Xolair®.....	212
Figura 40. Cromatogramas de la técnica de separación por HILIC de la muestra de <i>N</i> -glicanos del lote 4 de Xolair®.....	213
Figura 41. Cromatogramas de la técnica de separación por HILIC de la muestra de <i>N</i> -glicanos de la versión de omalizumab veOMA.....	214
Figura 42. Sitio de corte específico de las enzimas glicosidasas.....	220
Figura 43. Cromatogramas obtenidos al separar por HILIC los <i>N</i> -glicanos no digeridos (UND) del lote 1 de Xolair® antes y después de ser digeridos con NAN1 y ABS.....	221
Figura 44. Cromatogramas obtenidos al separar por HILIC los <i>N</i> -glicanos no digeridos (UND) del lote 2 de Xolair® antes y después de ser digeridos con NAN1 y ABS.....	222
Figura 45. Cromatogramas obtenidos al separar por HILIC los <i>N</i> -glicanos no digeridos (UND) del lote 3 de Xolair® antes y después de ser digeridos con NAN1 y ABS.....	223
Figura 46. Cromatogramas obtenidos al separar por HILIC los <i>N</i> -glicanos no digeridos (UND) del lote 4 de Xolair® antes y después de ser digeridos con NAN1 y ABS.....	224
Figura 47. Cromatogramas obtenidos al separar por HILIC los <i>N</i> -glicanos no digeridos (UND) de la versión veOMA de omalizumab antes y después de ser digeridos con NAN1 y ABS.....	225
Figura 48. Cromatogramas obtenidos al separar por HILIC los <i>N</i> -glicanos no digeridos (UND) del lote 1 de Xolair® antes y después de ser digeridos con ABS + BKF, ABS+BKF+SPG y ABS+BKF+BTG.	226
Figura 49. Cromatogramas obtenidos al separar por HILIC los <i>N</i> -glicanos no digeridos (UND) del lote 2 de Xolair® antes y después de ser digeridos con ABS + BKF, ABS+BKF+SPG y ABS+BKF+BTG.	227
Figura 50. Cromatogramas obtenidos al separar por HILIC los <i>N</i> -glicanos no digeridos (UND) del lote 3 de Xolair® antes y después de ser digeridos con ABS + BKF, ABS+BKF+SPG y ABS+BKF+BTG.	228

Figura 51. Cromatogramas obtenidos al separar por HILIC los <i>N</i> -glicanos no digeridos (UND) del lote 4 de Xolair® antes y después de ser digeridos con ABS + BKF, ABS+BKF+SPG y ABS+BKF+BTG.	229
Figura 52. Cromatogramas obtenidos al separar por HILIC los <i>N</i> -glicanos no digeridos (UND) de la versión veOMA de omalizumab antes y después de ser digeridos con ABS + BKF, ABS+BKF+SPG y ABS+BKF+BTG.....	230
Figura 53. Cromatogramas HILIC de los <i>N</i> -glicanos del lote 1 de Xolair® antes y después de ser digeridos con ABS y ABS+AMF.....	231
Figura 54. Cromatogramas HILIC de los <i>N</i> -glicanos del lote 2 de Xolair® antes y después de ser digeridos con ABS y ABS+AMF.....	232
Figura 55. Cromatogramas HILIC de los <i>N</i> -glicanos del lote 3 de Xolair® antes y después de ser digeridos con ABS y ABS+AMF.....	233
Figura 56. Cromatogramas HILIC de los <i>N</i> -glicanos del lote 4 de Xolair® antes y después de ser digeridos con ABS y ABS+AMF.....	234
Figura 57. Cromatogramas HILIC de los <i>N</i> -glicanos de la versión veOMA de omalizumab antes y después de ser digeridos con ABS y ABS+AMF.....	235
Figura 58. Resultado de las cromatografías WAX-HPLC de los <i>N</i> -glicanos de la fetuina (control), <i>N</i> -glicanos de la muestra no digeridos (UND) y digeridos con ABS del lote 1 de Xolair®.....	236
Figura 59. Resultado de las cromatografías WAX-HPLC de los <i>N</i> -glicanos de la fetuina (control), <i>N</i> -glicanos de la muestra no digeridos (UND) y digeridos con ABS del lote 2 de Xolair®.....	237
Figura 60. Resultado de las cromatografías WAX-HPLC de los <i>N</i> -glicanos de la fetuina (control), <i>N</i> -glicanos de la muestra no digeridos (UND) y digeridos con ABS del lote 3 de Xolair®.....	238
Figura 61. Resultado de las cromatografías WAX-HPLC de los <i>N</i> -glicanos de la fetuina (control), <i>N</i> -glicanos de la muestra no digeridos (UND) y digeridos con ABS del lote 4 de Xolair®.....	239
Figura 62. Resultado de las cromatografías WAX-HPLC de los <i>N</i> -glicanos de la fetuina (control), <i>N</i> -glicanos de la muestra no digeridos (UND) y digeridos con ABS de la versión veOMA de omalizumab.	240
Figura 63. Perfiles cromatógraficos obtenidos al analizar usando la técnica HILIC cada fracción cargada de <i>N</i> -glicanos previamente separados mediante la técnica WAX del lote 1 de Xolair®.....	241
Figura 64. Perfiles cromatógraficos obtenidos al analizar usando la técnica HILIC cada fracción cargada de <i>N</i> -glicanos previamente separados mediante la técnica WAX del lote 2 de Xolair®.....	241

Figura 65. Perfiles cromatográficos obtenidos al analizar usando la técnica HILIC cada fracción cargada de <i>N</i> -glicanos previamente separados mediante la técnica WAX del lote 3 de Xolair®.....	242
Figura 66. Perfiles cromatográficos obtenidos al analizar usando la técnica HILIC cada fracción cargada de <i>N</i> -glicanos previamente separados mediante la técnica WAX del lote 4 de Xolair®.....	242
Figura 67. Perfiles cromatográficos obtenidos al analizar usando la técnica HILIC cada fracción cargada de <i>N</i> -glicanos previamente separados mediante la técnica WAX de la muestra de la versión veOMA.	243
Figura 68. Cromatogramas y picos base para el Lote 1 de Xolair® (HILIC-FLD-MS).	244
Figura 69. Cromatogramas y picos base para el Lote 2 de Xolair® (HILIC-FLD-MS).	246
Figura 70. Cromatogramas y picos base para el Lote 3 de Xolair® (HILIC-FLD-MS).....	248
Figura 71. Cromatogramas y picos base para el Lote 4 de Xolair® (HILIC-FLD-MS).....	250
Figura 72. Cromatogramas y picos base para la versión veOMA (HILIC-FLD-MS)	252
Figura 73. Cromatogramas y picos base para una muestra conjunta con los cuatro lotes de Xolair® digerida con ABS (HILIC-FLD-MS).	254
Figura 74. Cromatogramas y picos base para una muestra conjunta con los cuatro lotes de Xolair® digerida con ABS+BKF (HILIC-FLD-MS).....	256
Figura 75. Cromatogramas y picos base para una muestra conjunta con los cuatro lotes de Xolair® digerida con ABS+BKF+SPG (HILIC-FLD-MS).	258
Figura 76. Cromatogramas y picos base para una muestra conjunta con los cuatro lotes de Xolair® digerida con ABS+BKF+SPG+GUH (HILIC-FLD-MS).....	259
Figura 77. Cromatogramas y picos base para la versión veOMA digerida con ABS (HILIC-FLD-MS).	260
Figura 78. Cromatogramas y picos base para la versión veOMA digerida con ABS+BKF (HILIC-FLD-MS).....	262
Figura 79. Cromatogramas y picos base para la versión veOMA digerida con ABS+BKF+SPG (HILIC-FLD-MS).....	264
Figura 80. Cromatogramas y picos base para la versión veOMA digerida con ABS+BKF+SPG+GUH (HILIC-FLD-MS).....	266
Figura 81. Gotas con cristales obtenidos en la placa de cribado Index™.	267
Figura 82. Gotas con cristales obtenidos en la placa de cribado JCSG-plus™ para la concentración proteica 20mg/mL.	267

Figura 83. Gotas con cristales obtenidos en la placa de cribado Structure para la concentración proteica 20mg/mL..... 267

Figura 84. Comparación de la inhibición (%) dosis-dependiente de la liberación de β -hexosaminidasa de diferentes versiones/variantes de omalizumab en células RS-ATL8..... 272

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Candidatos a biosimilar de omalizumab en desarrollo (Tabla actualizada en septiembre de 2021).	48
Tabla 2. Muestras empleadas en el Estudio 1.1.....	65
Tabla 3. Tabla con el gradiente de fases para el análisis de PMF.....	67
Tabla 4. Lista de equipos y softwares utilizados en el Estudio 1.1 del Sub-proyecto 1.....	67
Tabla 5. Lista de reactivos utilizados en el Estudio 1.1 del Sub-proyecto 1.....	67
Tabla 6. Muestras empleadas en el análisis de caracterización de N-glicanos.....	68
Tabla 7. Detalles y parámetros del método HILIC-UPLC.	69
Tabla 8. Detalles y parámetros del método WAE-HPLC.	70
Tabla 9. Detalles y parámetros del método de espectrometría de masas.....	70
Tabla 10. Lista de columnas, equipos y programas utilizados en el Estudio 1.2 del Sub-proyecto 1.....	71
Tabla 11. Lista de reactivos y materiales utilizados en el Estudio 1.2 del Sub-proyecto 1.	71
Tabla 12. Detalles de las muestras empleadas para la caracterización nanoestructural mediante la luz del sincrotrón.....	72
Tabla 13. Nombre de los kits de cribado utilizados en las pruebas de cristalización de la proteína entera.	73
Tabla 14. Lista de columnas y equipos utilizados en el Estudio 1.3 del Sub-proyecto 1.....	75
Tabla 15. Lista de reactivos utilizados en el Estudio 1.3 del Sub-proyecto 1.....	76
Tabla 16. Secuencia aminoacídica de Xolair® y de la versión de omalizumab (veOMA).....	79
Tabla 17. Secuencia aminoacídica de la variante de omalizumab (vaOMA).....	79
Tabla 18. Tabla resumen indicando las unidades de glucosa (GU), estructuras de glicanos y los porcentajes de área relativos de las estructuras identificadas en las 5 muestras de omalizumab por UPLC, digestiones con exoglicosidasas, WAX y LC-MS análisis.	84
Tabla 19. Tabla con los porcentajes de abundancia relativa de estructuras sializadas (totales, mono-sializadas (S1) y di-sializadas (S2)) para la mezcla de todos los N-glicanos de las cinco muestras de omalizumab analizadas.	90
Tabla 20. Muestras empleadas en el análisis y comparación de la capacidad de unión de moléculas análogas con función anti-IgE humana mediante SPR.	103

Tabla 21. Equipos y softwares utilizados para la técnica de SPR (Biacore™).....	105
Tabla 22. Lista de reactivos y materiales utilizados para la técnica de SPR (Biacore™).	105
Tabla 23. Muestras empleadas en el análisis y comparación de la actividad biológica <i>in vitro</i>	106
Tabla 24. Detalles del tampón “Buffer reléase” para el ensayo de desgranulación mastocitaria.	109
Tabla 25. Composición de la preparación del tampón citrato con el que se disuelve el PNAG para el ensayo de desgranulación mastocitaria.....	109
Tabla 26. Cantidades para preparar Glicina al 400mM para el ensayo de desgranulación mastocitaria.	109
Tabla 27. Lista de reactivos del Estudio 2.2 del Sub-proyecto 2 (ensayo liberación de β-hexosaminidasa).	111
Tabla 28. Equipos utilizados en los ensayos celulares de liberación de β-hexosaminidasa, Estudio 2.2 del Sub-proyecto 2.....	112
Tabla 29. Muestras empleadas en el análisis de la actividad biológica mediante el modelo PCA.....	112
Tabla 30. Tabla detallando los grupos experimentales del estudio de la actividad biológica mediante PCA.	116
Tabla 31. Lista con los equipos utilizados en el Estudio 2.3 del Sub-proyecto 2 (PCA).....	116
Tabla 32. Lista de materiales utilizados en el Estudio 2.3 del Sub-proyecto 2 (PCA).	117
Tabla 33. Lista de reactivos utilizados en el Estudio 2.3 del Sub-proyecto 2 (PCA).	117
Tabla 34. Resultados del análisis usando como ligando las moléculas anti-IgE y como analito la IgE.	120
Tabla 35. Resultados del análisis a 37°C usando como ligando las moléculas anti-IgE y como analito la IgE.	120
Tabla 36. Tabla comparativa de la capacidad de unión a la diana de las versiones/variantes anti-IgE estudiadas.....	121
Tabla 37. Valores de la repetibilidad. Se presentan las medias de inhibición (%) dosis-dependientes de cuatro experimentos realizados en días diferentes.	124
Tabla 38. Tabla resumen de la variabilidad entre lotes del producto comercializado Xolair®.	125
Tabla 39. Tabla con los valores cuantitativos de la inhibición (%) de las distintas dosis del ensayo de liberación de β-hexosaminidasa comparativo entre Xolair® y la variante vaOMA usando la línea celular LAD2.....	128

Tabla 40. Tabla con los valores cuantitativos de la inhibición (%) de las distintas dosis del ensayo de liberación de β -hexosaminidasa comparativo entre Xolair® y la versión veOMA usando la línea celular LAD2.....	128
Tabla 41. Valores cuantitativos de la inhibición (%) de las distintas dosis del ensayo de liberación de β -hexosaminidasa comparativo entre Xolair® y la variante vaOMA usando la línea celular RS-ATL8..	129
Tabla 42. Valores cuantitativos de la inhibición (%) de las distintas dosis del ensayo de liberación de β -hexosaminidasa comparativo entre Xolair® y la versión veOMA usando la línea celular RS-ATL8...	130
Tabla 43. Valores cuantitativos de la inhibición (%) obtenidos en el ensayo de PCA en ratones transgénicos que expresan el receptor humano Fc ϵ RI.....	132
Tabla 44. Tampón de lisis HEPES para la extracción de proteínas.	141
Tabla 45. Grupos experimentales del estudio de validación del receptor EP ₂ empleando el protocolo básico de sensibilización con HDM.	142
Tabla 46. Grupos experimentales del estudio de validación del receptor EP ₂ empleando el protocolo de sensibilización y pretratamiento.	142
Tabla 47. Equipos utilizados en el Estudio 3.1 del Sub-proyecto 3.	143
Tabla 48. Material y reactivos utilizados en el Estudio 3.1 del Sub-proyecto 3.....	143
Tabla 49. Grupos experimentales para la caracterización de la capacidad inhibitoria mastocitaria de los agonistas de EP ₂ butaprost y evatanepag mediante el ensayo de liberación de β -hexosaminidasa en LAD2.....	146
Tabla 50. Grupos experimentales para la evaluación del sinergismo de los agonistas de EP ₂ (butaprost y evatanepag) junto a omalizumab del producto comercializado Xolair® mediante el ensayo de liberación de β -hexosaminidasa en LAD2.	146
Tabla 51. Grupos experimentales para el estudio del sinergismo omalizumab/butaprost mediante PCA.	149
Tabla 52. Equipos utilizados en el Estudio 3.2 del Sub-proyecto 3 (ensayos de liberación de β -hexosaminidasa y PCA).	150
Tabla 53. Reactivos utilizados en el Estudio 3.2 del Sub-proyecto 3.	150
Tabla 54. Efectos inhibitorios de las condiciones estudiadas en la Figura 30A.....	159
Tabla 55. Efectos inhibitorios de las condiciones estudiadas en la Figura 30B.....	160
Tabla 56. Efectos inhibitorios (%) de las condiciones estudiadas en la Figura 31.	162
Tabla 57. Resumen de la propuesta del PPB.....	181

Tabla 58. Tabla indicando las estructuras presentes en las digestiones en las muestras de Xolair®... 215	215
Tabla 59. Tabla indicando las estructuras presentes en las digestiones en la muestra de veOMA..... 217	217
Tabla 60. Tabla con el nombre y la actividad de las enzimas utilizadas en la caracterización del patrón de glicosilación. 220	220
Tabla 61. Estructuras de <i>N</i> -glicanos propuestas a partir del análisis de la muestra omalizumab. 245	245
Tabla 62. Estructuras de <i>N</i> -glicanos propuestas a partir del análisis de la muestra omalizumab. 247	247
Tabla 63. Estructuras de <i>N</i> -glicanos propuestas a partir del análisis de la muestra omalizumab. 249	249
Tabla 64. Estructuras de <i>N</i> -glicanos propuestas a partir del análisis de la muestra omalizumab. 251	251
Tabla 65. Estructuras de <i>N</i> -glicanos propuestas a partir del análisis de la muestra omalizumab. 252	252
Tabla 66. Estructuras de <i>N</i> -glicanos propuestas a partir del análisis de la muestra conjunta con los cuatro lotes de Xolair® digerida con ABS (HILIC-FLD-MS)..... 255	255
Tabla 67. Estructuras de <i>N</i> -glicanos propuestas a partir del análisis de la muestra conjunta con los cuatro lotes de Xolair® digerida con ABS+BKF (HILIC-FLD-MS)..... 257	257
Tabla 68. Estructuras de <i>N</i> -glicanos propuestas a partir del análisis de la muestra conjunta con los cuatro lotes de Xolair® digerida con ABS+BKF+SPG (HILIC-FLD-MS)..... 258	258
Tabla 69. Estructuras de <i>N</i> -glicanos propuestas a partir del análisis de la muestra conjunta con los cuatro lotes de Xolair® digerida con ABS+BKF+SPG+GUH (HILIC-FLD-MS). 259	259
Tabla 70. Estructuras de <i>N</i> -glicanos propuestas a partir del análisis de la versión veOMA digerida con ABS (HILIC-FLD-MS). 261	261
Tabla 71. Estructuras de <i>N</i> -glicanos propuestas a partir del análisis de la versión veOMA digerida con ABS+BKF (HILIC-FLD-MS). 263	263
Tabla 72. Estructuras de <i>N</i> -glicanos propuestas a partir del análisis de la versión veOMA digerida con ABS+BKF+SPG (HILIC-FLD-MS)..... 265	265
Tabla 73. Estructuras propuestas de la versión veOMA digerida con ABS+BKF+SPG+GUH (HILIC-FLD-MS)..... 266	266
Tabla 74. Estadísticas de la colección de los datos para forma cristalina OF. 268	268
Tabla 75. Estadísticas de la colección de los datos para forma cristalina MF. 268	268
Tabla 76. Tabla resumen con los resultados obtenidos de la variante vaOMA mediante la técnica SPR. 269	269
Tabla 77. Tablas resumen de los resultados obtenidos de la versión de veOMA mediante la técnica SPR: 269	269

Tabla 78. Tabla resumen de los resultados obtenidos al analizar diferentes lotes de Xolair® mediante la técnica SPR..... 270

ABBREVIATURAS



ABREVIATURAS

2-AB:	2-aminobenzamida
µL:	Microlitro
Å:	Ángstrom (1x10 ⁻¹⁰ m)
ABC:	Bicarbonato de amonio
ABS:	Neuraminidasa (sialidasa) de <i>Arthrobacter ureafaciens</i> (<i>Arthrobacter ureafaciens Sialidase</i>)
ACN:	Acetonitrilo
ADCC:	Citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (<i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>)
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AHR:	Hiperreactividad de las vías aéreas (<i>Airway Hyperresponsiveness</i>)
ALBA:	Instalación en Cerdanyola con tecnología de Luz Sincrotrón de 3 ^a generación
Asn301:	Asparagina de la posición 301
Asp32:	Ácido aspártico de la posición 32
Asp N:	Endoproteinasa Asp N
ASU:	Unidad asimétrica (<i>Asymmetric Unit</i>)
BAL:	Lavado broncoalveolar (<i>Bronchoalveolar Lavage</i>)
BALB/c:	Cepa de ratón albino ampliamente utilizada en la experimentación con animales
BKF:	α-Fucosidasa bovina de riñón (<i>Bovine Kidney α-Fucosidase</i>)
BSA:	Albúmina sérica bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
BTG:	β-Galactosidasa bovina extraída de testículos (<i>Bovine Testis β-Galactosidase</i>)
°C:	Grados Celsius o centígrado
CA:	California
CBATEG:	Centre de Biotecnologia Animal i de Teràpia Gènica
CCiT-UB:	Centre Científic i Tecnològic de la Universitat de Barcelona
CD:	Dicroísmo circular (<i>Circular Dichroism</i>)
CDC:	Citotoxicidad dependiente del complemento (<i>Complement-Dependent Cytotoxicity</i>)
CDR:	Región determinante de la complementariedad (<i>Complementarity Determining Regions</i>)
CHO:	Línea celular derivada de ovario de hámster chino (<i>Chinese Hamster Ovary</i>)
CMC:	Control de fabricación de productos químicos (<i>Chemistry Manufacturing and Control</i>)
cmH₂O:	Unidad de presión (centímetro de columna de agua)
cmH₂O·s/mL:	Unidad de resistencia pulmonar
CO₂:	Dióxido de carbono
CQAs:	Atributos críticos de calidad (<i>Critical Quality Attributes</i>)

Cys:	Cisteína
Da:	Daltons (unidad de masa atómica)
DMSO:	Dimetilsulfósido
DTT:	DL-Dithiothreitol
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
EEUU:	Estados Unidos de América
ELISA:	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
EMA:	Agencia Europea de Medicamentos (<i>European Medicines Agency</i>)
EP₂:	Receptor prostanoides de la Prostaglandina E2
EPO:	Eritropoyetina
e.g.:	Por ejemplo (<i>exemplum gratia</i>)
Fab:	Fragmento de unión a antígeno (<i>Fragment Antigen-Binding</i>)
FBS:	Suero fetal bovino (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
Fc:	Fragmento cristalizante de un anticuerpo
FcεRI:	Receptor de alta afinidad para la inmunoglobulina E
FCER1A:	Gen/proteína del receptor de alta afinidad para el fragmento Fc de la IgE
FLD:	Detector fluorescente (<i>Fluorescence detector</i>)
g:	Gramos o fuerza g
g/L:	Gramos por litro (unidad de concentración)
GU:	Unidades de glucosa (<i>Glucose Units</i>)
GUH:	Hexosaminidasa de <i>Streptococcus pneumoniae</i> (<i>Streptococcus pneumoniae Hexosaminidase</i>)
H₂O:	Agua
HDM:	Ácaros del polvo (<i>House Dust Mite</i>)
HEK-293:	Células embrionarias de riñón humano 293 (<i>Human Embryonic Kidney cells</i>)
HEPES:	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico
hIgE:	Inmunoglobulina E humana
hIgG:	Inmunoglobulina G humana
HILIC:	Cromatografía líquida de interacción hidrofílica (<i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i>)
HPLC:	Cromatografía líquida de alta presión (<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>)
HR:	Alta resolución (<i>High Resolution</i>)
IgE:	Inmunoglobulina E
IgG:	Inmunoglobulina G
IL:	Illinois
IL-5:	Interleucina 5
i.d.:	Administración intradérmica

i.e.:	Es decir (<i>id est</i>)
i.n.:	Administración intranasal
i.p.:	Administración intraperitoneal
i.v.:	Administración intravenosa
k_a:	Constante de asociación
k_d:	Constante de disociación
K_D:	Constante de afinidad
LAD2:	<i>Laboratory of Allergic Diseases 2</i> (Línea celular de mastocitos humanos)
LC:	Cromatografía líquida (<i>Liquid Chromatography</i>)
mAb:	Anticuerpo monoclonal
mM:	Milimolar
mMCP1:	Proteasa de mastocitos de ratón (<i>Mouse Mast Cell Protease-1</i>)
M:	Molar (Molaridad)
MA:	Massachusetts
mAb:	Anticuerpo monoclonal
MC:	Mastocitos
MEM:	Medio esencial mínimo (<i>Minimum Essential Medium</i>)
MF:	Estructura cristalina monoclinica
mg:	Miligramos
mg/kg:	Unidad de dosificación (miligramo por kilogramo)
mg/mL:	Unidad de concentración (miligramo por mililitro)
mL:	Mililitros
mL/kg:	Unidad de dosificación (mililitro por kilogramo)
MS:	Espectrometría de masas (<i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS:	Espectrometría de masas en tándem (<i>Tandem Mass Spectrometry</i>)
MWCO:	Punto de corte del peso molecular (<i>Molecular weight cut-off</i>)
NA:	No Aplica
NAN1:	Neuraminidasa (Sialidasa) del virus Influenza A recombinante
NANA:	Ácido N-acetilneuramínico o Neu5Ac
NFAT:	Factor nuclear de células T Activadas (<i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i>)
ng:	Nanogramos
NGNA:	Ácido N-glicolilneuramínico o Neu5Gc
NIAID-NIH:	<i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases - National Institute of Health</i>
NIBRT:	<i>National Institute for Bioprocessing Research and Training</i>
NIHS:	<i>National Institute of Health Sciences</i>

NJ:	Nueva Jersey
nL:	Nanolitro
NMR:	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (<i>Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy</i>)
NP:	Nitrofenil
NP-BSA:	Nitrofenil unido a albúmina sérica bovina
NS:	No sensibilizado
NY:	Nueva York
OD:	Densidad óptica (<i>Optic Density</i>)
OF:	Estructura cristalina ortorrómbica
vaOMA:	Variante de omalizumab producida
veOMA:	Versión de omalizumab producida
ON:	Incubación durante la noche (<i>Overnight</i>)
PA:	Pensilvania
PAGE:	Gel de electroforesis de poliacrilamida (<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
PBS:	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCA:	Anafilaxia cutánea pasiva (<i>Passive Cutaneous Anaphylaxis</i>)
PD:	Farmacodinámica
PDB:	<i>Protein Data Bank</i>
PEG3350:	Polietilenglicol 3350
PF:	Antagonista específico de EP ₂ PF-04418948
PK:	Farmacocinética
PMF:	Mapa de huella peptídica (<i>Peptide Map Fingerprint</i>)
PMSF:	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (<i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i>)
PNAG:	4-Nitrofenil N-acetil-β-D-glucosaminida
PNGase F:	N-glicosidasa F
PPB:	Programa Predictivo de Biosimilaridad
PTM:	Modificación post-traduccional (<i>Post-Translational Modification</i>)
RBL-SX38:	Células basofílicas leucémicas de rata (<i>Rat basophilic leukemia cells</i>)
R_L:	Resistencia pulmonar
RPMI:	Medio de cultivo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT:	Temperatura ambiente (<i>Room Temperature</i>)
RS-ATL8:	Línea celular RS de basófilos humanizados de rata leucémica (<i>RBL-SX38 cell stably transfected with NFAT-Luciferase clone 8</i>)
RSD:	Coefficiente de variación (<i>Relative Standard Deviation</i>)
RU:	Unidad de resonancia (<i>Resonance Unit</i>)
SA:	Estreptavidina

SCF:	Factor de células madre (<i>Stem Cell Factor</i>)
SDS:	Dodecilsulfato sódico (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SEC:	Cromatografía de exclusión por tamaño (<i>Size-Exclusion Chromatography</i>)
SEM:	Error estándar de la media (<i>Standard Error of the Mean</i>)
SNS:	Sistema Nacional de Salud
SPG:	β -Galactosidasa de <i>Streptococcus pneumoniae</i> (<i>Streptococcus pneumoniae β-Galactosidase</i>)
SPR:	Resonancia de plasmón superficial (<i>Surface Plasmon Resonance</i>)
TG:	Animal transgénico
TOST:	Prueba de equivalencia (<i>Two One-Sided Test</i>)
TSA:	Ácidos siálicos totales (<i>Total Sialic Acids</i>)
UAB:	Universitat Autònoma de Barcelona
UCD:	<i>University College Dublin</i>
UK:	Reino Unido (<i>United Kingdom</i>)
UOXF:	Sistema de símbolos de Oxford para representar glicanos
UPLC:	Cromatografía líquida de alto rendimiento (<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>)
VH:	Región variable de la cadena pesada de un anticuerpo
VL:	Región variable de la cadena ligera de un anticuerpo
w/v:	Porcentaje peso/volumen (g de soluto/100mL de solución)
WAX:	Intercambio aniónico débil (<i>Weak Anion Exchange</i>)
WT:	Animal salvaje (<i>Wildtype</i>)
XALOC:	Línea de luz de Cristalografía Macromolecular del sincrotrón ALBA

RESUMEN



1. RESUMEN

El perfeccionamiento de las técnicas biotecnológicas permitió a finales del pasado siglo, pero sobre todo a principios del siglo XXI, ampliar notablemente el arsenal terapéutico de medicamentos biológicos. Dichos productos están indicados, por lo general, en el tratamiento de enfermedades crónicas graves, pero su uso se extiende paulatinamente hacia todo tipo de procesos patológicos. Una particularidad de los productos biológicos, en razón de su origen y de su naturaleza proteica, es su heterogeneidad fisicoquímica. La variabilidad entre lotes de los productos biológicos dista mucho de la consistencia alcanzada en medicamentos tradicionales producidos mediante síntesis química. El control de calidad lote a lote y la comparación de un determinado producto antes y después de cambios en proceso o en composición, requieren de técnicas analíticas que permitan concluir con fiabilidad sobre su grado de igualdad. Dichas técnicas son de particular utilidad en el desarrollo de biosimilares; es decir, de réplicas de medicamentos biológicos que contienen el mismo principio activo, se administran por la misma vía a la misma dosis y en las mismas indicaciones. Omalizumab (Xolair®) es un anticuerpo monoclonal desarrollado como antiasmático, posteriormente aprobado en urticaria y en rinosinusitis. Su elevado rendimiento terapéutico y sus expectativas comerciales convierten en un ejercicio interesante la puesta a punto de técnicas para la comparación de versiones de Xolair®, tanto para el desarrollo de candidatos a biosimilar como en pruebas de calidad o de comparabilidad entre productos análogos.

En la actualidad aún no existen biosimilares de Xolair® comercializados, aunque sí se han referido algunos en I+D. Su indudable interés terapéutico y comercial nos llevó a pensar en la conveniencia de crear un programa preliminar que permitiera anticipar el grado de semejanza de un candidato a biosimilar para omalizumab con el producto de referencia. Además, una herramienta técnica de estas características sería aplicable a otras necesidades. Se estableció la **hipótesis** de que: *“La creación de una batería de pruebas analíticas ad hoc permite anticipar con elevada fiabilidad la comparabilidad entre versiones de omalizumab, y contribuir a objetivos tales como seleccionar candidatos a biosimilar”*.

Con el propósito de verificar dicha hipótesis se planteó el **objetivo** de desarrollar pruebas analíticas específicas para omalizumab. Mediante las técnicas incluidas se comparan atributos críticos tanto fisicoquímicos como funcionales que se espera que, en gran medida, anticipen el grado de equivalencia terapéutica entre versiones. Para cumplir este objetivo se propusieron 3 sub-proyectos:

- La mejor forma de evaluar una técnica analítica es analizar moléculas altamente similares y ver si esta es capaz de discernir entre ellas. Por este motivo, en el **primer sub-proyecto** se planteó obtener moléculas análogas a omalizumab. Se produjeron 2 moléculas análogas: una versión con la misma secuencia aminoacídica y una variante con 3 aminoácidos diferentes al omalizumab de Xolair®. Además, para incrementar las diferencias con el original se expresaron en una línea celular diferente. Una vez disponibles, se usaron para poner a punto técnicas clave en

comparabilidad para atributos fisicoquímicos. Se evaluaron técnicas encaminadas a caracterizar 3 atributos críticos: secuencia primaria, glicosilación y estructura tridimensional. Se demostró la idoneidad de la metodología de secuenciación *de novo* empleada para la identificación de la secuencia primaria. El patrón de glicosilación se estudió mediante una metodología que resultó ser idónea y, que no solo detectó diferencias entre versiones, sino también entre lotes del producto original. Para comparar el plegamiento de la proteína se empleó una tecnología singular; el análisis estructural de cristales proteicos con la luz del sincrotrón. La metodología demostró tener un alto potencial, pero no se pudo concluir respecto a su idoneidad porque no se llevaron a cabo los análisis requeridos para ello.

- En el **segundo sub-proyecto** se desarrollaron métodos para comparar funcionalmente moléculas análogas de omalizumab. Se optimizó una técnica de *Surface Plasmon Resonance* (SPR) que demostró ser idónea en la determinación y comparación de la capacidad de unión a IgE. La actividad biológica se estudió *in vitro* mediante el ensayo de liberación de β -hexosaminidasa en mastocitos LAD2 e *in vivo* mediante el modelo de PCA en ratones. El ensayo celular demostró tener una sensibilidad y precisión alta y, por lo tanto, ser competente para nuestro propósito. Sin embargo, el modelo *in vivo* se descartó al exhibir insuficiente sensibilidad y precisión.
- En un ejercicio de comparabilidad se requiere de técnicas altamente sensibles para desvelar divergencias estructuro-funcionales menores. En el **tercer sub-proyecto** se propuso crear un escenario alternativo en el que diferencias funcionales no reveladas previamente pudieran detectarse. Para ello se evaluó el impacto funcional de versiones/variantes de omalizumab en un marco de co-administración con otros inhibidores mastocitarios (agonistas EP₂). Antes de estudiar el efecto sinérgico se validó la activación de EP₂ como inhibidor mastocitario. Del estudio de co-administración no se pudo concluir la existencia de un efecto sinérgico claro. Esta estrategia resultó ser infructuosa para revelar diferencias.

La ejecución de los sub-proyectos ha permitido proponer un **Programa Predictivo de Biosimilaridad (PPB)** específico para candidatos a biosimilar de Xolair®. Este incluye la evaluación de la estructura primaria, una metodología exhaustiva de caracterización de la glicosilación, y dos técnicas para la evaluación de sus características de unión a IgE (SPR y un ensayo *in vitro* en células LAD2). El PPB está diseñado para ofrecer un diagnóstico preliminar del grado de equivalencia analítica entre el candidato a biosimilar y el producto de referencia.

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten **concluir** que la batería de pruebas desarrolladas anticipan el grado de igualdad entre moléculas con actividad anti-IgE y que, si bien pueden conformar un PPB para la selección de clones productores de candidatos a biosimilar, es implementable además en la comparación entre lotes de un mismo producto, la determinación del impacto de cambios en proceso y otras aplicaciones.

ABSTRACT

By the end of the 20th century, but especially in the early 21st century, the improvement of biotechnology allowed to enlarge the therapeutic armamentarium of biologic medicines. Generally, these products are meant for the treatment of severe chronic diseases, but their use has been gradually widespread to all kinds of diseases. Due to their biological and protein nature, they own innate physicochemical heterogeneity. The variability among batches of biological products is therefore distant from the batch-to-batch consistency reached with the traditional drugs manufactured through chemical synthesis. Both the quality control and the comparability exercise of pre- and post-manufacturing versions of a given biological require analytical techniques that allow concluding reliably on their level of similarity. Also, these comparability assays have served as the base for the development of biosimilars; i.e. replicates of biological medicines that contain the same active ingredient and that are administered mostly through the same route, at the same dose and for the same indications. Omalizumab (Xolair®) is a monoclonal antibody developed as antiasthmatic, subsequently approved in urticaria and rhinosinusitis. Its outstanding therapeutic performance has driven sales increase, but also the off-label uses in many indications. Development of techniques capable of comparing versions of omalizumab, both for biosimilar candidate development and for other purposes, such as clone selection and pre- and post-manufacturing changes comparison would be of substantial value.

There are no biosimilars of Xolair® in the market yet, although some companies do have candidates in their development pipeline. Its undoubted therapeutic and commercial interest led us to propose the creation of a preliminary program that would allow us to anticipate the degree of similarity of a biosimilar candidate for omalizumab with the reference product. Moreover, a tool with those characteristics would cover other needs such as allow for comparability of post-manufacturing versions or quality control. The following **hypothesis** was therefore proposed: *“The creation of a battery of analytical ad hoc assays allow to accurately anticipate with high reliability the level of comparability among versions of omalizumab, and contribute to different objectives as the selection of biosimilar candidates”*.

We set the **objective** of developing specific and sensitive analytical assays to compare critical molecular and functional attributes of omalizumab. To achieve such objective 3 sub-projects were proposed:

- The best way to determine the performance of an analytical assay is by performing head-to-head analyses of highly similar molecules in order to establish its discriminating power. For that reason, in the **first sub-project**, we proposed to develop analogues of omalizumab with different levels of analogy. Two molecules, omalizumab of Xolair® and a new molecule named version, shared an identical aminoacid sequence, and a third one, named variant, had differences versus the original omalizumab in 3 aminoacids. To further ensure certain post-translation dissimilarities, the developed molecules were expressed in a different host cell system. These test compounds were used to tune up key comparability techniques. Three critical

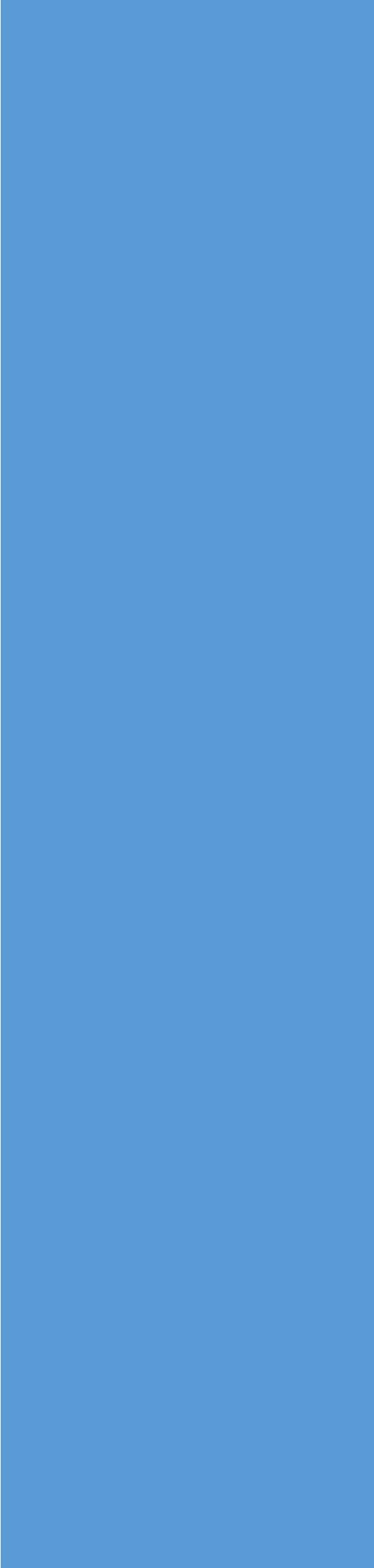
physicochemical attributes were characterised: aminoacid sequence, glycosylation pattern and protein folding. First, the suitability of the *de novo* sequencing used for the identification of the primary sequence was demonstrated. Second, the glycosylation pattern was studied using a methodology that turned out to be ideal and that not only detected differences among versions but also among batches of the original product. Third, a new technology not reported to having been used for biosimilarity demonstration, synchrotron light crystallography, was developed to compare protein folding. The methodology proved to have a high potential, but it was not possible to conclude about its comparative capacity.

- In the **second sub-project**, some methods were developed to functionally compare versions of omalizumab. A Surface Plasmon Resonance (SPR) technique was optimized and proved to be the most suitable for the determination and comparison of the binding capacity to IgE. Biological activity was studied *in vitro* by the β -hexosaminidase release assay using LAD2 MC and *in vivo* using a PCA transgenic mice model. The cell assay demonstrated to have a high sensitivity and precision, and therefore to be competent for our purpose. However, the *in vivo* model was discarded because it displayed an insufficient sensitivity.
- In order to demonstrate biosimilarity it is mandatory to use highly sensitive assays that reveal slight dissimilarities. In the **third sub-project**, we proposed to set up an alternative approach possibly capable of detecting functional differences that could have remained undetected by means of the above studies. With this purpose, the functional impact of the omalizumab's versions and variants was evaluated in a co-administration approach with another novel MC inhibitor (EP₂ agonists). Previous to studying the synergistic effect, we validated that the pharmacological modulation of EP₂ allowed the control of the MC activity, and in turn, reduced the allergic response *in vivo*. The co-administration study did not reveal a synergistic effect, and therefore, the proposed strategy was not valid.

We have conceived a so-called **Biosimilarity Predictive Program (PPB)** for biosimilar candidates of Xolair®. The PPB includes the assessment of the primary structure, a stringent methodology to characterize the glycosylation pattern, and two functional assays (SPR and an *in vitro* assay using LAD2 cells). The PPB was designed to provide a preliminary diagnosis of the level of analytical equivalence between the biosimilar candidate and the reference product.

The results allowed us to **conclude** that the set of assays may serve to anticipate the level of analytical similarity and therefore to anticipate a potential therapeutic equivalence between anti-IgE molecules. Such set of techniques may be applied, not only as a PPB, but also it could be even implemented for other applications: batches comparison and determination of the impact of manufacturing or composition changes, among others.

**Comparabilidad
analítica: clave
en la anticipación
de equivalencia
terapéutica**



2. INTRODUCCIÓN: Comparabilidad Analítica: clave en la anticipación de equivalencia terapéutica

2.1. Medicamentos biológicos: variabilidad aceptable

2.1.1. Medicamentos biológicos originales: variabilidad entre lotes

Un medicamento biológico (o biomedicamento) es un medicamento cuyo principio activo lo produce un organismo vivo. Cuando la fuente biológica debe ser alterada genéticamente para generar el principio activo, al medicamento biológico se le denomina biotecnológico. Por ejemplo, el Factor VIII de la coagulación humano que se utiliza en el tratamiento de pacientes hemofílicos puede tanto extraerse de plasma humano (medicamento biológico no biotecnológico) como ser producido por células no humanas modificadas genéticamente (medicamento biológico biotecnológico). Hoy en día, la mayoría de los medicamentos biotecnológicos son proteínas terapéuticas recombinantes que se producen en cultivos de células eucariotas o procariotas.

"Las proteínas terapéuticas recombinantes están sujetas a una variabilidad fisicoquímica y, a veces, funcional debido a su naturaleza proteica y su producción biológica"

De entre los medicamentos biotecnológicos cabe destacar los anticuerpos monoclonales (mAb). Estos han revolucionado en las últimas décadas el campo de la medicina gracias a su capacidad de unirse selectivamente a su diana (1). Su origen biológico y su naturaleza proteica les confiere una variabilidad estructural intrínseca muy superior a la de los productos de síntesis química (**Figura 1**). Variabilidad que, particularmente en medicamentos biológicos complejos como los mAb, puede también afectar a atributos funcionales; es decir, a su actividad biológica (2). Cierta variabilidad estructural se detecta intralote (microheterogeneidad), pero es especialmente relevante la variabilidad entre lotes (3).

La principal fuente de variabilidad en los productos biotecnológicos son las modificaciones post-traduccionales (PTMs). Glicosilación, fosforilación, metilación y acetilación, son algunas de esas PTMs que dan lugar a distintas isoformas para una determinada molécula (4). Es muy frecuente que diferencias menores detectables analíticamente no tengan impacto clínico, es decir, que no afecten a su comportamiento terapéutico. Por lo tanto, existe un grado de variabilidad aceptable inherente a todo producto biológico. Sin embargo, es importante mantener un estrecho control durante la manufactura del medicamento y sobre el producto terminado para evitar que determinadas variaciones incidan involuntariamente en su equilibrio beneficio/riesgo.

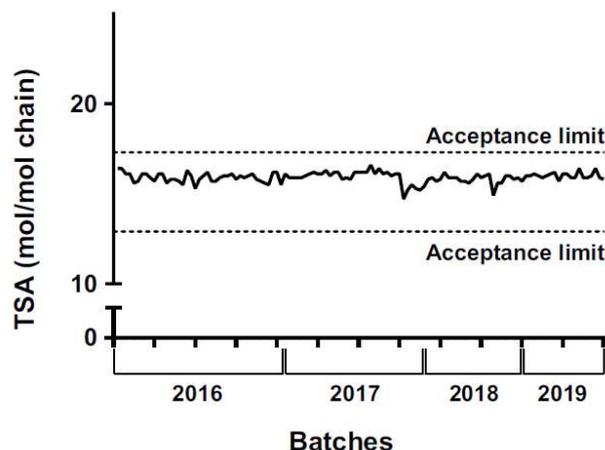


Figura 1. Ejemplo de variabilidad intrínseca entre lotes de un fármaco biológico (principio activo etanercept) en el contenido total de ácidos siálicos (TSA). Un mismo proceso de fabricación altamente controlado puede originar variabilidad molecular. Fuente: H. C. Ebbers et al., “Batch-to-Batch Consistency of SB4 and SB2, Etanercept and Infliximab Biosimilars”, *BioDrugs*, vol. 34, no. 2, pp. 225–233, 2020 (5).

2.1.2. Variabilidad: potencial impacto clínico

La variabilidad inter-lote suele mantenerse en el rango especificado si se preservan las condiciones de fabricación y composición del producto. Sin embargo, una modificación del proceso productivo y/o de los excipientes (u otros aspectos de su composición) puede magnificar esa variabilidad debido a la sensibilidad de las células productoras y de las proteínas a las condiciones ambientales (**Figura 2**). Los laboratorios productores de medicamentos biológicos, con la supervisión de las agencias, velan por que cambios en el proceso productivo no induzcan alteraciones no deseadas en la estructura molecular, que a su vez puedan incidir en la eficacia o la seguridad.

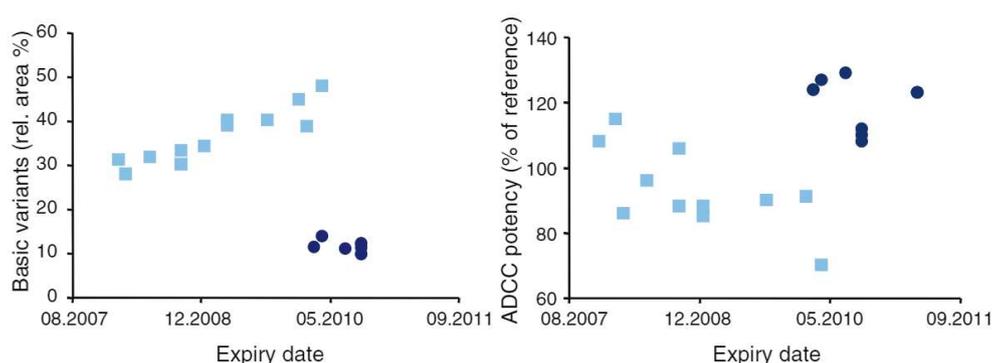


Figura 2. Desviación de ciertos atributos fisicoquímicos al modificarse las condiciones de fabricación del medicamento biotecnológico Rituxan®/Mabthera®. En azul claro se muestran los resultados de los lotes pre-modificación. En azul oscuro los resultados post-modificación. Fuente: M. Schiestl et al., “Acceptable changes in quality attributes of glycosylated biopharmaceuticals”, *Nature Biotechnology*, vol. 29, no. 4, pp. 310–312, 2011 (6).

La fabricación de un producto biológico es un proceso complejo y único. Este puede ser modificado por distintos motivos: optimización del rendimiento productivo, escalado en respuesta a una mayor demanda, implementación de tecnologías de vanguardia, requerimientos regulatorios, cambios en la formulación para obtener una mejora terapéutica o de manejo, etc. La intención de dichas modificaciones es generar siempre un beneficio (7). Los cambios deben realizarse de forma controlada para evitar un impacto no deseado. Aunque haya sido infrecuente, se han descrito casos de modificaciones en productos biológicos originales que han provocado alteraciones en su perfil terapéutico. Un ejemplo paradigmático es la inmunogenicidad de un medicamento original cuyo principio activo es la EPO α (8). En 1999 aparecieron efectos adversos letales frente a la EPO. Fueron consecuencia de un cambio en un excipiente que incrementó notablemente la inmunogenicidad del producto por una reacción inesperada con parte del material de la jeringa.

"Cualquier modificación en el proceso de fabricación puede repercutir en la eficacia y la seguridad del producto final"

El caso de la EPO redobló los esfuerzos por ofrecer una mayor garantía de que los lotes de cualquier medicamento biológico comercializado no sufriesen alteraciones estructurales de potencial impacto clínico como consecuencia de modificaciones en el producto o proceso. Las agencias reguladoras de referencia desarrollaron normativas exigentes (marco regulatorio más garantista), que la industria tuvo que implementar (9).

2.1.3. Variabilidad aceptada: control regulatorio garantista

Las agencias reguladoras establecen qué tipo de cambios en el proceso deben tenerse en consideración (denominados *major changes* en inglés) por sus potenciales consecuencias clínicas. Si bien todos los cambios tienen que ser notificados y aprobados por las autoridades, en el caso de una modificación considerable, esa aprobación requiere, por lo general, de estudios en los que se comparan las versiones pre- y post-cambio del producto. Un cambio únicamente será aceptado si se demuestra que el riesgo de impacto clínico no deseado es insignificante. Los estudios más sensibles en la detección de diferencias menores, incluso irrelevante clínicamente, son los estudios analíticos estructurales y funcionales (10). En muchas ocasiones basta con los estudios analíticos comparativos para demostrar que no se han producido modificaciones estructurales, o que, si las hay, es muy improbable que se substancien en alteraciones del equilibrio beneficio/riesgo. En ciertos casos las observaciones analíticas aconsejan complementar los estudios de laboratorio con ensayos clínicos comparativos confirmatorios.

"Realizar una comparación analítica es la manera óptima de anticipar las posibles consecuencias de un cambio en la mayoría de los casos"

Un estudio reciente llevado a cabo en la Unión Europea (UE) demostró la exigencia del marco regulatorio Europeo. Se analizaron datos de más de 400 cambios informados por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) en 29 mAb originales comercializados. De ellos únicamente el 5% se valoraron como cambios de consideración o “*major changes*” (11). Ninguno provocó una disminución de la seguridad o de la eficacia del producto una vez autorizada la versión post-cambio. Además, desde que se aprobó el primer biológico hace 35 años, más de 250 biomedicamentos han sido comercializados tanto en Europa como en EEUU para su uso en humanos, y solo en 3 casos el cambio del proceso de manufactura desencadenó una alteración no deseada de la seguridad o eficacia (12). El riesgo de presentar variaciones con consecuencias clínicas se acrecienta en biomedicamentos de mayor peso molecular y mayor complejidad (e.g. glicoproteínas). Por lo tanto, los mAb son particularmente sensibles a cambios en las condiciones ambientales y conviene aplicar exigentes medidas de control de calidad. Omalizumab es un anticuerpo monoclonal utilizado en asma, urticaria y rinosinusitis crónica bien caracterizado y sujeto a dichos controles.

2.2. Omalizumab: caracterización molecular y funcional

2.2.1. Omalizumab: actividad y efecto terapéutico

Omalizumab, el principio activo del producto farmacéutico comercializado como Xolair®, fue el primer anticuerpo monoclonal autorizado para el tratamiento del asma alérgica grave. Inicialmente se aprobó para el tratamiento de pacientes, adultos y niños mayores de 6 años con asma alérgica moderada y severa persistente. Posteriormente se autorizó para tratar la urticaria idiopática crónica en adultos y adolescentes (a partir de los 12 años) (13) y muy recientemente se ha autorizado para la rinosinusitis en adultos (14). Xolair® ha exhibido unos resultados clínicos notables, superando las expectativas y su uso fuera de indicación apunta a que podría extenderse a nuevas enfermedades. (15).

"Omalizumab (Xolair®), un mAb con elevadas garantías"

Omalizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-inmunoglobulina E (IgE) humana que se expresa mediante tecnología del ADN recombinante en células CHO. Se une selectivamente a la fracción constante (Fc) de la IgE humana libre, e impide que esta interactúe con los receptores de alta afinidad (FcεRI) que se expresan fundamentalmente en la membrana de los mastocitos (MC) y de los basófilos. De este modo omalizumab reduce la concentración de IgE libre y previene en mayor o menor medida su sensibilización. Por lo tanto, en presencia de un antígeno los MC no se activan y se limita la liberación de mediadores inflamatorios y moduladores que contribuyen a la respuesta alérgica (**Figura 3**).

Omalizumab tiene un perfil de seguridad alto. En comparación con otros mAb produce relativamente pocos efectos adversos y es poco inmunogénico. Los efectos adversos más frecuentes son las reacciones locales en el sitio de administración (<3% de los pacientes tratados), astenia, náuseas, artralgia y dolor

de cabeza. Solamente un 0.2% de los pacientes tratados con este medicamento han desarrollado casos de anafilaxis (16). Como se ha mencionado, se trata de un anticuerpo de utilización creciente, de cuyas características moleculares o fisicoquímicas se han revelado pocos datos. Algunos estudios ya antiguos nos dan pistas sobre cuáles son algunos de los atributos moleculares esenciales que pudieran afectar a su comportamiento terapéutico.

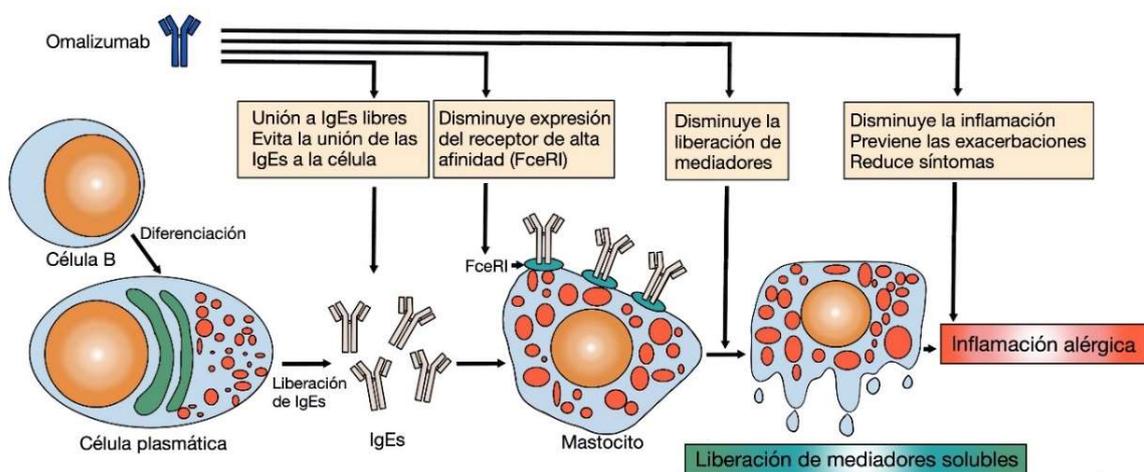


Figura 3. Mecanismo de acción de omalizumab en el asma alérgico.

2.2.2. Atributos críticos de omalizumab

No todos los atributos fisicoquímicos de un medicamento biotecnológico tienen el mismo impacto en su eficacia o en su seguridad. Hay atributos clave, algunos de ellos específicos para cada molécula, cuya variabilidad debe mantenerse en un estrecho rango; los denominados Atributos Críticos de Calidad o CQAs. Por definición, un CQA es una propiedad o característica física, química o biológica que debe mantenerse en un rango preestablecido para maximizar las garantías de calidad del producto (17). Las modificaciones post-traduccionales son el principal factor de variabilidad.

"Omalizumab es una IgG1 con características y atributos propios que definen su efecto terapéutico"

- **Atributos estructurales**

El patrón de glicosilación suele ser un atributo crítico para toda glicoproteína terapéutica. Ocasionalmente se ha relacionado con el grado de inmunogenicidad y depende en gran medida del sistema de expresión. Xolair® se produce en células CHO (células derivadas de ovario de hámster chino) (18), un sistema de expresión de mamífero ampliamente usado en la producción de biomedicamentos

que tiene una baja probabilidad de generar glicofomas inesperadas (19,20). Omalizumab es un anticuerpo monoclonal del isotipo IgG1, por lo tanto, presenta un único sitio de glicosilación (*N*-glicosilación¹) en la región constante de la cadena pesada (posición Asn301) (21). Además, como omalizumab presumiblemente actúa únicamente vía Fab (no tiene función Fc), una modificación en el patrón de glicosilación tiene una menor probabilidad de generar consecuencias en su actividad biológica. El hecho de ser producido en un sistema de expresión conocido y bien caracterizado, de no tener actividad Fc y de que las agencias reguladoras entienden que siempre existe cierta variabilidad en el patrón de glicosilación (22) le concede a Xolair® una alta seguridad. Sin embargo, como cualquier otro biomedicamento, debe estar sujeto a un control exhaustivo. Cualquier cambio en las condiciones de producción podría ocasionar una variación inesperada en la glicosilación generando una glicofoma con capacidad inmunogénica o incluso, aunque de forma poco probable, alterase sus características de unión a la IgE.

El plegamiento de la proteína (estructuras secundaria y terciaria) es otro aspecto crítico. Un mal empaquetamiento de la proteína puede generar una isoforma inactiva o con tendencia a agregarse (23). El tipo y número de agregados podría influir en la inmunogenicidad y en otras características funcionales como, por ejemplo, el perfil farmacocinético (24). Además de la estructura global, estudiar cómo las diferentes cadenas de la IgG se pliegan y se conectan entre sí tiene relevancia. Entre las 4 cadenas de omalizumab se forman 16 enlaces di-sulfuro (4 inter-cadenas y 12 intra-cadenas). Cualquier emparejamiento inadecuado mediante dichos enlaces, o desemparejamiento, puede reducir la capacidad de unión a la diana (25). Específicamente, en el caso de omalizumab, se ha visto que un desemparejamiento del enlace entre las cisteínas (Cys22-Cys96) reduce significativamente la afinidad y cinética de unión a IgE (26).

Otros atributos críticos destacables en el caso de omalizumab, aunque escasamente descritos, son: la isomerización del aspartato 32 (Asp32) y la ciclización de los residuos de glutamina. La isomerización de los aspartatos es una modificación post-traduccional degenerativa de los anticuerpos. En especial para omalizumab, la isomerización del Asp32 de la región CDR-H1² puede inactivar su función Fab (27). La ciclización de las glutaminas también es un proceso natural e irreversible para todas las proteínas con glutaminas en posición *N*-terminal. En omalizumab, la ciclización cambia la carga neta de la proteína hacia una forma más ácida y le reduce su masa proteica pudiendo afectar a su estabilidad (28).

Los cambios estructurales (o fisicoquímicos) pueden tener un impacto funcional si alcanzan una determinada magnitud, o afectan a una determinada región de la molécula. Por eso, la caracterización

¹**N-glicosilación:** Adición de una cadena de oligosacáridos de complejidad variable a un residuo de asparagina de una proteína.

²**CDR-H1:** Región determinante de complementariedad 1 de la cadena pesada. Secuencia corta de aminoácidos del dominio variable del anticuerpo que reconoce el antígeno.

funcional es esencial en los controles de la consistencia entre lotes y en la comparación de versiones de un determinado mAb.

- **Atributos funcionales**

La actividad biológica es clave en la evaluación analítica. Permite con garantías predecir el comportamiento terapéutico del fármaco en el organismo, además de desvelar posibles alteraciones fisicoquímicas de mayor relevancia a la anticipada. Su caracterización es, por lo tanto, crucial en un ejercicio de control de calidad de lotes, pero sobre todo, en la comparación de moléculas cuya eficacia se espera que sea equivalente. Cualquier diferencia estructural inesperada identificada debe investigarse y determinarse su posible impacto funcional y, en consecuencia, su potencial impacto terapéutico. Pero también esa comparación funcional debe realizarse en ausencia aparente de alteraciones fisicoquímicas. En el caso de un mAb conviene evaluar las características de unión a su diana (mecanismo de acción) y las consecuencias derivadas de esta (efecto). Por lo tanto, es clave entender la cinética de unión y la afinidad de omalizumab por IgE y determinar tanto *in vitro* como *in vivo*, si es posible, las consecuencias en la actividad mastocitaria.

Omalizumab no parece ejercer su efecto vía Fc, en consecuencia, los parámetros atribuibles a la función de esta región (ADCC, CDC o unión al complemento) no se consideran críticos. Es altamente improbable que cambios post-traduccionales alteren la función de esta región, y no parece que su evaluación rutinaria esté fundamentada.

2.2.3. Variabilidad aceptada del medicamento original Xolair® (omalizumab)

Xolair® fue sometido a un cambio considerable tras años de comercialización; se modificó su forma farmacéutica. Inicialmente el producto se lanzó como polvo liofilizado en un vial mono-dosis de 150mg. Con el tiempo, se produjo la dosis de 75mg. Sin embargo, para mejorar la consistencia de la dosificación, el laboratorio titular de la comercialización decidió producir una formulación líquida en una nueva presentación, una jeringa precargada *ready-to-use* (29). Esta nueva formulación redujo la viscosidad, el volumen de inyección y el tiempo de preparación manteniendo la misma posología, ruta de administración e indicaciones que el producto liofilizado. El cambio se tradujo en una mejora significativa en el proceso de preparación y administración.

Sin embargo, había ciertos riesgos a considerar. El uso de jeringuillas precargadas se ha asociado con la pérdida de esterilidad, disminución de la actividad, desnaturalización de la proteína, aumento de la agregación e inmunogenicidad (30,31). Además, tanto la FDA como la EMA, consideran cualquier modificación en el envase o en el cierre, como un cambio de consideración y, por lo tanto, de alto riesgo. De la misma forma, el cambio de formulación también es considerado como una modificación de potencial impacto clínico (32). La nueva presentación de Xolair® contiene *L*-Arginina como excipiente, una sustancia ampliamente utilizada comercialmente que reduce la viscosidad (33) pero que también

ocasionalmente se ha asociado a la formación de agregados (34), pudiendo alterar la inmunogenicidad del medicamento (35). En efecto, con otros medicamentos existe evidencia que demostraba que un cambio en los excipientes y en el sistema de envasado puede tener impacto en el equilibrio beneficio/riesgo de los pacientes. Es el caso anteriormente mencionado de la eritropoyetina EPREX® (9). Teniendo en cuenta los riesgos asociados a las modificaciones implementadas, se llevó a cabo un ejercicio de comparabilidad analítica y clínica entre el producto pre-cambio (liofilizado) y la nueva versión (líquida) en jeringa precargada.

Tras una extensa comparación entre la formulación líquida y la formulación liofilizada se observó que analíticamente no había diferencias. No obstante, durante la comparación se identificó un nuevo fragmento de bajo peso molecular, una impureza de Fab, en jeringas cercanas al fin de su vida útil que no se había detectado en viales liofilizados. Aunque más tarde descubrieron que ese producto truncado se encontraba también en material liofilizado, estas diferencias transitorias crearon incertidumbre sobre cómo podían afectar al paciente. Para demostrar que las variaciones no alteraban el perfil beneficio/riesgo se realizó un estudio clínico en el que se comparaban ambas formulaciones (36). El resultado del estudio demostró bioequivalencia; ambas formulaciones mostraron un perfil de PK, PD y seguridad (incluyendo inmunogenicidad) similar (29). La EMA, y más tarde la FDA, aprobaron la comercialización de la jeringa precargada de Xolair®.

Si bien cualquier cambio puede dar lugar a modificaciones estructurales y/o funcionales que pueden alterar el comportamiento terapéutico, este caso demuestra que cierta variabilidad es aceptable en productos con omalizumab. Las agencias reguladoras aprueban la modificación de un producto siempre y cuando haya elevadas garantías de que el perfil beneficio/riesgo no se verá alterado. De esta forma se mantiene la garantía de la calidad del producto final.

2.3. Versiones con omalizumab: relevancia de la comparabilidad analítica

2.3.1. Biosimilares: concepto

Si bien los medicamentos biotecnológicos forman ya parte del arsenal terapéutico en nuestro sistema sanitario, su elevado precio limita necesariamente su uso y los relega en ocasiones a tratamientos de segunda elección. El déficit acumulado del sistema sanitario obliga a incorporar la eficiencia como una variable esencial. En la última década varias patentes de los primeros biomedicamentos comercializados han expirado (37), lo cual permitió que se desarrollasen réplicas cuya exigencia regulatoria en estudios, si bien es elevada, es menor que la de un producto original. Por ello requieren de una inversión menor y, por lo tanto, se puedan comercializar a un precio de partida inferior. Se les llama “medicamentos biológicos similares” o “biosimilares” (38–40).

Por ende, un biosimilar es un medicamento biotecnológico que se desarrolla con el objetivo de crear una réplica de un medicamento biológico original o de referencia (41). El biosimilar contiene en esencia el mismo principio activo que el producto original de referencia, se administra por la misma vía, a la misma dosis y para las mismas indicaciones. Por supuesto mantiene la misma calidad, eficacia y seguridad. Los biosimilares pueden lanzarse al mercado legalmente una vez que el periodo de protección comercial del producto de referencia haya expirado.

"Los biosimilares contienen en esencia el mismo principio activo que el medicamento original"

La presencia de biosimilares en el mercado genera una competencia deseable para el sistema sanitario y, por lo tanto, para los pacientes. La reducción del precio de la terapia biológica como consecuencia de la entrada de los biosimilares, facilita el acceso a tratamientos biológicos a un mayor número de pacientes y contribuye a la sostenibilidad del sistema (42). Datos publicados por el Hospital Universitario de La Princesa de Madrid indicaron que tras dos años de incorporar un fármaco biosimilar de Remicade (infliximab) a su formulario, el coste de los tratamientos de pacientes con la enfermedad de Crohn se redujo un 61% (43). El descuento en el precio de las terapias biológicas como resultado de la entrada de biosimilares en el mercado libera recursos que pueden destinarse a: adquisición de equipamientos, mejora de servicios, incorporación de medicamentos innovadores, etc. Un estudio prospectivo estimó que el uso de biosimilares permitiría redistribuir al Sistema Sanitario Español (SNS) aproximadamente 2.000 millones de euros entre 2017 y 2020 (44).

- **Marco regulatorio en el desarrollo de biosimilares**

Tal y como se ha dicho, de la misma manera que lotes de un mismo medicamento pueden diferir insignificadamente, su propia naturaleza biológica y condición proteica impide que el medicamento biosimilar sea idéntico al original (45). Para asegurar que las diferencias entre biosimilar y original no se traducen en variaciones clínicas, la EMA, pionera en establecer un marco regulatorio, solicita que para su evaluación se lleve a cabo un exhaustivo ejercicio de comparabilidad. De las lecciones aprendidas con la comparación entre versiones de productos biológicos originales, la EMA otorgó un peso específico considerable a la comparación analítica. Los análisis comparativos estructurales y funcionales deben incluir las metodologías más sensibles en la detección de diferencias, aunque estas se presuman indetectables clínicamente. En el ejercicio se deben comparar múltiples atributos estructurales y funcionales empleando tecnologías de vanguardia aplicadas con el objetivo de encontrar diferencias, si las hay. Si analíticamente se determina que dos moléculas exhiben un alto grado de igualdad, o práctico solapamiento, se puede anticipar con fiabilidad que el comportamiento clínico será equiparable. El ejercicio se complementa con estudios de bioequivalencia, actualmente la prueba clínica más sensible en hacer aflorar diferencias clínicas si las hubiera. Además, hoy por hoy en la mayoría de los casos la EMA solicita estudios confirmatorios en pacientes de eficacia y seguridad. La aprobación o no de un candidato

a biosimilar resulta de la evaluación por parte de las agencias de la totalidad de la evidencia. Si se demuestra el grado de igualdad exigible, el biosimilar es aprobado. En este caso, se puede concluir que el equilibrio beneficio/riesgo es equivalente al del producto original y que el principio activo de ambos medicamentos es en esencia el mismo.

La somatropina de Sandoz (Omnitrope®) fue en 2006 el primer biosimilar aprobado para su comercialización en Europa (46). En EEUU, la aprobación del primer biosimilar tuvo que esperar 9 años. Este fue Zarxio® (filgrastim-sndz), otro medicamento de Sandoz. Desde entonces, muchos biosimilares han sido autorizados en la UE convirtiéndose en el mercado más maduro y más experimentado en ciencia, regulación y utilización de biosimilares.

2.3.2. Biosimilares de Xolair®

Xolair® fue aprobado por la FDA el 20 de junio de 2003 (29) y por la EMA el 25 de octubre de 2005 (16). Su patente expiró el 20 de junio de 2017 en EEUU y en la UE en agosto del 2017 (47). Pese a ello, hasta el momento de redactar esta tesis, ningún biosimilar de omalizumab se ha lanzado y ni siquiera se tiene constancia de que haya sido remitido a la EMA para su evaluación (septiembre de 2021). Pocos laboratorios lo incluyen en su cartera de productos en desarrollo (**Tabla 1**).

Tabla 1. Candidatos a biosimilar de omalizumab en desarrollo (Tabla actualizada en septiembre de 2021).

Nombre de la compañía	País	Nombre del producto	Estado de desarrollo
BiosanaPharma	Holanda	BP001 BOX001	Fin estudio fase I (48,49) Estudio fase I (50)
Celltrion Healthcare	Corea del Sur	CT-P39	Estudios fase III (51)
Fountain Biopharma	Taiwan	FB317	Estudios clínicos fase I (52)
Glenmark Pharmaceuticals	India	GBR 310	Fin estudios fase I (53) Iniciando estudios fase 3
Liomont	México	LT01	Fase pre-clínica
Sorrento Therapeutics/MabTech	EEUU/China	STI-004	Estudio combinado fase 2-3 (En China) (54)

Según Novartis, durante 2020 las ventas de Xolair® alcanzaron los 1250 millones de dólares (55). Aunque la facturación dista mucho de las de los productos estrella como adalimumab, la facturación de Xolair® es considerable y, además, al alza. Sorprende que no exista ningún biosimilar próximo al mercado, pero se anticipa interés por parte del sector. Más allá de los datos de mercado, parece claro que el beneficio para los pacientes sería notable.

2.3.3. Analítica: clave en la comparabilidad de versiones con omalizumab

En el desarrollo de un biosimilar de Xolair®, como en el de cualquier producto biológico, es fundamental la comparación exhaustiva de los atributos estructurales y funcionales mediante técnicas analíticas validadas como parte del módulo de calidad o CMC (**Figura 4**). Demostrar práctico solapamiento estructural y funcional, puede tener un notable impacto en los estudios clínicos requeridos en el ulterior desarrollo. En especial en la necesidad de ensayos clínicos en pacientes (56–58). Por eso el conocimiento y estudio de los atributos fisicoquímicos y funcionales críticos y su estudio comparado entre lotes o versiones, permitirá diseñar un programa clínico ajustado al objetivo que se persiga.

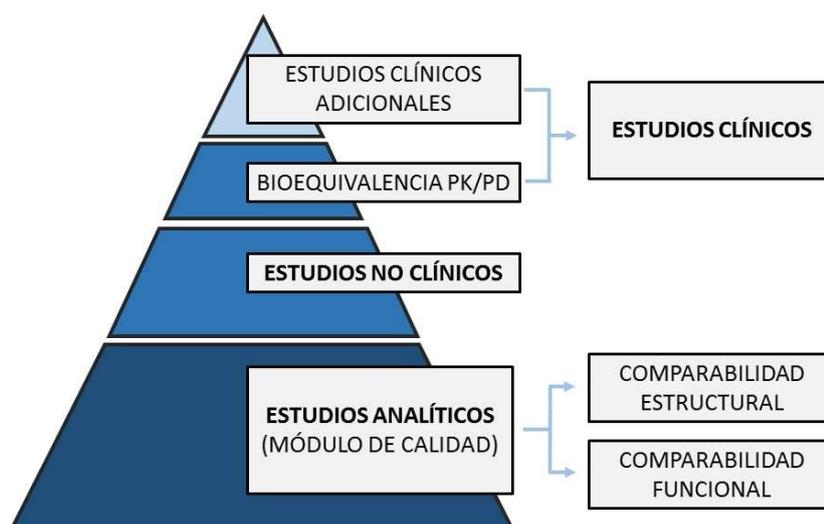


Figura 4. Pasos en la demostración de biosimilaridad. PD (Estudios farmacodinámicos); PK (Estudios farmacocinéticos).

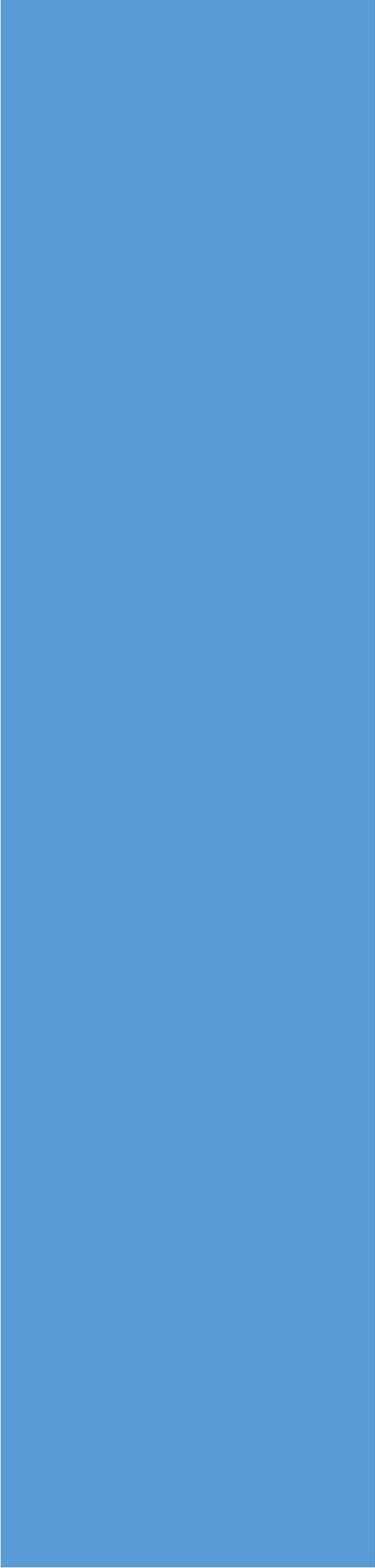
En esta tesis se planteó diseñar un programa analítico abreviado para la comparación de versiones de medicamentos cuyo principio activo fuese dirigido a neutralizar la IgE humana, muy en especial a versiones de productos con omalizumab. Un programa de estas características debe de permitir anticipar con cierto grado de confianza si un posterior estudio analítico más extenso reflejará esencial igualdad o no entre los principios activos comparados. La probabilidad de que el estudio más extenso coincida con el diagnóstico previo del programa abreviado dependerá de la selección de las pruebas analíticas. El programa puede resultar útil en la comparación de lotes, la preevaluación de un cambio en proceso, la selección de clones, pero sobre todo, en la anticipación esperable del grado de igualdad de uno o varios candidatos a biosimilar con el producto original de referencia Xolair®. Por eso el nombre dado a esta batería abreviada de pruebas es Programa Predictivo de Biosimilaridad o PPB. El programa debe ofrecer un diagnóstico rápido y certero que anticipe si conviene o no continuar con el desarrollo y extenderlo. Se debe realizar caso por caso seleccionando atributos analíticos clave del principio activo. Un programa

de estas características puede resultar de gran valor a las empresas productoras y/o desarrolladoras de biosimilares optimizando recursos y tiempo.

Cada molécula requiere de unos análisis específicos. Para optimizar el diseño debe conocerse a fondo la estructura y la actividad de la proteína terapéutica original. El objetivo de esta tesis es proporcionar bajo el nombre de PPB un conjunto de técnicas analíticas sensibles y específicas que permitan analizar los principales CQAs estructurales y funcionales de forma rápida y eficaz y, de este modo, anticipar con fiabilidad la comparabilidad entre versiones de omalizumab.

ES

HIPÓTESIS & OBJETIVOS



3. HIPÓTESIS & OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

De acuerdo con los antecedentes expuestos se formula la siguiente hipótesis:

“La creación de una batería de pruebas analíticas *ad hoc* permite anticipar con elevada fiabilidad la comparabilidad entre versiones de omalizumab, y contribuir a objetivos tales como seleccionar candidatos a biosimilar”

3.2. Objetivos

El **Objetivo** del proyecto es **desarrollar una batería de pruebas analíticas específicas y sensibles de atributos fisicoquímicos y funcionales críticos para la caracterización y comparación de versiones de omalizumab, el principio activo del producto Xolair®, que anticipe su potencial grado de comparabilidad analítica y en última instancia de equivalencia terapéutica.**

Los **Objetivos Específicos** son:

3.2.1. Objetivo 1: Obtener moléculas análogas a omalizumab y utilizarlas en la puesta a punto de estudios clave en la comparabilidad fisicoquímica.

a) Sub-objetivo 1.1:

Producir moléculas análogas (versiones/variantes) del anticuerpo monoclonal omalizumab (Xolair®) y determinar su secuencia aminoacídica.

b) Sub-objetivo 1.2:

Evaluar el patrón de glicosilación de omalizumab de Xolair® y compararlo con el de las versiones/variantes.

c) Sub-objetivo 1.3:

Determinar la aplicabilidad de la tecnología de radiación del sincrotrón al análisis nanoestructural de versiones/variantes de omalizumab.

3.2.2. Objetivo 2: Desarrollar una metodología para comparar la actividad biológica de versiones/variantes de omalizumab.

a) Sub-objetivo 2.1:

Poner a punto la técnica *Surface Plasmon Resonance* (SPR) para determinar la capacidad de unión omalizumab-IgE humana en distintas versiones y evaluar su capacidad discriminatoria.

b) Subobjetivo 2.2:

Comparar la actividad biológica *in vitro* de versiones/variantes de omalizumab mediante el ensayo de liberación de β -hexosaminidasa de mastocitos.

c) Subobjetivo 2.3:

Comparar la actividad biológica de versiones/variantes de omalizumab *in vivo* mediante un modelo de anafilaxia (PCA) en ratón transgénico.

3.2.3. Objetivo 3: Evaluar el posible sinergismo de potenciación entre versiones/variante de omalizumab y agonismo de EP₂.

a) Subobjetivo 3.1:

Validar el agonismo EP₂ como estrategia de inhibición mastocitaria.

b) Subobjetivo 3.2:

Estudiar la sinergia entre agonismo EP₂ y neutralización de la IgE (omalizumab): comparación de versiones/variantes de omalizumab.

Resumen del abordaje experimental

LA
SUB-PROYECTOS



4. SUB-PROYECTOS

Resumen del abordaje experimental

En este apartado se resume la conexión conceptual y metodológica entre los tres sub-proyectos que conforman esta tesis doctoral, y que se corresponden con cada uno de los Objetivos Específicos. Cada sub-proyecto se explica mediante introducción, material y métodos, resultados y discusión y conclusiones específicas.

En el **Sub-proyecto 1** se generaron dos moléculas basadas en la estructura primaria de omalizumab de acuerdo con la patente de Xolair®. Se obtuvo una versión idéntica en estructura primaria, y una variante con 3 aminoácidos modificados. Se confirmó la secuencia primaria, y se comparó el patrón de glicosilación mediante un abordaje experimental muy extenso que permitió además caracterizar los glicanos del medicamento original. Con el fin de contribuir a una caracterización estructural de mayor resolución de las versiones y la variante de omalizumab, se inició la puesta a punto del análisis nanoestructural de cristales mediante la tecnología de radiación bajo luz de sincrotrón. Si bien el objetivo inicial era comparar nanomolecularmente las versiones, finalmente se alcanzó el hito de optimizar las condiciones de cristalización para un futuro análisis.

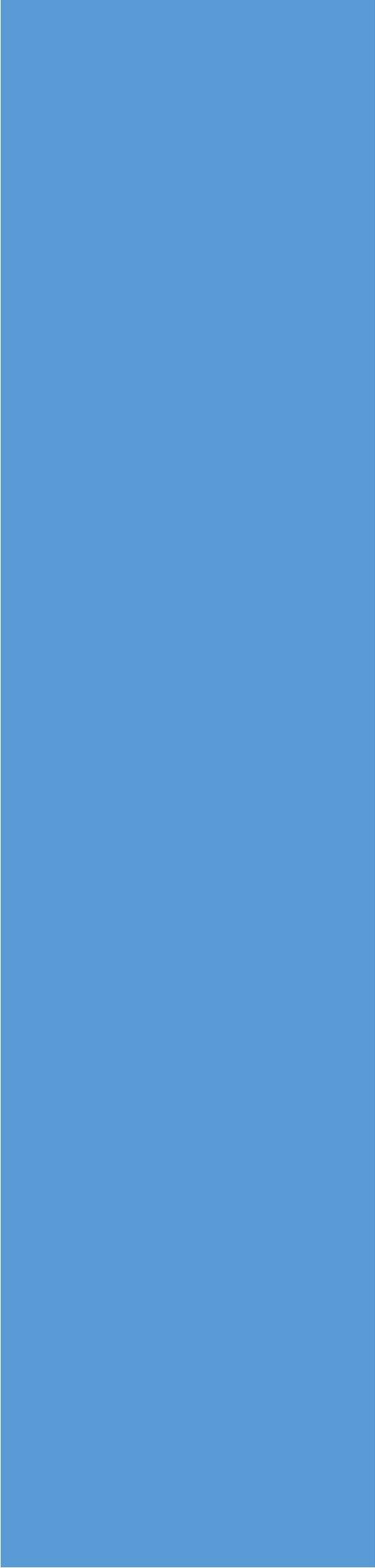
Una vez desarrolladas las técnicas para la evaluación de los atributos estructurales críticos, en el **Sub-proyecto 2** se desarrollaron técnicas para el análisis funcional de omalizumab. Mediante *Surface Plasmon Resonance* (SPR) se estudió la capacidad de unión a IgE humana de las versiones/variantes de omalizumab. Luego, se evaluó *in vitro* la capacidad de los compuestos de prevenir la actividad mastocitaria. Finalmente se evaluó la actividad biológica *in vivo* en un modelo de anafilaxia cutánea pasiva (PCA) en animales transgénicos que expresan el receptor humano de la IgE. El análisis de la batería de pruebas funcionales permitiría determinar su nivel de sensibilidad teniendo en cuenta las diferencias estructurales entre las moléculas en estudio.

Con el objetivo de profundizar en el posible impacto funcional de las versiones/variantes de omalizumab, se planteó la conveniencia de evaluar la actividad anti-IgE de omalizumab combinada con agonismo EP₂ (**Sub-proyecto 3**). Se validó el rol del receptor EP₂ como diana para el bloqueo mastocitario (*in vitro* e *in vivo* mediante un modelo transgénico innovador) y se combinó omalizumab con agonistas EP₂ para determinar si el posible sinergismo en la capacidad inhibitoria permite amplificar las diferencias funcionales entre versiones.

Finalmente, en la **Discusión General** se ha teorizado sobre la idoneidad de las técnicas desarrolladas en la conformación de un programa que permitiera anticipar diferencias de potencial relevancia clínica en la comparación de candidato a biosimilar y original, y su aplicabilidad a otros escenarios.

**Obtención de
versiones/variante
de omalizumab y
puesta a punto de
estudios clave para
la comparabilidad
físicoquímica
(Objetivo 1)**

4



4.1. SUB-PROYECTO 1: Obtención de versiones/variante de omalizumab y puesta a punto de estudios clave para la comparabilidad fisicoquímica (Objetivo 1).

4.1.1. Introducción: planteamiento experimental

El Sub-proyecto 1 se alinea con el Objetivo Específico 1 de la Tesis Doctoral. La semejanza analítica (estructural y funcional) entre dos moléculas biológicas es la prueba más robusta y sensible en la evaluación de su grado de igualdad. Por lo tanto, en la anticipación de posible biosimilaridad, la caracterización estructural, o fisicoquímica, comparada tiene un peso notable. El empleo de técnicas sensibles permite identificar diferencias leves, por lo general, indetectables clínicamente. El reto radica en determinar qué atributos analíticos son críticos y qué técnicas son clave para el análisis comparado de versiones/variantes de un determinado principio activo biológico. En el caso de los anticuerpos terapéuticos monoclonales como omalizumab (y de otras proteínas terapéuticas recombinantes) hemos identificado tres aspectos estructurales clave: **(a)** la secuencia aminoacídica primaria entre candidato a biosimilar y original que debe ser idéntica, **(b)** el patrón de glicosilación que debe exhibir un alto grado de similitud cualitativa y cuantitativa (caso por caso), y **(c)** la conformación estructural (espacial) que debe esencialmente solaparse. Efectivamente, la heterogeneidad en el patrón de glicosilación y variaciones en la estructura tridimensional (secundaria y terciaria) pueden tener impacto clínico si exceden determinados límites. Precisamente cambios en la glicosilación, además de otros factores, pueden alterar esa conformación espacial. En la caracterización de una proteína terapéutica compleja el análisis cualitativo/cuantitativo del perfil de glicanos es relevante. Por eso en la comparación entre versiones/variantes proteicas es determinante y conveniente aplicar técnicas discriminatorias de alta resolución. De igual manera la puesta a punto de técnicas que permitan la discriminación de variaciones nanomoleculares permitirá afinar en la demostración de esencial igualdad entre proteínas terapéuticas, no siempre alcanzable mediante técnicas convencionales. Un abordaje óptimo en la determinación de la idoneidad de técnicas analíticas desarrolladas con fines comparativos es disponer de moléculas con diverso grado de analogía. La patente del producto con omalizumab original, Xolair® ofrece información interesante que permite generar compuestos muy parecidos al principio activo comercializado. La comparación de anticuerpos monoclonales funcionalmente equivalentes respecto al determinante antigénico reconocido, pero con diferencias estructurales identificables, permitirá determinar la capacidad discriminatoria de las técnicas desarrolladas y aplicadas al análisis estructural.

A la luz de los antecedentes, se decidió producir moléculas análogas (que llamamos versiones y/o variantes) al omalizumab comercial para desarrollar y perfeccionar técnicas clave en la evaluación de los atributos fisicoquímicos críticos escogidos. Por lo tanto, como parte de este sub-proyecto (y del primer objetivo) se secuenciaron las versiones y la variante de omalizumab, se estudió el patrón de glicosilación

y se determinó la viabilidad de emprender un análisis nanomolecular mediante tecnología de radiación de alta resolución del sincrotrón.

Se diseñaron 3 estudios con el objetivo de alcanzar cada uno de los Sub-objetivos del Objetivo 1 “*Obtener moléculas análogas de omalizumab y poner a punto técnicas clave en la comparabilidad fisicoquímica*”.

- **Estudio 1.1:** *Producción de moléculas análogas (versiones/variantes) del anticuerpo monoclonal omalizumab (Xolair®) y determinación de su secuencia aminoacídica (Sub-objetivo 1.1).*

Con la finalidad de evaluar la sensibilidad discriminatoria de las técnicas de análisis estructural aplicadas se produjeron dos moléculas análogas al omalizumab del producto original Xolair®. La combinación del estudio de la patente de Xolair® junto con el análisis de diferentes fuentes oficiales, permitió pre-identificar la secuencia aminoacídica del omalizumab comercializado, que fue confirmada mediante posterior análisis. A partir de esta secuencia se generaron una versión de este (secuencia aminoacídica idéntica) y una variante que difiere en tres aminoácidos y que el titular de Xolair® también protegió en su patente. Una vez producidas, se evaluaron mediante dos técnicas de secuenciación con el objetivo de identificar/confirmar la idónea en un estudio de comparabilidad preliminar.

- **Estudio 1.2:** *Evaluación del patrón de glicosilación de omalizumab de Xolair® y comparación con el de las versiones/variantes (Sub-objetivo 1.2).*

Se estudió y comparó el contenido en glicanos de diversos lotes de Xolair® con el fin de establecer el rango de variabilidad de este atributo fisicoquímico en omalizumab original. Se comparó el perfil de glicosilación con una versión de omalizumab (misma secuencia aminoacídica) producida en un sistema de expresión distinto (células HEK-293). La utilización de un sistema alternativo anticipa cambios en la glicosilación superiores a los existentes entre lotes de un determinado producto y, por lo tanto, ofrece una plataforma idónea para la comparabilidad cualitativa y cuantitativa del perfil de glicosilación. Con ello se podría concluir sobre la capacidad discriminatoria, sensibilidad e idoneidad de las técnicas empleadas.

- **Estudio 1.3:** *Determinación de la aplicabilidad de la tecnología de radiación del sincrotrón al análisis nanoestructural de versiones/variantes de omalizumab (Sub-objetivo 1.3).*

Se planteó la conveniencia de aplicar una técnica de alta resolución en la determinación de la conformación molecular de biomoléculas como un análisis estructural comparativo innovador. Se utilizaría la tecnología de la luz sincrotrón con el fin de detectar diferencias nanoestructurales. La obtención de cristales óptimos para el análisis es esencial. Por eso se estudiaron distintos protocolos para maximizar la calidad y la reproducibilidad de la cristalización de omalizumab y así maximizar la resolución analítica.

A continuación, se describe sucintamente el procedimiento experimental aplicado en cada estudio, y se presentan y analizan los resultados de acuerdo con cada Sub-objetivo.

4.1.2. Material y métodos

En esta sección se describen las técnicas empleadas en la ejecución de cada estudio.

- a) **Estudio 1.1: Producción de moléculas análogas (versiones/variantes) del anticuerpo monoclonal omalizumab (Xolair®) y determinación de su secuencia aminoacídica (Sub-objetivo 1.1).**

- **Muestras analizadas**

En este estudio se analizaron las siguientes muestras de omalizumab (**Tabla 2**).

Tabla 2. Muestras empleadas en el Estudio 1.1.

Versión/Variante	Lote	Fecha caducidad
Xolair®	S010203 (Lote 1)	12/2017
Versión (veOMA)	Lote 1	NA
Variante (vaOMA)	Lote 2	NA

NA: No aplica.

- **Identificación de la secuencia aminoacídica de omalizumab de producto Xolair®**

Se examinó la patente estadounidense de Xolair® (**NUCLEIC ACID ENCODING ANTI-IGE ANTIBODIES** código **US 7,351,816 B2**) cuya titularidad tiene la empresa Genentech Inc. (South San Francisco, CA, EEUU) (59). En la patente constan diversas secuencias, entre ellas la del producto original comercializado. Con el fin de certificar la identidad de la secuencia del producto comercializado, se revisó la patente japonesa y se contrastó con datos de diversas fuentes (bases de datos de estructuras proteicas como ChEMBL o DrugBank). Dos secuencias eran las más frecuentemente referidas. Mediante secuenciación *de novo* se verificó que la secuencia del fármaco Xolair® coincidía con una de ellas. Finalmente, se produjeron ambas proteínas, una proteína con la misma secuencia que la del anticuerpo comercializado y otra con actividad anti-IgE que difería en su secuencia.

- **Producción de moléculas análogas para omalizumab de Xolair®**

Se solicitó a la empresa Absolute Antibody Ltd. (Redcar, Cleveland, Reino Unido) la producción de las dos proteínas identificadas. El objetivo era generar una versión del omalizumab original que comparte la secuencia aminoacídica pero con probables modificaciones post-traduccionales al expresarse en un sistema alternativo; células HEK-293. Se trata de células embrionarias de riñón humano, un sistema de expresión distinto al utilizado en la producción de Xolair® (células CHO). Con ello se incrementaba la probabilidad de que hubiese cambios en el patrón de glicosilación y otros atributos de calidad para así poder determinar el grado de discriminación atribuible a las técnicas analíticas. Las moléculas obtenidas

se denominaron: **veOMA (versión de omalizumab)** y **vaOMA (variante de omalizumab)**. La variante se produjo también en células HEK-293. Se obtuvieron dos lotes diferentes de cada una.

- **Secuenciación *de novo***

Una vez identificadas bibliográficamente las secuencias, se llevó a cabo la secuenciación peptídica *de novo* por la empresa Rapid Novor Inc. (Kitchener, Ontario, Canadá). Para el análisis se les entregó inicialmente una muestra del lote S010203 de Xolair® y, posteriormente una muestra del lote 1 de veOMA. Para cada muestra analizada se prepararon 7 condiciones de digestión diferentes (7 en solución y 7 en gel) utilizando combinaciones de enzimas (Pepsina, tripsina, quimotripsina y Asp N³). Todas las digestiones contenían una mezcla de péptidos de todas las cadenas. Por otro lado, las digestiones en gel se prepararon tras separar en un gel SDS-PAGE reductor las cadenas de las inmunoglobulinas. Una vez separadas las cadenas pesadas de las ligeras, se digirieron usando las 7 combinaciones enzimáticas. El producto de la digestión se analizó mediante LC-MS/MS utilizando el espectrómetro de masas Thermo-Fisher Q Exactive™ Orbitrap Fusion™. Los péptidos se ensamblaron dentro de secuencias de anticuerpos de la base de datos del software Proteome Discoverer™.

- **Mapa de huella peptídica (*Peptide Map Fingerprint*)**

Se empleó también la técnica *Peptide Map Fingerprint* (PMF) para identificar y verificar la secuencia aminoacídica. Se evaluó una muestra del lote 2 de vaOMA. Se llevaron 50µg de muestra (concentración a 1mg/mL) a un buffer que contenía 0.1% SDS y 10mM de DTT y se incubó durante 30 minutos a 60°C. Se paró la reacción, se añadió iodoacetamida hasta una concentración final de 55mM y se incubó durante 30 minutos en condiciones de oscuridad. Tras esta última incubación, se precipitó la proteína con acetona a -20°C durante una hora y se reconstituyó en 50µL de bicarbonato de amonio (25mM) obteniéndose una concentración final de 1mg/mL. La posterior digestión enzimática, se realizó ON⁴ a 37°C. Se añadió 1µL de tripsina (reconstituida en 25mM de bicarbonato de amonio y en una concentración de 1mg/mL) a los 50µL de la muestra. Para el análisis por nanoLC-Velos Orbitrap, se diluyó la muestra a 1/100 con el tampón y se inyectó 5µL. El tiempo de la cromatografía era de 40 minutos a un flujo constante de 350nL/min. Se utilizaron dos fases móviles descritas en la **Tabla 3**, donde también se indica el gradiente utilizado en el método. El análisis de los datos se realizó con el software Thermo Proteome Discoverer 1.4.1.14 (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU).

³ **Asp N**: Endoproteínasa que hidroliza uniones peptídicas en la zona N-terminal de residuos de aspárticos y cisteínas.

⁴ **ON**: *overnight* – incubación durante toda la noche.

Tabla 3. Tabla con el gradiente de fases para el análisis de PMF.

Tiempo	%A (97% H ₂ O MS/ 3% ACN / 0.1% Ácido Fórmico)	%B (3% H ₂ O MS/ 97% ACN / 0.1% Ácido Fórmico)	ACN (100%)
0	100	0	0
5	95	5	0
20	70	30	0
25	0	100	0
40	0	0	100

H₂O MS: agua ultrapura para masas; ACN: Acetonitrilo

- Material y reactivos

En la **Tabla 4** y **Tabla 5** se recogen los reactivos y materiales utilizados en la determinación de la secuencia aminoacídica de los compuestos en estudio.

Tabla 4. Lista de equipos y softwares utilizados en el Estudio 1.1 del Sub-proyecto 1.

Producto	Descripción	Casa Comercial
Equipos	Q Exactive™ Orbitrap Fusion™	ThermoFisher Scientific
	nanoLC-Velos Orbitrap	ThermoFisher Scientific
Softwares	Proteome Discoverer™ software	ThermoFisher Scientific

Tabla 5. Lista de reactivos utilizados en el Estudio 1.1 del Sub-proyecto 1.

Reactivos	Casa Comercial	Referencia
Acetona	Supelco	1.00014
Bicarbonato de amonio	Sigma-Aldrich	A6141
DTT (<i>DL-Dithiothreitol</i>)	Sigma-Aldrich	D0632
Iodoacetamida	Sigma-Aldrich-	I1149
vaOMA	Absolute Antibody Ltd.	Ab00874-10.17 v2
veOMA	Absolute Antibody Ltd.	Ab00874-10.17
SDS (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)	Sigma-Aldrich	62862
Tripsina	Sigma-Aldrich	T4799
Xolair®	Novartis Europharm Ltd.	NA

b) Estudio 1.2: Evaluación del patrón de glicosilación de omalizumab de Xolair® y comparación con el de las versiones/variantes (Sub-objetivo 1.2.).

El estudio de la glicosilación de las muestras de omalizumab se llevó a cabo mediante una colaboración con el *National Institute for Bioprocessing Research and Training* (NIBRT) del *University College Dublin* (UCD) (Blackrock, Dublín, Irlanda).

- **Muestras analizadas**

Para el análisis se proveyeron 4 lotes de Xolair® y un lote de la versión de omalizumab (veOMA). En la **Tabla 6** se muestran los detalles de cada muestra analizada.

Tabla 6. Muestras empleadas en el análisis de caracterización de N-glicanos.

Versión/variante	Lote	Fecha caducidad
Xolair® - Lote 1	S010203	12/2017
Xolair® - Lote 2	AVXS011303	03/2019
Xolair® - Lote 3	AVXS223003	03/2019
Xolair® - Lote 4	AVXS011405	04/2019
Versión (veOMA)	Lote 1	NA

NA: No aplica.

- **Caracterización de N-glicanos**

Los N-glicanos fueron enzimáticamente separados de las glicoproteínas mediante PNGase F y marcados con la molécula fluorescente 2-AB. Se reemplazó el tampón de 250µg de proteína mediante dialización en un buffer de 20mM NaHCO₃ utilizando filtros Nanosep® 10K MWCO. Se redujeron con DTT durante 15 minutos a 65°C. Una vez finalizada la incubación se alquilaron con iodoacetamida y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente (RT) protegidos de la luz solar. Posteriormente, se trataron con PNGase F a 37°C ON. Antes del marcaje se separaron las proteínas desglicosiladas de los glicanos disueltos usando un filtro Nanosep® 10K MWCO. Las muestras con los glicanos se secaron en una centrifuga mediante vacío y se marcaron con una solución de marcaje 2-AB (*LudgerTag 2-AB labelling kit*). El exceso de 2-AB se eliminó utilizando una resina de amida Phytips (Phynexus).

Las moléculas marcadas se separaron utilizando dos técnicas de cromatografía (HILIC y WAX) con detección mediante fluorescencia. Cada muestra se analizó por triplicado, a través de tres muestras procesadas independientemente. Detalles del método de cromatografía HILIC-UPLC se describen en la **Tabla 7**. El sistema UPLC se calibró con un estándar que contenía una mezcla de dextranos de distintos pesos moleculares marcados con 2-AB (*2-AB labeled glucose homopolymer*). La curva estándar se ajustó y se usó para asignar valores de *Glucose Unit* (GU) a los tiempos de retención del cromatograma. Para controlar los equipos, integrar y evaluar los resultados se usó el sistema Empower 3 (Waters)(60). En la **Tabla 8** se aportan detalles sobre la identificación por cromatografía de intercambio aniónico débil

(WAE-HPLC). Como estándar de referencia se usó fetuína marcada con 2-AB. Este estándar se corrió junto a las muestras para determinar el tiempo de retención de las estructuras neutrales, mono-, di-, tri- y tetra-cargadas.

También se llevaron a cabo digestiones con exoglicosidasas para determinar la secuencia y uniones de los glicanos presentes en las proteínas. Las digestiones con exoglicosidasas se llevaron a cabo en las alícuotas de *N*-glicanos marcadas con 2-AB. Todas las alícuotas se combinaron para este análisis. Las digestiones se ejecutaron de acuerdo a los métodos previamente descritos en *Glycobiology Protocols – Methods in Molecular Biology* (61). Las enzimas exoglicosidasas BKF, SPG y BTG se obtuvieron de Prozyme (Hayward, CA, EEUU) y ABS, GUH y NAN1 de New England Biolabs (Ipswich, MA, EEUU).

Todos los resultados estructurales fueron respaldados por datos obtenidos mediante espectrometría de masas. Los detalles y parámetros usados para este método están descritos en la **Tabla 9**.

Tabla 7. Detalles y parámetros del método HILIC-UPLC.

Preparación de la muestra	70% Acetonitrilo
Volumen de inyección	10µL
Columna	1.7µm BEH Glycan Column (2.1 x 150mm)
Temperatura de columna	40°C
Equipo	Waters Acquity UPLC equipado con un detector de fluorescencia
Software	Empower 3 (Waters)
Fase móvil A	50mM Formiato de amonio (pH 4.4)
Fase móvil B	100 % Acetonitrilo
Gradiente	Linear de 30 minutos
Longitud de onda	<u>Excitación:</u> 330nm <u>Emisión:</u> 420nm
Weak wash	80% Acetonitrilo
Strong wash	20% Acetonitrilo
Temperatura de las muestras	5°C

Tabla 8. Detalles y parámetros del método WAE-HPLC.

Preparación de la muestra	100% Agua
Volumen de inyección	95µL
Columna	10µm Waters Biosuite DEAE (7.5 x 75mm)
Temperatura de columna	25°C
Equipo	Módulo de separación Waters 2795 Alliance equipado con un detector por fluorescencia Waters 2475
Software	Empower 3 (Waters)
Fase móvil A	20% Acetonitrilo
Fase móvil B	100mM Acetato de amonio (pH 7.0) en 20% acetonitrilo
Gradiente	Linear de 30 minutos
Longitud de onda	<u>Excitación:</u> 330nm <u>Emisión:</u> 420nm
Temperatura de las muestras	5°C

Tabla 9. Detalles y parámetros del método de espectrometría de masas.

Preparación de la muestra	70% Acetonitrilo
Volumen de inyección	10µL
Columna	1.7µm Waters BEH Glycan column (1.0 x 150mm)
Temperatura de columna	60°C
Equipo	Thermo Scientific Q Exactive Plus: Vanquish plus UPLC equipado con un detector de fluorescencia
Software	Xcalibur (Thermo Scientific)
Fase móvil A	50mM Formiato de amonio (pH 4.4)
Fase móvil B	100 % Acetonitrilo
Gradiente	Linear de 40 minutos
Longitud de onda	<u>Excitación:</u> 330nm <u>Emisión:</u> 420nm
Espectrómetro de masas	<u>Modo:</u> Negativo <u>Voltaje de pulverización:</u> 3.40kV <u>Temperatura del capilar:</u> 320°C <u>Temperatura del gas auxiliar:</u> 300°C <u>Flujo de gas Sheath:</u> 30L/h <u>Flujo de gas Sweep:</u> 10L/h <u>Rango de escaneo:</u> 450 – 2,500 m/z <u>Resolución:</u> 70,000
Temperatura de las muestras	5°C

- Material y reactivos

Se recogen en la **Tabla 10** y **Tabla 11** los equipos, materiales y reactivos utilizados para la caracterización del patrón de glicosilación de los compuestos en estudio.

Tabla 10. Lista de columnas, equipos y programas utilizados en el Estudio 1.2 del Sub-proyecto 1.

Producto	Descripción	Casa Comercial	Referencia
Columnas	ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide Column, 130Å, 1.7µm (2.1 x 150mm)	Waters	186004742
	BioSuite DEAE Anion-Exchange Column 1000Å (7.5 x 75mm)	Waters	186002180
Equipo	Waters ACQUITY UPLC equipado con un detector de fluorescencia Waters® 2475	Waters	LITR10140695 720000401EN
	Módulo de separación Waters® 2795 Alliance HT equipado con un detector por fluorescencia Waters® 2475	Waters	720000781EN 720000401EN
	Orbitrap™ Q Exactive™ Plus equipado con un detector Vanquish™	Thermo Scientific	IQLAAEGAAPFALGMAZR VF-D50-A
Software	Empower 3	Waters	NA
	Xcalibur™ Software	Thermo Scientific	OPTON-30965

Tabla 11. Lista de reactivos y materiales utilizados en el Estudio 1.2 del Sub-proyecto 1.

Reactivo/Material	Casa Comercial	Referencia
2-AB Labeled Glucose Homopolymer	Ludger	CAB-GHP-30
ABS (Sialidasa)	New England Biolab	P0720S
Acetato de amonio	Sigma-Aldrich	A1542
Acetonitrilo	Sigma-Aldrich	34851
BKF (Fucosidasa)	Prozyme	GKX-5006
BTG (β -Galactosidasa)	Prozyme	GKX-5013
DTT (DL-Dithiothreitol)	Roche	DTT-RO
Fetúina marcada con 2-AB	Ludger	GVP-FET-50U-X4
Formiato de amonio	Waters	186007081
GUH (Hexosaminidasa)	New England Biolab	P0721S
Iodoacetamida	Sigma-Aldrich	I1149
LudgerTag™ 2-AB Glycan Labelling Kit	Ludger	LT-KAB-A2
Bicarbonato Sódico (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich	S5761
NAN1 (Neuraminidasa)	New England Biolab	P0743S

Nanosep® 10K MWCO	PALL	OD010C34
vaOMA	Absolute Antibody Ltd	Ab00874-10.17
veOMA	Absolute Antibody Ltd	Ab00874-10.17 v2
PNGasa F	New England Biolabs	P0709S
SPG (β-Galactosidasa)	Prozyme	GKX-5014
Xolair®	Novartis Europharm Ltd.	NA

- c) Estudio 1.3: Determinación de la aplicabilidad de la tecnología de radiación del sincrotrón al análisis nanomolecular de versiones/variantes de omalizumab (Sub-objetivo 1.3).

Los experimentos relativos a este Sub-objetivo se llevaron a cabo en las instalaciones del Sincrotrón ALBA (Cerdanyola del Vallès, Barcelona, España) en la unidad XALOC de Cristalografía Macromolecular.

- Muestras analizadas

Para el análisis nanoestructural se utilizaron cuatro lotes de Xolair®. La **Tabla 12** detalla el número de lote y fecha de caducidad de los lotes empleados.

Tabla 12. Detalles de las muestras empleadas para la caracterización nanoestructural mediante la luz del sincrotrón.

Versión/variante	Lote	Fecha caducidad
Xolair® - Lote 1	S010203	12/2017
Xolair® - Lote 2	AVXS011303	03/2019
Xolair® - Lote 3	AVXS223003	03/2019
Xolair® - Lote 4	AVXS013013	03/2020

Todas las muestras fueron pretratadas. Se dializaron a un tampón de cristalización 10mM Tris, 140mM NaCl, pH 7.4 y, posteriormente, se concentraron alrededor de 20mg/mL.

- Cristalización de la proteína entera

Las muestras de Xolair® se sometieron a una prueba de pre-cristalización. Para ello se probaron dos concentraciones proteicas, 10mg/mL y 20mg/mL. Se pusieron diferentes placas de cribado comerciales (**Tabla 13**). Se usó un robot Mosquito® (SPT Labtech, Melbourn, Reino Unido) para pipetear las gotas (500nL proteína y 500nL reservorio). Las placas con la proteína se incubaron en una cámara oscura a 18°C y se revisaban semanalmente en búsqueda de cristales.

Tabla 13. Nombre de los kits de cribado utilizados en las pruebas de cristalización de la proteína entera.

Nombre del kit de cribado	Casa comercial
Index™	Hamptom Research (Los Ángeles, CA, EEUU)
Structure Screen 1 + 2 HT-96	Molecular Dimensions (Sheffield, Reino Unido)
PACT premiere™	Molecular Dimensions (Sheffield, Reino Unido)
JCSG-plus™	Molecular Dimensions (Sheffield, Reino Unido)
PEG/ION Screen™	Hamptom Research (Los Ángeles, CA, EEUU)
Morpheus®	Molecular Dimensions (Sheffield, Reino Unido)
MemGold™	Molecular Dimensions (Sheffield, Reino Unido)
MemGold2™	Molecular Dimensions (Sheffield, Reino Unido)

Con el objetivo de disminuir el tiempo de cristalización y optimizar la morfología de los cristales para una mejor resolución, se pusieron placas de optimización, variando la concentración de PEG3350 y el pH del buffer HEPES respecto a la mejor condición obtenida previamente (50mM HEPES pH 7.0, 0.001M Azida sódica, 1% Triptona y 12% (w/v) PEG3350), manteniendo el resto de componentes constantes. Las placas de optimización fueron las siguientes:

Placa optimización 1: A partir de la condición original se llevó a cabo una criba de optimización en una placa de 48 pocillos variando la concentración de PEG3350 (8-16%) en el eje horizontal y variando el pH del buffer HEPES (6-8) en el eje vertical. El resto de componentes se mantuvieron constantes. Se usó la muestra a una concentración de alrededor 20mg/mL. El tamaño de gota usado era de 1µL (500nL proteína y 500nL reservorio).

Placa optimización 2 o placa de cribado de aditivos: Se probó cristalizar la proteína a 10mg/mL y a 20mg/mL usando como reservorio la condición original donde se obtuvo el primer cristal analizado (50mM HEPES pH 7.0, 0.001M Azida sódica, 1% Triptona y 12% (w/v) PEG3350). Como aditivos se usó el kit de cristalización Silver Bullets™ (Hampton Research, Los Ángeles, CA, EEUU). En cada gota se dispersaron 200nL de proteína, 40nL de aditivo y 160nL de reservorio (volumen total de la gota 400nL).

- **Cristalización de la proteína fragmentada**

El medicamento comercial Xolair® (150mg/mL) se fragmentó (135µL) usando el kit de preparación de fragmentos Fab Pierce™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU). Se diluyó hasta alcanzar 1mL en buffer de digestión Fab. La muestra se desaló usando columnas Zeba™ con MWCO de 7K. Se recolectó todo el *flowthrough*⁵ centrifugando las columnas a 1000g durante 2 minutos, y se diluyó hasta alcanzar un volumen de 2.5mL final con buffer de digestión. A continuación, se prepararon 5 alícuotas

⁵ *Flowthrough*: parte líquida que eluye de la columna tras centrifugación.

de 0.25mL de 50% de *slurry*⁶ con la papaína inmovilizada. Las alícuotas con partículas de papaína se lavaron/equilibraron varias veces con el buffer de digestión centrifugando 1 minuto a 5000g. La muestra de proteína se repartió en 5 alícuotas de 0.5mL y se mezclaron con las alícuotas que contenían las *beads*⁷ de papaína inmovilizada. Se incubaron durante 14 horas a 37°C en un agitador orbital. Tras la incubación las mezclas se centrifugaron (1 minuto a 5000g) para parar la reacción. El volumen eluido que contenía tanto los fragmentos digeridos como no digeridos se recogió.

Para separar las diferentes especies se introdujeron las muestras digeridas en columnas Nab ProtA Plus Spin y se dejaron durante 15 minutos a RT en un agitador orbital para favorecer la unión de las regiones Fc con la Proteína A⁸ de la columna. Finalizada la incubación, se tomó el líquido eluido (muestra con solo fragmentos Fab). Para obtener los posibles fragmentos Fc y proteínas enteras que no se hubiesen digerido, se introdujo y se eluyó a través de la columna 3mL de *IgG Elution buffer*. La eficiencia de la digestión enzimática se evaluó mediante un gel SDS-PAGE al 12% de acrilamida tanto bajo condiciones reductoras como no reductoras. La proteína se estabilizó añadiendo en una proporción 1:10 buffer 1M Tris a pH 8.0. Se midió la concentración proteica de las muestras con el NanodropTM usando como coeficiente de extinción 1.4 (Asumiendo que la digestión de IgG ha sido completa).

Previamente a la cristalización, la región Fab se purificó mediante una cromatografía gel filtración utilizando el equipo ÄKTATM pure (GE Healthcare, Chicago, IL, EEUU) y la columna ProteoSEC Size Exclusion Columns HR 16/60 (Generon, Slough, Reino Unido). Para la cromatografía de gel filtración se usó el buffer 20mM Tris, pH 8.0, 500mM NaCl. Las regiones Fab se concentraron hasta llegar a un volumen de 250µL que se inyectó usando un *loop*⁹ de 0.5mL. Las fracciones correspondientes al pico principal del cromatograma (**Figura 13A**), se juntaron y se concentraron. Previamente, las fracciones se analizaron en un gel SDS-PAGE al 12% reductor para verificar el nivel de pureza de las muestras una vez purificadas por gel filtración (**Figura 13B**).

Las fracciones Fc (3mL) se concentraron hasta llegar a un volumen de 0.5mL. Entonces, se desalaron con las columnas ZebaTM previamente equilibradas con el buffer usado en la cromatografía (20mM Tris, pH 8.0, 500mM NaCl).

Tanto la fracción Fab como la región Fc se cristalizaron bajo las mismas condiciones. Se usaron 3 placas de cribado diferentes para determinar las mejores condiciones de cristalización: IndexTM (Hampton Research, Los Ángeles, CA, EEUU), Structure Screen 1 (Molecular Dimensions, Sheffield, Reino Unido) y JCSG-plusTM (Molecular Dimensions, Sheffield, Reino Unido). Para cada condición de los cribados se

⁶ *Slurry*: solución semi-líquida

⁷ *Beads*: partículas de resina con la papaína inmovilizada.

⁸ **Proteína A**: Proteína que tiene capacidad de reconocer la región Fc de los anticuerpos, especialmente de IgGs.

⁹ *Loop*: Tubo en espiral que sirve para inyectar un volumen grande en equipos de cromatografía.

pusieron dos gotas: una gota con 200nL de proteína (concentración proteica de 20mg/mL) y 200nL del reservorio; y otra gota, como control, de 200nL del tampón de la cromatografía gel filtración con 200nL del reservorio.

Partiendo de la mejor condición obtenida en las placas de cribado se pusieron 2 placas, una para la fracción Fab y otra para la fracción Fc, para cristalizar ambas fracciones de forma óptima. Para cada fracción se puso una placa de 48 pozos dividida en dos partes. El reservorio de la mitad de la placa era el buffer 2M sulfato de amonio y 50mM BisTris a pH 5.5. La otra condición de reservorio era 0.2M acetato de amonio, 50mM BisTris a pH 5.5 y 25% PEG3350. Las gotas de cristalización estaban formadas con 0.8µL de proteína y 0.8µL de reservorio.

Todos los cristales obtenidos se congelaron en buffer criogénico (glicerol al 10%) y se difractaron para su análisis en la línea de luz del grupo XALOC del Sincrotrón ALBA.

- **Material y reactivos**

Se recogen en la **Tabla 14** y **Tabla 15** los equipos, materiales y reactivos utilizados para la cristalización y análisis de cristales del estudio.

Tabla 14. Lista de columnas y equipos utilizados en el Estudio 1.3 del Sub-proyecto 1.

Producto	Descripción	Casa Comercial	Referencia
Columnas	ProSEC 16/60 6-600 HR SEC Column	Generon	SEC-16/60-6-600
Equipos	Centrífuga Heraeus Multifuge X1R	Thermo Fisher	75004250
	Centrífuga de sobremesa Minispin	Eppendorf	5452000018
	Cromatógrafo líquido ÄKTA™ pure	GE Healthcare	NA
	iBright™ FL1500 Imaging System	Invitrogen	A44241
	Microscopio estereoscópico	Olympus	SZX7
	Mosquito® robot	SPT Labtech	NA
	Nanodrop™ 2000	Thermo Fisher	ND-2000
	PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad	1645050

Tabla 15. Lista de reactivos utilizados en el Estudio 1.3 del Sub-proyecto 1.

Reactivos	Casa Comercial	Referencia
Acetato de amonio	Sigma Aldrich	A1542
Azida sódica (NaN ₃)	Sigma Aldrich	S2002
BisTris	Sigma Aldrich	B9754
Cloruro de sodio (NaCl)	Sigma Aldrich	S7653
Formiato de amonio	Waters	186007081
HEPES buffer	Sigma Aldrich	83264
Kit de preparación de fragmentos Fab Pierce™	Thermo Fisher Scientific	44985
Pierce Agarosa con Papaína	Thermo Fisher Scientific	NA
Cisteína-HCl-H ₂ O	Thermo Fisher Scientific	44889
Buffer de digestión Fab	Thermo Fisher Scientific	NA
NAb Protein A Plus Spin Column	Thermo Fisher Scientific	89956
PBS	Thermo Fisher Scientific	NA
Buffer de elución IgG	Thermo Fisher Scientific	NA
Zeba Desalt Spin Columns (7K MWC0)	Thermo Fisher Scientific	89890
Spin Columns	Thermo Fisher Scientific	89897
Tubos para microcentrífuga	Thermo Fisher Scientific	89868
vaOMA	Absolute Antibody Ltd	Ab00874-10.17
veOMA	Absolute Antibody Ltd	Ab00874-10.17 v2
PEG3350	Sigma Aldrich	P4338
Sulfato de amonio	Sigma Aldrich	A4418
Triptona	Quimigen SL	MD2-100-254
Trizma® base (Tris)	Sigma Aldrich	T1503
Xolair®	Novartis Europharm Ltd.	NA

4.1.3. Resultados y discusión

A continuación, se describen y discuten los resultados para cada Estudio del Sub-proyecto 1.

- a) Estudio 1.1: Producción de moléculas análogas (versiones/variantes) del anticuerpo monoclonal omalizumab (Xolair®) y determinación de su secuencia aminoacídica (Sub-objetivo 1.1).

- **Identificación, selección y producción de la versión y de la variante de omalizumab**

En la patente de Genentech Inc. se reivindicaban 53 secuencias diferentes de moléculas con función anti-IgE (59). En ella se describe la secuencia aminoacídica de un anticuerpo IgG completo nombrada como “Versión 1” y luego se protegen posibles variantes de esta.

Tras analizar diferentes bases de datos se observó que había dos secuencias de la patente que se repetían con mayor frecuencia:

- Secuencia 1: Correspondiente a la secuencia “Versión 1”.
- Secuencia 2: Secuencia variante de la “Versión 1” con 3 modificaciones en la región variable de la cadena pesada: **(1)** cambio en el residuo aminoacídico de la posición 61 donde la alanina es reemplazada por una asparagina (A61N), **(2)** cambio de residuo en la posición 62 donde el ácido aspártico es substituido por una prolina (D62P), y **(3)** cambio en el residuo de la posición 68 donde la fenilalanina es substituida por una isoleucina (F68I).

Certificar la secuencia aminoacídica de un producto comercializado a partir de su patente es un procedimiento usualmente complejo. Sin embargo, un análisis exhaustivo de las bases de datos permitió anticipar dos posibles secuencias correspondientes a omalizumab de Xolair®. La dificultad en la identificación de la secuencia exacta del producto comercializado nos llevó a determinarla experimentalmente.

Xolair® se analizó mediante una metodología de secuenciación *de novo* de anticuerpos con espectrometría de masas (LC-MS/MS). En la **Figura 5** se esquematiza el ensamblado de los datos obtenidos. Se resolvió el 100% de cobertura de la secuencia cubriendo cada residuo aminoacídico por al menos 5 escáneres peptídicos e identificando de forma precisa y sin predicciones las leucinas e isoleucinas gracias a la implementación de la tecnología WILD® (Rapid Novor, Kitchener, Ontario, Canada), aminoácidos isobáricos que al compartir masa molecular ciertas técnicas no son capaces de discriminarlos.

Se certificó que la secuencia de omalizumab del producto de referencia (Xolair®) equivalía a la Secuencia 2 pre-identificada (Cuya secuencia aminoacídica se detalla en la **Tabla 16**). La Secuencia 1 correspondiente a la “Versión 1” de la patente de Xolair® se confirmó que correspondía a una variante de omalizumab (**Tabla 17**).

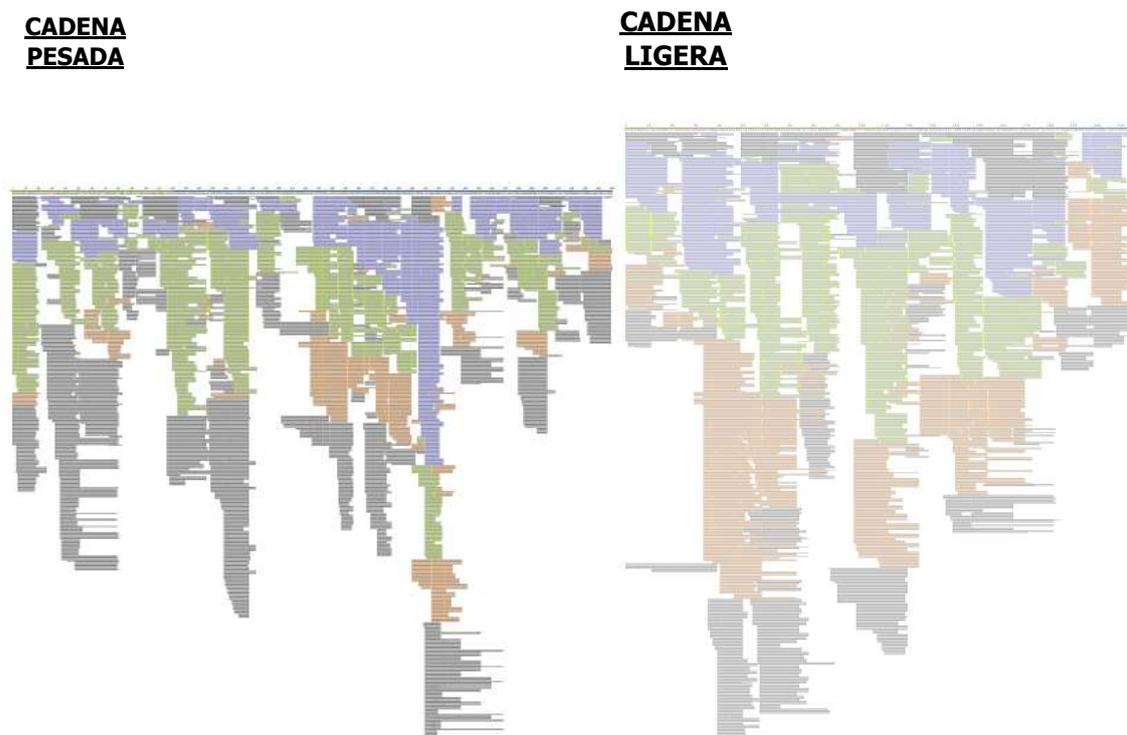


Figura 5. Esquema del ensamblado de los datos obtenidos por LC-MS/MS a partir de las múltiples digestiones enzimáticas del anticuerpo omalizumab de Xolair®. Se consiguió el 100% de cobertura para las dos cadenas del anticuerpo. Se puede observar el número de péptidos detectados, su longitud y su zona de ensamblado dentro de la secuencia de cada cadena.

Se contactó con la empresa Absolute Antibody Ltd. (Redcar, Cleveland, Reino Unido) y se les proporcionaron ambas secuencias (Secuencia 1 y 2) para su producción. Sintetizaron dos lotes para cada molécula utilizando un sistema de expresión (HEK-293) distinto al del producto de referencia (CHO).

- La molécula veOMA: Proteína replica o versión de omalizumab que compartía la misma secuencia del producto comercializado Xolair® (**Tabla 16**).
- La molécula vaOMA: Variante de omalizumab con función anti-IgE correspondiente a la secuencia “Versión 1” de la patente de Xolair® (**Tabla 17**).

Se generó una versión de omalizumab (veOMA) con una secuencia aminoacídica idéntica a la del principio activo original que presumiblemente diferiría en otras características fisicoquímicas al estar sintetizada usando otro sistema de expresión celular (principalmente modificaciones post-traduccionales). Además, se sintetizó una variante (vaOMA) que, si bien mantiene la actividad anti-IgE, no reproduce la secuencia aminoacídica exacta del producto comercializado y, por lo tanto, contribuirá al objetivo de establecer la idoneidad de las técnicas analíticas.

Tabla 16. Secuencia aminoacídica de Xolair® y de la versión de omalizumab (veOMA). En negro las regiones variables de cada cadena.**- Cadena Pesada**

EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVSGYSIT	SGYSWNWIRQ	APGKGLEWVA	SITYDGSTNY
NPSVKGRITI	SRDDSKNTFY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGS	HYFGHWHFAV	WGQGLTIVTS
SASTKGPSVF	PLAPSSKSTS	GGTAALGCLV	KDYFPEPVTV	SWNSGALTSG	VHTFPAVLQS
SGLYSLSSVV	TVPSSSLGTQ	TYICNVNHKP	SNTKVDKKVE	PKSCDKTHTC	PPCPAPELLG
GPSVFLFPPK	PKDTLMISRT	PEVTCVVVDV	SHEDPEVKFN	WYVDGVEVHN	AKTKPREEQY
NSTYRVVSVL	TVLHQDWLNG	KEYKCKVSNK	ALPAPIEKTI	SKAKGQPREP	QVYTLPPSRE
EMTKNQVSLT	CLVKGFYPSD	IAVEWESNGQ	PENNYKTPPP	VLDSGDSFFL	YSKLTVDKSR
WQQGNVFCSS	VMHEALHNHY	TQKSLSLSPG	K		

- Cadena Ligera

DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASQSDV	YDGDSYMNWY	QOKPGKAPKL	LIYAASYLES
GVPSRFSGSG	SGTDFTLTIS	SLQPEDFATY	YCQQSHEDPY	TFGQGTKVEI	KRTVAAPSVF
IFPPSDEQLK	SGTASVVCLL	NNFYBREAKV	QWKVDNALQS	GNSQESVTEQ	DSKDSTYSLS
STLTLSKADY	EKHKVYACEV	THQGLSSPVT	KSFNRGEC		

Tabla 17. Secuencia aminoacídica de la variante de omalizumab (vaOMA). En negro las regiones variables de cada cadena. En amarillo se resaltan los tres aminoácidos diferentes respecto a la secuencia de Xolair®.**- Cadena Pesada**

EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAVSGYSIT	SGYSWNWIRQ	APGKGLEWVA	SITYDGSTNY
ADSVKGRFTI	SRDDSKNTFY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGS	HYFGHWHFAV	WGQGLTIVTS
SASTKGPSVF	PLAPSSKSTS	GGTAALGCLV	KDYFPEPVTV	SWNSGALTSG	VHTFPAVLQS
SGLYSLSSVV	TVPSSSLGTQ	TYICNVNHKP	SNTKVDKKVE	PKSCDKTHTC	PPCPAPELLG
GPSVFLFPPK	PKDTLMISRT	PEVTCVVVDV	SHEDPEVKFN	WYVDGVEVHN	AKTKPREEQY
NSTYRVVSVL	TVLHQDWLNG	KEYKCKVSNK	ALPAPIEKTI	SKAKGQPREP	QVYTLPPSRE
EMTKNQVSLT	CLVKGFYPSD	IAVEWESNGQ	PENNYKTPPP	VLDSGDSFFL	YSKLTVDKSR
WQQGNVFCSS	VMHEALHNHY	TQKSLSLSPG	K		

- Cadena Ligera

DIQLTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASQSDV	YDGDSYMNWY	QOKPGKAPKL	LIYAASYLES
GVPSRFSGSG	SGTDFTLTIS	SLQPEDFATY	YCQQSHEDPY	TFGQGTKVEI	KRTVAAPSVF
IFPPSDEQLK	SGTASVVCLL	NNFYBREAKV	QWKVDNALQS	GNSQESVTEQ	DSKDSTYSLS
STLTLSKADY	EKHKVYACEV	THQGLSSPVT	KSFNRGEC		

- Determinación de la secuencia aminoacídica

La secuencia aminoacídica, o primaria, de un candidato a biosimilar debe ser idéntica a la del producto original. A partir del análisis de los compuestos disponibles se evaluó la idoneidad de dos técnicas de secuenciación. Primero se secuenció mediante la tecnología de PMF una de las dos moléculas producidas (vaOMA). En paralelo, mediante la tecnología de secuenciación de anticuerpos *de novo* se caracterizó la otra molécula expresada (veOMA).

Huella peptídica (*Peptide Map Fingerprint (PMF)*)

La **Figura 6** muestra el resultado para la molécula vaOMA. Este análisis no proporcionó una cobertura completa de la secuencia del anticuerpo. Para la cadena pesada se obtuvo una cobertura del 67.6% y para la ligera del 71.1% sobre la secuencia molde de omalizumab (**Tabla 16**). No se pudo concluir que la molécula analizada compartía la misma estructura primaria que Xolair®, únicamente que existía una alta probabilidad.

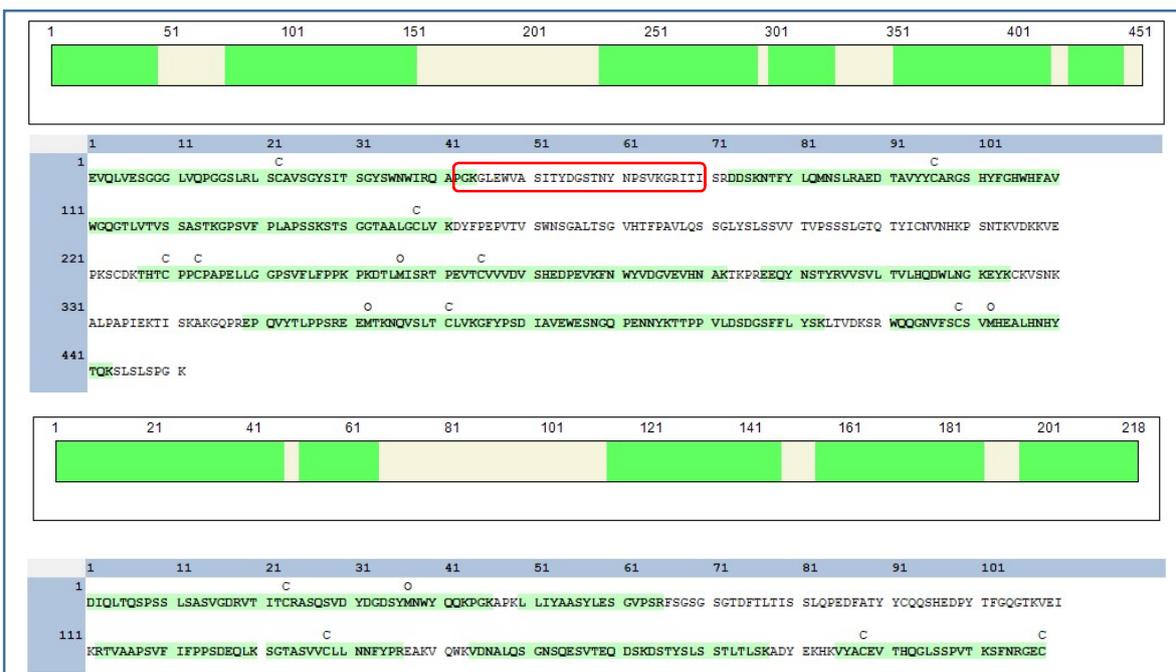


Figura 6. Resultado del análisis de secuenciación mediante PMF de vaOMA. Con un recuadro rojo se resalta el péptido con los residuos problema.

La secuenciación mediante la técnica analítica PMF requiere del conocimiento de antemano de la secuencia proteica a analizar. A partir de esta secuencia el software predice que fragmentos peptídicos teóricos se van a producir con el tratamiento enzimático. El equipo separa los péptidos digeridos mediante cromatografía y los analiza por espectrofotometría de masas. El resultado de las masas de los péptidos obtenidos se compara con el de fragmentos predichos para determinar la secuencia del péptido. Una vez identificados los péptidos, los ensambla en una secuencia molde conocida. La técnica tiene limitaciones. Es incapaz de detectar con exactitud todos los péptidos generados. No se pudieron detectar las diferencias en la secuencia aminoacídica porque precisamente la región en las que se encuentran no fue detectada (Región resaltada en rojo en la **Figura 6**).

Esta técnica es ampliamente conocida para comparar y encontrar diferencias entre biosimilares y productos de referencia. Por este motivo, se añadió el análisis de Xolair® mediante la misma metodología. Se obtuvo una cobertura del 72.3% en la cadena pesada y 87.2% en la ligera. En este caso sí que se consiguió detectar un péptido de la región con las diferencias. El perfil obtenido fue distinto al de vaOMA, indicando claramente que vaOMA y Xolair® no comparten idéntica estructura primaria.

Secuenciación de anticuerpos con espectrometría de masas *de novo*

En la **Figura 7** se presenta el resultado del análisis de veOMA. Como anteriormente al secuenciar *de novo* Xolair® (**Figura 5**), se determinó el 100% de cobertura de la secuencia. Se resolvió la secuencia aminoacídica completa de veOMA verificando que la proteína expresada mantenía la secuencia solicitada. Datos que demostraron la inexistencia de diferencias aminoacídicas, la estructura primaria de veOMA era idéntica a la de omalizumab de Xolair® (**Tabla 16**).

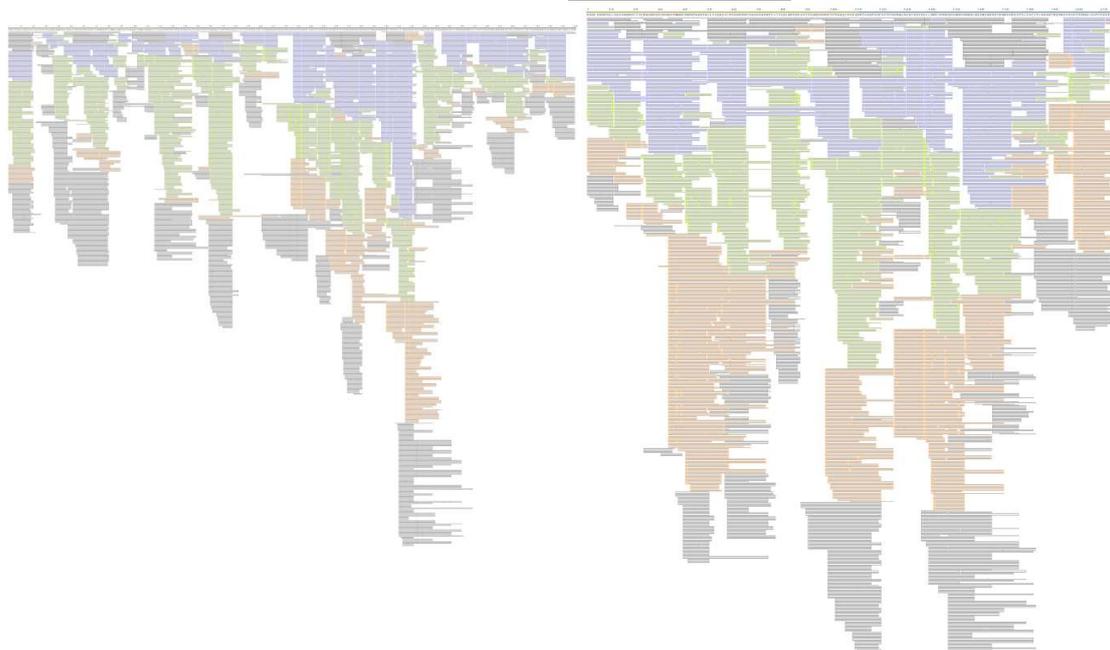
CADENA PESADA**CADENA LIGERA**

Figura 7. Resultado del ensamblado de los datos obtenidos por LC-MS/MS a partir de las múltiples digestiones enzimáticas del anticuerpo expresado veOMA. Se consiguió el 100% de cobertura para las dos cadenas del anticuerpo. Se puede observar el número de péptidos detectados, su longitud y su zona de ensamblado dentro de la secuencia de cada cadena.

Los resultados confirmaron que la técnica PMF no era la adecuada para nuestro propósito. Es una técnica muy utilizada en biosimilaridad para determinar y comparar la identidad entre innovador y candidato. Sin embargo, no permite el nivel de detalle y de discriminación requerido en un PPB o en la comparación de biomoléculas para otros objetivos. La función del PPB o de cualquier plan que requiere de una comparación de alta sensibilidad es evaluar diferencias menores que muy probablemente no tengan impacto clínico. En el caso del PPB moléculas candidatas a biosimilar de omalizumab en desarrollo. En esta fase tan inicial no buscamos comparar identidad, sino verificar que comparten una secuencia idéntica. Para esta finalidad la técnica de secuenciación *de novo* demostró ser idónea. Esta técnica identifica con una alta precisión y sensibilidad el 100% de la cadena aminoacídica. Este primer estudio ha permitido, por lo tanto, obtener moléculas análogas pero con un grado diverso de analogía que ayudaran a valorar la idoneidad de técnicas analíticas, estructurales y funcionales.

b) **Estudio 1.2: Evaluación del patrón de glicosilación de omalizumab de Xolair® y comparación con el de las versiones/variantes (Sub-objetivo 1.2).**

Se presentan los resultados de la caracterización de los *N*-glicanos de las cinco muestras de omalizumab analizadas (**Tabla 6**), cuatro lotes de Xolair® y un lote de la versión veOMA. Ambas moléculas comparten secuencia pero difieren en el sistema de expresión. Las muestras se trataron enzimáticamente para separar los glicanos que se marcaron con la molécula fluorescente 2-AB. Los *N*-glicanos¹⁰ marcados se separaron mediante técnicas de cromatografía HILIC y WAX, y se detectaron mediante fluorescencia. Para determinar la secuencia y el tipo de enlace de los *N*-glicanos presentes se llevaron a cabo digestiones adicionales con exoglicosidasas. Las estructuras identificadas se respaldaron mediante espectrometría de masas.

- **Caracterización del patrón de glicosilación**

Los *N*-glicanos extraídos de las cinco muestras se analizaron por triplicado mediante la técnica HILIC usando un UPLC. Todas las muestras presentaban un perfil de *N*-glicanos muy similar (Ver **Anexo 1.1. Cromatogramas de los triplicados analizados por HILIC**). El perfil HILIC de *N*-glicanos de todos los lotes de Xolair® resaltaban la presencia de 22 estructuras de glicanos. Por otro lado, la muestra del perfil de *N*-glicanos para la molécula veOMA indicaba la presencia de 30 estructuras de glicanos. En la **Figura 8** se representa un cromatograma con todos los perfiles superpuestos donde claramente se ve que los 4 lotes de Xolair® tienen un perfil prácticamente idéntico. Por el contrario, y como era esperable porque el sistema de expresión celular era distinto, la versión veOMA tiene un perfil diferente. Esta difiere tanto cuantitativamente en ciertos picos, como cualitativamente, presenta 8 picos no identificados en omalizumab de Xolair®.

Este análisis preliminar ya permitió observar diferencias entre versiones. Sin embargo, se necesita un análisis más detallado para identificar correctamente todas las estructuras, ya que, existe la posibilidad que más de un glicano pueda eluir a un mismo valor de GU.

Para identificar correctamente todos los glicanos de las muestras se llevó a cabo un complejo y exhaustivo análisis del perfil de glicosilación. El análisis se basó en los resultados obtenidos al separarlos mediante la técnica HILIC (**Anexo 1.1. Cromatogramas de los triplicados analizados por HILIC**). El porcentaje relativo del área de cada pico permitió calcular la abundancia relativa de cada estructura presente. Las estructuras de los *N*-glicanos y uniones glicosídicas se dedujeron a partir de los resultados obtenidos al evaluar las muestras digeridas con el conjunto de enzimas exoglicosidasas (Detallado en el **Anexo 1.2. Digestión y caracterización de los *N*-glicanos**). Todos los resultados de la caracterización

¹⁰ Existen dos tipos de glicosilaciones: la *N*-glicosilación y la *O*-glicosilación. Omalizumab solo presenta *N*-glicanos, todos los oligosacáridos complejos los tiene unidos a un único residuo asparragina (Asn-301)(128).

se corroboraron mediante espectrometría de masas (**Anexo 1.7. Resultados del análisis de espectrometría de masas**). Por otro lado, el análisis también confirmó la presencia de *N*-glicanos cargados, pero no había diferencias entre las muestras (**Anexo 1.6. Resultado del análisis por la técnica WAX**).

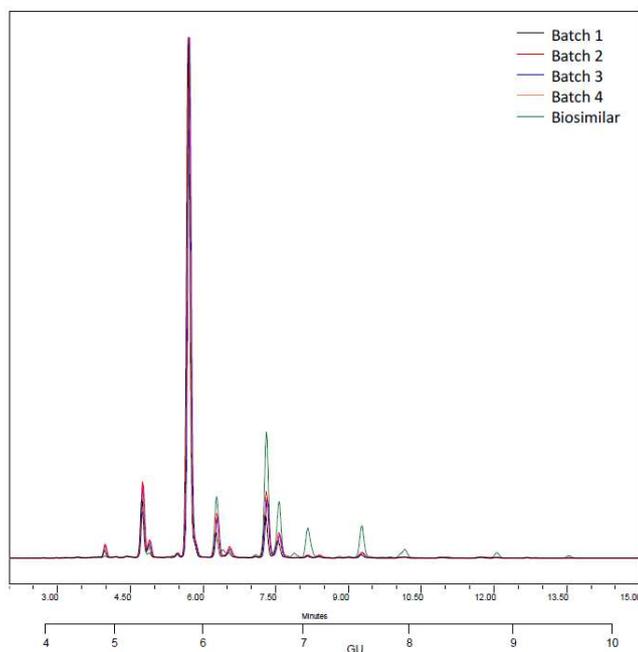


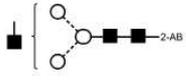
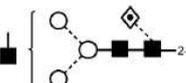
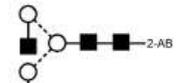
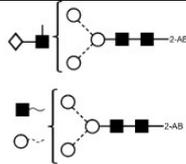
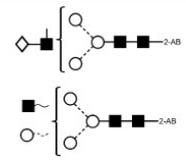
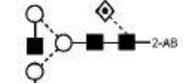
Figura 8. Sobreposición de los cromatogramas de la técnica HILIC de las 5 moléculas de omalizumab. La línea verde nombrada biosimilar hace referencia a la molécula veOMA.

La **Tabla 18** presenta todas las estructuras de glicanos identificadas junto a su porcentaje de abundancia relativa dentro de las distintas muestras de omalizumab analizadas. Los 4 lotes evaluados de Xolair® presentan unos resultados muy parecidos para todas las especies. Eso sí, cabe destacar que la abundancia del lote 1 difiere levemente en algunas especies de glicanos respecto a los lotes 2, 3 y 4 que exhiben una alta identidad entre ellos. Si bien todos los lotes se analizaron dentro del período de vigencia la fecha de caducidad del lote 1 (12/2017) se alejaba en el tiempo de la de los lotes 2 a 4 (entre el 03/2019 y 04/2019). No se puede saber con certeza si las diferencias detectadas son fruto del azar o se deben a algún cambio aplicado en el proceso de producción. Esto último es posible ya que la codificación entre el lote 1 y el resto de los lotes sigue un patrón distinto, sugiriendo que se han fabricado en plantas de producción distintas, y por lo consecuente, procesos de manufactura diferente. La existencia de variabilidad entre lotes de un medicamento comercializado es conocida (6,62,63) y aceptada por las agencias regulatorias como la EMA (22), siempre que no exceda determinados límites.

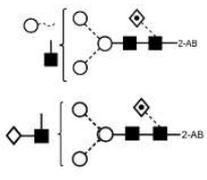
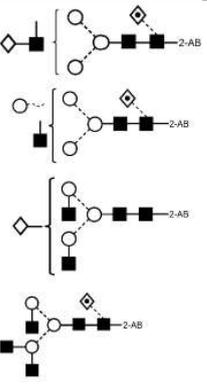
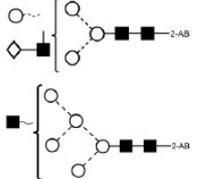
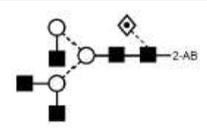
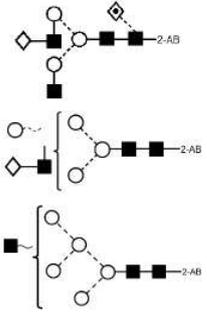
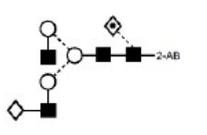
El análisis ha demostrado que las células HEK-293 glicosilan siguiendo un patrón diferente al de las células CHO. La metodología de procesado y análisis ha permitido no solo ver diferencias cualitativas respecto a Xolair®, sino que también diferencias cuantitativas.

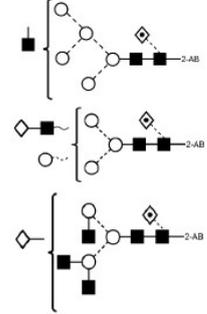
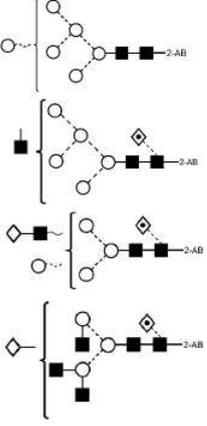
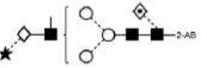
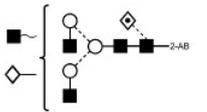
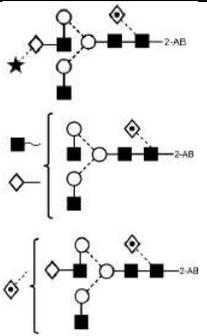
Todos los glicanos expresados en Xolair® también se han encontrado en la versión. Sin embargo, hay 7 estructuras de glicanos que están presentes únicamente en la versión veOMA. El abordaje experimental empleado en el análisis de glicanos es, por lo tanto, útil para una comparación fina entre candidatos a biosimilar y productos de referencia de Xolair®. Incluso permite distinguir entre lotes del propio producto original.

Tabla 18. Tabla resumen indicando las unidades de glucosa (GU), estructuras de glicanos y los porcentajes de área relativos de las estructuras identificadas en las 5 muestras de omalizumab por UPLC, digestiones con exoglicosidasas, WAX y LC-MS análisis.

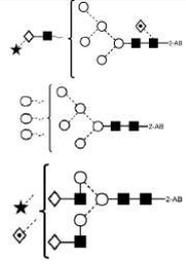
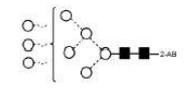
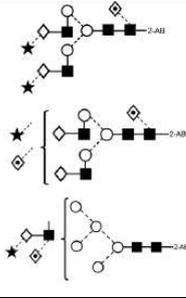
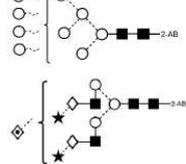
GU	Estructura	Símbolo UOXF ¹¹	Área relativa (%)					veOMA
			Xolair®					
			Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Prom. + DS	
4.85	A1*		0.95	1.45	1.35	1.32	1.27± 0.22	0.21
5.33	F(6)A1*		7.40	8.34	8.27	8.18	8.05± 0.44	4.23
5.41	A2*		1.97	2.28	2.21	2.21	2.17± 0.14	0.56
5.63	A1G(4)1 y/o M4A1		0.16	0.13	0.16	0.20	0.16± 0.03	0.13
5.74	A1G(4)1 y/o M4A1		0.63	0.67	0.67	0.66	0.66± 0.02	0.43
5.87	F(6)A2*		72.1	63.4	65.2	65.8	66.6± 3.79	51.5
6.17	M5*		3.80	5.65	5.38	5.35	5.05± 0.84	6.89

¹¹ **Símbolo UOXF:** Sistema de símbolos para representar glicanos propuesto por Oxford (129).

GU	Estructura	Símbolo UOXF ¹¹	Área relativa (%)					veOMA
			Xolair®					
			Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Prom. + DS	
6.24	F(6)A1G(4)1[‡] y/o F(6)M4A1[‡]		-	-	-	-	-	0.70
6.31	F(6)A1G(4)1* y/o F(6)M4A1* A2G(4)1 [‡] F(6)A3[‡]		1.22	2.07	1.87	1.74	1.73± 0.36	0.96
6.46	M4A1G(4)1[‡] y/o M5A1[‡]		-	-	-	-	-	0.12
6.57	F(6)A3* [‡]		0.24	0.19	0.21	0.22	0.22± 0.02	0.37
6.67	F(6)A2[6]G(4)1* M4A1G(4)1[‡] y/o M5A1[‡]		6.32	8.94	8.28	8.03	7.89± 1.12	14.0
6.79	F(6)A2[3]G(4)1*		3.22	4.10	3.88	3.77	3.74± 0.37	6.89

GU	Estructura	Símbolo UOXF ¹¹	Área relativa (%)					Prom. + DS	veOMA
			Xolair®						
			Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4			
6.94	F(6)M5A1 [‡] y/o F(6)M4A1G(4)1 [‡] F(6)A3G(4)1 [‡]		-	-	-	-	-	0.66	
7.07	M6* F(6)M5A1 [‡] y/o F(6)M4A1G(4)1 [‡] F(6)A3G(4)1 [‡]		0.35	0.48	0.39	0.45	0.42± 0.06	4.25	
7.17	F(6)A1[3]G(4)1S(3)1*		0.28	0.48	0.45	0.41	0.41± 0.09		
7.36	F(6)A3'G(4)1*		≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1	0.21	
7.44	F(6)A2[6]G(4)1S(3)1* F(6)A3'G(4)1 [‡] F(6)A2F(3)1G(4)1 [‡]		0.11	0.12	0.12	0.12	0.12± 0.01	0.18	

GU	Estructura	Símbolo UOXF ¹¹	Área relativa (%)					
			Xolair®					veOMA
			Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Prom. + DS	
7.56	F(6)A2[3]G(4)1S(3)1* F(6)A2G(4)2* M5A1G(4)1[‡]		0.63	0.95	0.89	0.87	0.84± 0.14	4.09
7.73	F(6)M4A1F(3)1G(4)1[‡]		-	-	-	-	-	0.15
7.82	F(6)M5A1G(4)1[‡]		-	-	-	-	-	0.15
7.95	F(6)M4A1G(4)1S(3)1* M7* F(6)M5A1G(4)1* A2F(3)1G(4)1S(3)1[‡]		0.21	0.25	0.21	0.23	0.23± 0.02	1.55
8.29	F(6)A2F(3)1G(4)2[‡] F(6)A2G(4)2S(3)1* M5A1G(4)1S(3)1 [‡]		≤ 0.1	0.12	≤ 0.1	0.12	0.12± 0.07	0.12
8.34	M4A1F(3)1G(4)1S(3)1[‡]		-	-	-	-	-	0.25
8.61	F(6)M5A1F(3)1G(4)1[‡]		-	-	-	-	-	≤ 0.1

GU	Estructura	Símbolo UOXF ¹¹	Área relativa (%)					
			Xolair®					veOMA
			Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Prom. + DS	
8.67	F(6)M5A1G(4)1S(3)1* M8* A2F(3)1G(4)2S(3)1[‡]		0.16	0.17	0.17	0.16	0.17±0.01	0.14
8.81	M8*		≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1	0.73
9.13	F(6)A2G(4)2S(3)2* F(6)A2F(3)1G(4)2S(3)1[‡] M5A1F(3)1G(4)1S(3)1[‡]		≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1	≤ 0.1
9.54	M9* A2F(3)1G(4)2S(3)2*[‡]		0.01	0.02	0.02	0.01	0.02±0.01	0.28

Las estructuras resaltadas en **negrita** solo se detectaron en la muestra de la versión veOMA.

*Estructuras detectadas mediante HILIC-FLD-MS para todas las muestras.

[‡]Estructuras detectadas mediante HILIC-FLD-MS únicamente para veOMA.

[‡]Estructuras no detectadas mediante HILIC-FLD-MS en veOMA.

- Caracterización de las uniones de los *N*-glicanos

La metodología utilizada no solo permitió identificar las estructuras, sino que también permitió caracterizar el tipo de unión de ciertos residuos de azúcar dentro de ellas.

Unión de las β-galactosas

El análisis de unión de β-galactosas (**Anexo 1.4. Estudio de unión de la β-galactosa**) reveló que para todas las muestras todos los residuos de galactosa estaban unidos mediante el mismo enlace (enlace

$\beta(1,4)$). No se observó ninguna estructura que contuviese galactosas unidas por ningún otro tipo de enlace (como el enlace $\alpha(1,3)$).

Unión de las fucosas

El análisis de fucosilaciones identificó que todas las fucosas de los glicanos estaban unidas al núcleo de las estructuras de glicanos mediante enlace $\alpha(1-6)$. Sin embargo, solo en la versión veOMA se detectaron fucosas unidas en los brazos exteriores de los glicanos (**Figura 9**).

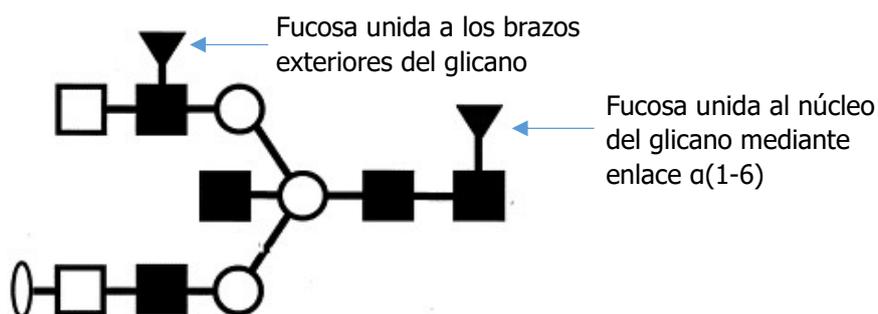


Figura 9. Representación gráfica de la estructura de un glicano. Los círculos representan residuos de manosa, los cuadrados negros *N*-acetilhexosaminas, los triángulos invertidos fucosas, los cuadrados blancos galactosas y el óvalo el ácido *N*-acetilneuramínico.

- **Caracterización de las especies de ácidos siálicos**

Estudiar los ácidos siálicos de las glicoproteínas es muy importante. Los ácidos siálicos están directamente relacionados en algunos casos con la inmunogenicidad de la molécula. Existen dos tipos de ácidos siálicos: el ácido *N*-acetilneuramínico (también denominado Neu5Ac o NANA) y el ácido *N*-glicolilneuramínico (Neu5Gc o NGNA). NANA es un ácido siálico que se encuentra de forma predominante en células humanas y muchas células de mamífero contrariamente a NGNA. Los humanos no pueden sintetizar este último y, por lo tanto, si este ácido siálico se encuentra presente en una proteína terapéutica al administrarla podría llegar a generar reacciones inmunogénicas muy graves. Es muy importante garantizar que un fármaco no presenta NGNA, y si presenta, demostrar mediante ensayos clínicos de seguridad que no desencadena inmunogenicidad.

El estudio determinó que los ácidos siálicos de la proteína eran únicamente NANA (**Anexo 1.3. Estudio de unión de los ácidos siálicos**). Datos que fueron confirmados por espectrometría de masas (**Anexo 1.7. Resultados del análisis de espectrometría de masas**). En ninguna muestra se identificó la forma NGNA. La **Tabla 19** muestra la abundancia relativa de las estructuras sializadas calculadas a partir de los datos obtenidos por WAX-HPLC (**Anexo 1.6. Resultado del análisis por la técnica WAX**). Para todas las muestras el porcentaje de ácidos siálicos variaba entre 0.7-1.0%. Se detectaron tanto estructuras mono- como di-sializadas, ninguna tri- ni tetra-sializadas. Como se ha visto para las estructuras de azúcares, el lote 1 de Xolair® difiere de los lotes 2, 3 y 4, que presentan prácticamente el mismo valor.

Para este parámetro la versión veOMA presenta un valor equivalente a la media de los valores de Xolair®, acercándose al valor del lote 1.

Las digestiones con enzimas sialidasas (**Anexo 1.3. Estudio de unión de los ácidos siálicos**) indicaron que tanto para los lotes de Xolair® como para la versión veOMA, todos los ácidos siálicos estaban unidos mediante el mismo enlace (enlace $\alpha(2-3)$).

La técnica empleada para evaluar y comparar la glicosilación ha permitido detectar de forma precisa diferencias a muchos niveles. No solo se han detectado diferencias esperables entre moléculas similares producidas en diferentes sistemas de expresión, sino que también ha sido capaz de identificar diferencias entre lotes de un mismo producto farmacológico comercializado. Ha demostrado ser una técnica sensible e idónea para analizar y comparar candidatos a biosimilar con el producto de referencia.

Tabla 19. Tabla con los porcentajes de abundancia relativa de estructuras sializadas (totales, mono-sializadas (S1) y di-sializadas (S2)) para la mezcla de todos los N-glicanos de las cinco muestras de omalizumab analizadas. El porcentaje relativo (%) está calculado a partir de la media de los triplicados analizados por WAX-HPLC.

		Xolair®					veOMA
		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Promedio+DS	
% de abundancia relativa	Total	0.72	0.95	0.92	0.90	0.87 ± 0.10	0.75
	S1	0.66	0.88	0.84	0.86	0.81 ± 0.10	0.68
	S2	0.06	0.07	0.08	0.05	0.07 ± 0.02	0.07

Más allá del interés de la técnica a un ejercicio de comparabilidad, conviene destacar que hasta ahora no se había caracterizado el patrón de glicosilación de omalizumab original con tal nivel de detalle.

c) **Estudio 1.3: Determinación de la aplicabilidad de la tecnología de radiación del sincrotrón al análisis nanoestructural de versiones/variantes de omalizumab (Sub-objetivo 1.3).**

Con el fin de proceder al análisis nanomolecular se cristalizó omalizumab de lotes comercializados de Xolair®. Para ello se siguieron dos estrategias experimentales distintas; cristalización de proteína intacta y de fracciones digeridas. Los cristales obtenidos se analizaron bajo el haz de luz de sincrotrón de la línea de luz XALOC del sincrotrón ALBA.

- **Análisis de la molécula IgG intacta**

La cristalización de la proteína intacta planteó muchos problemas. Omalizumab es un anticuerpo monoclonal, una molécula compleja formada por cuatro cadenas unidas mediante enlaces covalentes que presenta ciertos elementos estructurales con movilidad. Por un lado, está la región bisagra que aporta flexibilidad al anticuerpo para facilitar la unión a su diana, la IgE humana. Por otro, encontramos

ramificaciones de glicanos unidos a la región Fc. Para que se forme un cristal es necesario que todas las moléculas tengan la misma conformación y orientación. Cualquier elemento no fijo dificulta la cristalización. Tras la aplicación de diversos protocolos de cristalización en la placa de cribado de aditivos se obtuvo un cristal de morfología prometedora (**Figura 10**).

La resolución de los datos del análisis era muy baja, sin embargo, se pudo identificar que se trataba de cristales de una molécula de tipo IgG truncada. Se concluyó que el largo tiempo de incubación a una temperatura elevada (18°C) podría haber degradado la proteína eliminando alguna región que obstruía la cristalización generando a su vez una fracción cristalizable.

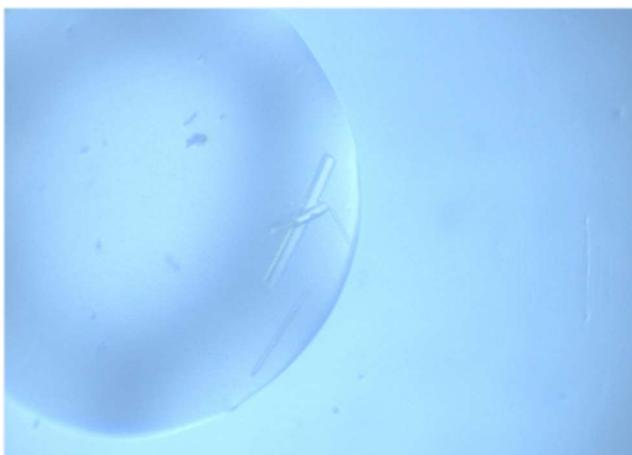


Figura 10. Foto de la gota de la placa de optimización con los cristales de la molécula omalizumab intacta. Condición H11 del kit de cribado comercial PEG/ION Screen™ a la cual se le añadió el screen de aditivos Silver Bullets™. La proteína utilizada tenía una concentración de 21.5mg/mL.

- **Análisis de las fracciones Fab y Fc de omalizumab**

Debido a las complicaciones en la cristalización de la proteína completa y la imposibilidad de adquirir un cristal de calidad para poder analizar la estructura molecular de omalizumab, se decidió modificar el abordaje experimental. Una estrategia comúnmente usada en cristalografía para moléculas que presentan dificultades a la hora de formar cristales es fragmentarla y cristalizar las partes. Al trincar una molécula en diferentes fragmentos se generan fracciones estructuralmente más simples con, teóricamente, una mayor capacidad de cristalización. Para optimizar la cristalización se cortó el anticuerpo por la región bisagra.

Para este procedimiento se usó papaína, una endopeptidasa no-específica que rompe enlaces tiol, inmovilizada en una resina de agarosa. Usar una enzima inmovilizada ofrece ventajas ya que la reacción de digestión se puede parar inmediatamente simplemente separando la muestra de la columna con la resina. De este modo también se obtiene una solución con la muestra digerida libre de enzimas. La digestión con papaína produce tres fragmentos de una molécula de IgG, dos fragmentos Fab y un Fc (**Figura 11**).

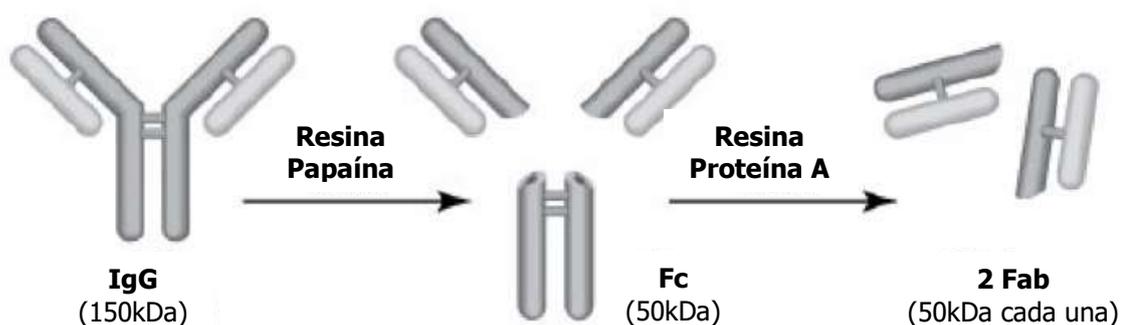


Figura 11. Representación gráfica del resultado al digerir con papaína un anticuerpo. Fuente: INSTRUCTIONS Pierce™ Fab Preparation Kit, Number 44985, Thermo Scientific.

La muestra digerida se purificó mediante columnas con proteína A inmovilizada. La proteína A tiene la capacidad de unir la región Fc de IgGs. Por lo tanto, permite separar la fracción Fab de las fracciones Fc y posibles restos de anticuerpos no digeridos de omalizumab. Se evaluó la eficiencia de la digestión y purificación mediante un gel SDS-PAGE al 12% (**Figura 12**).

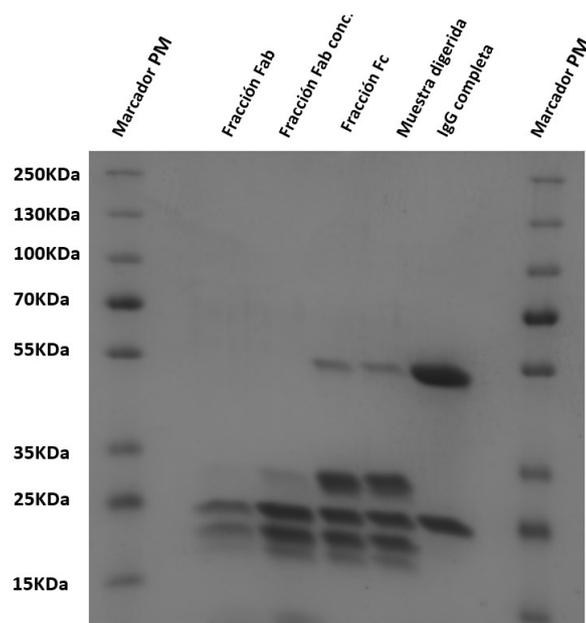


Figura 12. Imagen del gel SDS-PAGE 12% reductor para evaluar la eficiencia de la digestión y purificación. Se puede observar como las fracciones Fab no tienen la banda correspondiente a la cadena pesada, indicador que la digestión y purificación ha sido eficaz. KDa (Kilodalton), PM (Peso molecular).

El kit utilizado para obtener estos fragmentos proporciona la fracción deseada con un alto porcentaje de pureza, pero, con el fin de maximizarla, se sometió la muestra con Fab a un proceso cromatográfico. Se usó una cromatografía gel filtración que separa la mezcla de moléculas de la muestra según tamaño. Se usó un equipo de cromatografía ÄKTA™ pure (GE Healthcare, Chicago, IL, EEUU) y una columna ProSEC 16/60 6-600 HR SEC Column. En la **Figura 13A** se puede observar el cromatograma resultante. El pico con el volumen de elución a 70mL se corresponde con la fracción Fab. Los demás picos corresponden a impurezas, proteínas de menor peso molecular. Todas las fracciones

correspondientes al pico (fracciones de la 22 a la 32) se mezclaron y concentraron. Previamente se determinó su pureza con otro gel. En la **Figura 13B**, se puede ver la pureza de las muestras.

A partir de la muestra de Fab purificada y la muestra con Fc, se pusieron placas de cristalización. Rápidamente, se obtuvieron cristales en todas las placas para las dos fracciones. Los mejores cristales obtenidos en estas últimas placas se recolectaron y se evaluaron bajo el haz de luz sincrotrón.

El análisis de todos los cristales reveló dos estructuras cristalinas, una forma ortorrómbica (OF) y una monoclinica (MF). El refinamiento de las dos estructuras obtenidas, OF (celda cristalina P212121) y MF (celda cristalina P21), reveló que ambas provenían de cristales de fragmentos Fab, no se encontró ningún cristal de la fracción Fc, como era esperable puesto que el kit de fragmentación permite la obtención de fragmentos Fab, no Fc. Como fuente de Fc se usó la fracción eluida al regenerar las columnas de proteína A sin ningún tratamiento posterior. Basándonos en los resultados obtenidos se determinó que la muestra Fc no estaba pura, contenía también impurezas de fracciones Fab que fue lo que cristalizó en las placas. Para obtener una muestra con la que poner gotas de cristalización con únicamente Fc se necesitarían pasos adicionales de purificación.

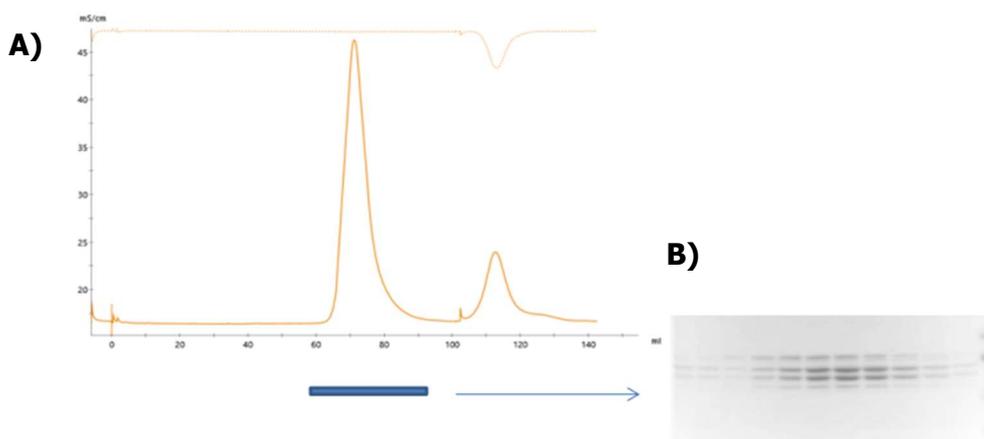


Figura 13. Purificación de la fracción Fab. (a) Imagen del cromatograma resultante de la separación por gel filtración de la muestra eluida con los fragmentos Fab. (b) Al lado imagen del SDS-PAGE al 12% de todas las fracciones unidas.

La estructura OF (P212121) (**Figura 14** y **Tabla 74** del **Anexo 3. Estadísticas de la colección de los cristales de Fab**) es equivalente a las descritas previamente en *Jensen, R.K. et al. 2015* (64) (código PDB¹² 4X7S), *Wright, J.D. et al. 2015* (65) (código PDB 2XA8) y *Mitropoulou, A.N. et al. 2020* (66) (código PDB 6TCM). Nuestros resultados ofrecen una mayor resolución de la estructura de la fracción Fab que los datos publicados (1.98Å). Disponer de una técnica con una elevada resolución es de particular interés en ejercicios de comparación en los que se busca una especial sensibilidad. En esta estructura OF se visualiza la cadena ligera completa (aminoácidos visualizados: D1-E217) con una muy buena densidad de ajuste. En cambio, en la cadena pesada se visualizaron los fragmentos (E1-S135 y G141-K222), únicamente con

¹² PDB: Base de datos de estructuras proteicas (Protein Data Bank).

poca densidad entre los aminoácidos K55 y G66. Al comparar con todas las estructuras publicadas la zona de peor resolución coincide con la obtenida en nuestro caso (K55-G66) y la región no visualizada (S135-G141) tampoco se visualiza en ninguna publicación. Esto refleja probablemente que esos aminoácidos tienen movilidad y eso motiva que no se detecten. Además de la estructura, también se modelaron 8 iones sulfato y 1 glicerol dentro de la estructura.

Por otro lado, para la estructura MF (**Figura 15** y **Tabla 75** del **Anexo 3. Estadísticas de la colección de los cristales de Fab**) no se han encontrado estructuras publicadas parecidas. Esta estructura presenta una mayor resolución (1.90Å) con un buen alineamiento. Presenta 2 regiones Fab (2 cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras) por ASU¹³ en lugar de una sola región Fab (1 cadena pesada y 1 ligera) encontrada en la estructura previa OF. Para la MF se visualizan las dos cadenas ligeras por completo (D1-E217) con una muy buena densidad de ajuste. Para las dos cadenas pesadas, se visualizaron los fragmentos (E1-S135 y G141-K222) con alta densidad y solamente con una baja densidad entre los aminoácidos K55 y G66. Únicamente la región (S135-G141) no se puede visualizar. Estos resultados son idénticos a los encontrados para la estructura OF. Además de la estructura proteica, también se modelaron 3 iones sulfato, 1 acetato y 1 glicerol dentro de la estructura.

Estos resultados, aunque preliminares, tienen mucha relevancia. Se ha establecido un protocolo que nos permite estudiar la estructura, por ahora, del dominio Fab de omalizumab. Se espera que el análisis de estos cristales proporcione resultados reproducibles, robustos y sensibles para la fracción Fab.

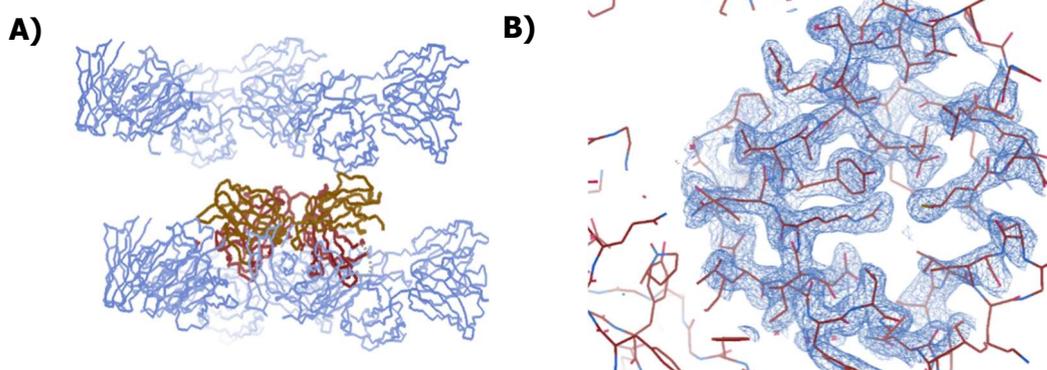


Figura 14. Empaquetado observado en la estructura cristalina OF. **(a)** En rojo y marrón se representan cada una de las cadenas (cadena ligera y fragmento Fab de la cadena pesada) de la unidad asimétrica. **(b)** Imagen detallando la densidad electrónica de esta estructura cristalina. Se consigue una mejor resolución que en cualquier otra estructura publicada de la misma fracción proteica.

¹³ ASU: Unidad asimétrica. Parte mínima de menor volumen que contiene toda la información estructural (distribución de átomos y del espacio que le rodea) y toda la información de simetría del cristal (planos, ejes, centros de inversión, deslizamientos) y que reproduce a este por traslación repetida en las direcciones y longitudes de las aristas de la celda.

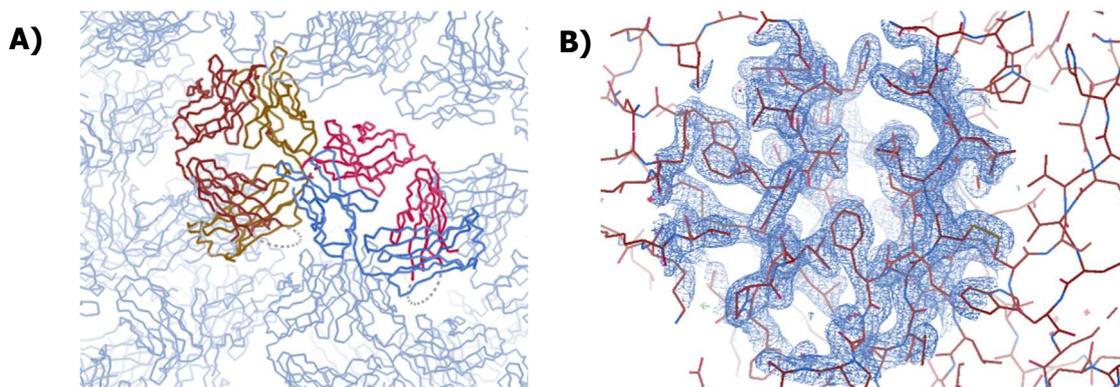


Figura 15. Empaquetado observado en la estructura cristalina MF. **(a)** El empaquetado en esta estructura es mucho mejor que en la estructura OF, no se observan tantos espacios vacíos intramoleculares. En este caso la unidad asimétrica es el conjunto de dos fracciones Fab. En rojo y marrón se representan cada una de las cadenas (cadena ligera y fragmento Fab de la cadena pesada) de una Fab de la unidad asimétrica y en azul y roja el de la otra. **(b)** Imagen detallando la densidad electrónica de esta estructura cristalina. Se consigue una resolución muy buena con una alta densidad para la mayoría de la estructura.

4.1.4. Conclusiones

Las conclusiones del Sub-proyecto 1 son:

- Proteínas con diverso grado de analogía a omalizumab del producto original son idóneas para la puesta a punto y validación de técnicas analíticas de comparabilidad estructural y funcional aplicables a: **(1)** la comparación entre lotes de Xolair®, **(2)** la comparación entre versiones de omalizumab (idéntica secuencia primaria): versiones tras cambio en proceso o candidatos a biosimilar producidas en otro sistema de expresión (células HEK-293), y **(3)** la comparación entre proteínas distintas con misma función que omalizumab o variante (cambio en 3 aminoácidos y producido en células HEK-293).
- La técnica de secuenciación *de novo* es idónea para comparar con garantías la secuencia primaria con el fin de analizar un candidato a biosimilar de omalizumab (e.g. en el PPB) u otros objetivos, mientras que la técnica de PMF no proporciona la estructura primaria completa.
- Con el fin de pre-analizar el grado de analogía molecular entre versiones o variantes de omalizumab, un análisis exhaustivo del patrón de glicosilación es clave para discriminar entre leves diferencias cualitativas y cuantitativas en los *N*-glicanos. Entre lotes de Xolair® con fechas de producción distanciadas se observaron únicamente diferencias cuantitativas. Entre las versiones las diferencias fueron además cualitativas. La metodología de caracterización de los glicanos utilizada es ideal para comparar perfiles de glicosilación.
- La utilización de la radiación de la luz de sincrotrón para comparar la conformación nanomolecular de versiones y variantes permitirá la identificación de diferencias menores. En razón de la flexibilidad de omalizumab, la obtención de cristales de calidad analizables solo es posible si se fragmenta el anticuerpo. Se ha logrado diseñar un protocolo de cristalización que permite determinar la estructura del fragmento Fab con una resolución de menos de 2Å (1.90-1.98Å).

**Desarrollo de
una metodología
para comparar la
actividad
biológica de
versiones/variant
es de omalizumab
(Objetivo 2)**

42



4.2. SUB-PROYECTO 2: Desarrollo de una metodología para comparar la actividad biológica de versiones/variantes de omalizumab (Objetivo 2).

4.2.1. Introducción: planteamiento experimental

El Sub-proyecto 2 se alinea con el Objetivo Específico 2. Para demostrar biosimilaridad las agencias regulatorias solicitan, además de un estudio exhaustivo comparado de los atributos fisicoquímicos, la realización de estudios comparados funcionales o de actividad biológica. La comparación de la actividad biológica mediante ensayos no clínicos debe abordarse caso por caso en función del conocimiento que se tenga del mecanismo de acción del producto original. Si bien en la eficacia terapéutica de un anticuerpo monoclonal concurren diversos factores atribuibles al medicamento y a otras causas, el conocimiento del mecanismo de acción y la posibilidad de compararlo analíticamente anticipa, en cierta medida, su eficacia clínica. En esencia, la comparabilidad analítica de la actividad biológica permite establecer el grado de igualdad funcional entre proteínas terapéuticas análogas que puedan diferenciarse levemente en atributos fisicoquímicos. Por eso, a este apartado del ejercicio de comparabilidad se le da cada vez más importancia en la demostración de biosimilaridad.

Existen diversidad de pruebas de análisis funcional. Cualquier ensayo empleado para evaluar la actividad biológica comparada de un fármaco debe ser específico y capaz de discriminar entre moléculas con variaciones que pudieran traducirse en diferencias clínicas. Esa capacidad dependerá del conocimiento que se tenga del mecanismo de acción terapéutica.

La EMA plantea que el desarrollo de los estudios funcionales no-clínicos debe seguir una aproximación sistemática paso por paso (67). Siguiendo esas directrices, en el caso de las versiones y variantes de omalizumab cuya actividad terapéutica es la unión y neutralización de IgE vía Fab, se propusieron los siguientes estudios comparativos: **(a)** estudio de capacidad de unión de las versiones/variantes a la IgE mediante SPR, **(b)** evaluación de la actividad biológica mediante un ensayo celular, y **(c)** valoración comparada en un modelo *in vivo* transgénico que expresa el receptor humano para la IgE.

En este Sub-proyecto se plantea determinar si las técnicas de análisis funcional propuestas permiten discriminar la actividad de las versiones y variante de omalizumab y, por lo tanto, son aptas para la evaluación comparada funcional de candidatos a biosimilar u otras aplicaciones.

En el marco del **Objetivo 2**: “Desarrollar una metodología para comparar la actividad biológica de versiones/variantes de omalizumab” se diseñaron 3 grupos de experimentos.

- **Estudio 2.1:** *Puesta a punto de la técnica Surface Plasmon Resonance (SPR) para determinar la capacidad de unión omalizumab-IgE humana en distintas versiones y evaluación de su capacidad discriminadora.*

La tecnología SPR permite estudiar la interacción entre omalizumab y su diana, la inmunoglobulina E humana (hIgE). Se optimizó un procedimiento experimental específico que maximizara la sensibilidad de la técnica. Una vez desarrollado, se analizaron y compararon entre sí las diferentes versiones y variantes de omalizumab junto a diferentes lotes comercializados de Xolair®. Este análisis se llevó a cabo para determinar la sensibilidad de la técnica de SPR y así demostrar su idoneidad en un ejercicio de comparabilidad.

- **Estudio 2.2:** *Comparación de la actividad biológica in vitro de versiones/variantes de omalizumab mediante el ensayo de liberación de β -hexosaminidasa de mastocitos.*

Se estudió la adecuación del ensayo celular de liberación de β -hexosaminidasa en la evaluación de la actividad biológica comparada de omalizumab y sus versiones/variantes. Los ensayos celulares *in vitro* pueden reflejar con mayor fidelidad la actividad *in vivo* del fármaco, pero, por otro lado, pueden resultar poco sensibles en un ejercicio de comparabilidad teniendo en cuenta el nivel de exigencia regulatoria de la EMA. Sin embargo, el abordaje está justificado porque caracterizar funcionalmente mediante técnicas distintas como son SPR y el ensayo *in vitro* (abordaje ortogonal) pudiera permitir afinar en una conclusión de esencial igualdad. Si se observa correlación en los resultados de ambos abordajes, se demostrará que ambas son suficientemente específicas y sensibles.

- **Estudio 2.3:** *Comparación de la actividad biológica de versiones/variantes de omalizumab in vivo mediante un modelo de anafilaxia (PCA) en ratón transgénico.*

Por lo general, las técnicas *in vivo* no son ideales para la comparación de un candidato a biosimilar con su producto de referencia, bien porque no se disponga de modelos aptos para el análisis de proteínas terapéuticas dirigidas contra dianas humanas, o porque su capacidad discriminadora suele ser baja debido a la elevada variabilidad inter-sujeto (67). A pesar de ello planteamos la conveniencia de comprobar si en el caso de omalizumab y sus análogos, la utilización de un modelo transgénico permitiría substanciar diferencias (e incluso posible toxicidad derivada del efecto del fármaco). Se planteó un modelo para comparar la actividad biológica de omalizumab *in vivo*, el modelo de Anafilaxia Cutánea Pasiva (PCA). Empleando una cepa de ratón transgénico que expresa el receptor humano de IgE es posible estudiar reacciones inmunológicas mediadas por IgE.

Por lo tanto, en el Sub-proyecto 2 se propuso evaluar la idoneidad de técnicas de análisis funcional en la comparación de la actividad biológica de omalizumab original y de las moléculas análogas producidas y caracterizadas en el contexto del Sub-proyecto 1. A continuación, se describen los estudios de SPR, *in vitro* e *in vivo*, y se discuten los resultados.

4.2.2. Material y métodos

En esta sección se describen con detalle las técnicas empleadas en la ejecución de cada estudio.

- a) Estudio 2.1: Puesta a punto de la técnica *Surface Plasmon Resonance* (SPR) para determinar la capacidad de unión omalizumab-IgE humana en distintas versiones y evaluación de su capacidad discriminadora (Sub-objetivo 2.1)

- **Muestras analizadas**

En este Estudio se analizaron 3 lotes de Xolair®, 2 lotes de la versión veOMA y 2 de la variante de vaOMA. En la **Tabla 20** se muestran los detalles de las muestras analizadas.

Tabla 20. Muestras empleadas en el análisis y comparación de la capacidad de unión de moléculas análogas con función anti-IgE humana mediante SPR.

Versión/variante	Lote	Fecha caducidad
Xolair® - Lote 1	S010203	12/2017
Xolair® - Lote 2	AVXS011303	03/2019
Xolair® - Lote 3	AVXS223003	03/2019
Versión (veOMA)	Lote 1 y 2	NA
Variante (vaOMA)	Lote 1 y 2	NA

NA: No aplica.

- ***Surface plasmon Resonance* (SPR)**

Para los estudios de unión con la tecnología SPR de Biacore se utilizó un biosensor óptico Biacore™ T-200 (GE Healthcare, Chicago, IL, EEUU) (68) controlado mediante el programa “Biacore T-200 Control Software” (69) de la Unidad de Citometría del CCiT-UB (Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona). Todos los análisis de la técnica SPR fueron realizados y analizados siguiendo las recomendaciones del fabricante (70,71).

Preparación de la muestra

Para evitar desviaciones artefactuales todas las muestras analizadas mediante Biacore se pretrataron para ser evaluadas bajo las mismas condiciones. Se purificaron por afinidad (columna HiTrap Protein A HP de 1mL) con el equipo FPLC AKTApure siguiendo el protocolo de purificación recomendado por la casa comercial GE Healthcare (72). El resultado de la purificación se evaluó en un gel SDS-PAGE al 12% y las fracciones de interés se dializaron en el buffer para su análisis (PBS). Finalmente se midió la concentración de las muestras dializadas por Nanodrop™ y se les añadió PBS hasta alcanzar una concentración de 1mg/mL. En todo momento se siguieron las normas de almacenaje que recomiendan los proveedores y durante el experimento todas las muestras se mantuvieron en hielo.

Procedimiento experimental

Antes de utilizarse, todos los chips se condicionaron lavándolos tres veces a un flujo alto de 100µL/min con una solución al 0.1M Glicina +0.3% Triton x100 a pH 12. Posteriormente se normalizaron pasando glicerol, tal y como se indica en el *User Manual of Biacore T—200- Getting Started for the Chip1* (70).

Las moléculas empleadas como ligando se inmovilizaron covalentemente en chips C1 (Serie S) (GE Healthcare, Chicago, IL, EEUU) mediante acoplamiento de aminas siguiendo el procedimiento descrito por el kit. En todos los canales de los chips se procuró inmovilizar la misma cantidad de proteína. Para la inmovilización se diluyeron las muestras a una proporción 1:100 en una solución de acetato sódico al 10mM a pH 4.5 y se circularon a través del chip a un flujo constante de 5µL/min para que se acoplaran.

- **Ligandos:** En el primer canal de todos los chips se inmovilizó siempre como referencia la IgG humana (Abcam, Cambridge, UK). La señal de este canal se restaba a la señal de las moléculas evaluadas.
- **Analitos:** Las muestras se diluyeron de forma seriada y se inyectaron en el chip con los ligandos inmovilizados.

El diseño experimental final de comparación de las moléculas análogas a omalizumab se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: temperatura de 25°C, tiempo de asociación y disociación de 240s y concentraciones del analito de 0.47nM a 30nM. El paso de regeneración se llevó a cabo con glicina 0.1M con el 0.3% de tritón y pH 12.0.

Normalización de los datos

Para medir la capacidad de unión (cinética y afinidad) el equipo Biacore T-200 detecta la masa acumulada en el chip y reporta la señal como respuesta de unión, que es directamente proporcional a la masa unida al chip. Las constantes cinéticas (k_a y k_d), la constante de afinidad K_D y el valor del porcentaje de similitud se calcularon a partir de los sensorgramas usando el software “BIA Evaluation software” (GE Healthcare Life Science) con un modelo de unión univalente.

Para minimizar variaciones inter-ensayo, las constantes de todas las muestras se normalizaron con un estándar interno que se evaluó en todos los chips. La fórmula utilizada se puede ver a continuación:

$$Valor_{Normalizado} = Valor_{(Chip\ a\ normalizar)} \times \frac{Media\ Valores\ STD\ interno\ (Chip\ Referencia)}{Media\ Valores\ STD\ interno\ (Chip\ a\ normalizar)}$$

- **Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos se compararon estadísticamente mediante la prueba TOST con la herramienta de Excel QI Macros versión 2020.07 (KnowWare International, Inc., Denver, CO, EEUU) aplicando los límites habituales para criterios de bioequivalencia (0.8-1.25), aceptando unos intervalos de confianza

del 90% (73–77). El ensayo de similitud se realizó con el software BIA Evaluation (GE Healthcare Life Science, Chicago, IL, EEUU). Las representaciones gráficas de los resultados, tanto en gráfica de puntos como en diagrama de barras, recogen la media y el error estándar de la media de todos los valores obtenidos.

- **Material y reactivos**

En la **Tabla 21** y **Tabla 22** se recogen los equipos, materiales y reactivos utilizados para la técnica SPR.

Tabla 21. Equipos y softwares utilizados para la técnica de SPR (Biacore™).

Producto	Descripción	Casa Comercial	Referencia
Equipos	Biacore™ T200	GE Healthcare	NA
Software	Biacore T200 Evaluation Software	GE Healthcare	NA
	Biacore T200 Kinetics Summary	GE Healthcare	NA

NA: No aplica.

Tabla 22. Lista de reactivos y materiales utilizados para la técnica de SPR (Biacore™).

Reactivos/Materiales	Casa Comercial	Referencia
Ácido Clorhídrico (HCl)	Sigma-Aldrich	H1758
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	Sigma-Aldrich	EDS
Cloruro sódico (NaCl)	Sigma-Aldrich	S7653
Etanolamina	Sigma-Aldrich	411000
Glicina	Acros Organics	120072500
Glicerol	Sigma-Aldrich	G6279
HEPES	Sigma-Aldrich	H3375
IgE humana (hIgE)	Abcam	Ab65866
IgG1 humana (hIgG)	Abcam	Ab90286
Kit de unión por aminas	GE Healthcare	BR-1006-68
PBS	Sigma-Aldrich	P3813
Polisorbato 20 (Tween20)	Sigma-Aldrich	P7949
Series S Sensor Chip C1	GE Healthcare	29104944
Tapones para viales	GE Healthcare	BR.1005-02
Triton X-100	Panreac	142314.1611
Tubos de diálisis con membrana de celulosa – 10mm de diámetro	Sigma-Aldrich	D9277
Viales de plástico	GE Healthcare	BR-1002-12

- b) Estudio 2.2: Comparación de la actividad biológica *in vitro* de versiones/variantes de omalizumab mediante el ensayo de liberación de β -hexosaminidasa de mastocitos (Sub-objetivo 2.2).

- Muestras analizadas

En este Estudio se analizaron 4 lotes de Xolair®, 1 lote de la versión veOMA y 2 de la variante de omalizumab vaOMA. En la **Tabla 23** se reflejan los detalles de todas las muestras analizadas.

Tabla 23. Muestras empleadas en el análisis y comparación de la actividad biológica *in vitro*.

Versión/variante	Lote	Fecha caducidad
Xolair® - Lote 1	S010203	12/2017
Xolair® - Lote 2	AVXS011303	03/2019
Xolair® - Lote 3	AVXS223003	03/2019
Xolair® - Lote 4	AVXS011405	04/2019
Versión (veOMA)	Lote 1	NA
Variante (vaOMA)	Lote 1 y 2	NA

NA: No aplica.

- Sistemas celulares

La idoneidad del ensayo de liberación de β -hexosaminidasa para evaluar la actividad biológica se estudió comparando las moléculas análogas de omalizumab usando dos líneas celulares: una línea de mastocitos humanos, LAD2, y otra de basófilos de ratón, RS-ATL8 que expresa el receptor de IgE humana. Ambas poblaciones celulares se activan vía IgE humana por reconocimiento de los receptores Fc ϵ RI humanos. Omalizumab impide que la IgE se una a los receptores Fc ϵ RI, evitando que ambas poblaciones celulares se activen y liberen sus mediadores.

Línea celular LAD2:

Línea celular de mastocitos humanos derivados de un paciente con mastocitosis no tratada (*human leukemic mast cell line*) (78). Esta línea celular fue cedida a nuestro laboratorio por los Dres. Arnold Kirshernbaum y Dean Metcalfe del NIAD-NIH (*National Institute of Allergy and Infectious Diseases / National Institute of Health*).

Línea celular RS-ATL8:

Línea celular basofílica leucémica humanizada de rata que expresa el receptor humano Fc ϵ RI. Procede de basófilos de rata, pero fenotípicamente reproduce las características de los mastocitos. Fue establecida por el grupo de investigación del Dr. Ryosuke Nakamura del NIHS (*National Institute of Health Sciences*)

que integró el gen de la NFAT-Luciferasa (gen de la luciferasa regulado por NFAT¹⁴) al genoma de células RBL-SX38 (*rat basophilic leukemia cells*) y que nos cedió para nuestros estudios (79–81).

- **Mantenimiento cultivos celulares**

El mantenimiento de las dos líneas celulares usadas en este Estudio 2.2 se detalla a continuación.

Mantenimiento cultivos LAD2:

Estos mastocitos humanos se cultivan en medio Stem Pro-34 suplementado con Stem-Pro Nutrient, Penicilina (100U/mL), Streptomycin (100µg/mL), Glutamina (2mM) y SCF humano (100ng/mL) (78,82). Para su cultivo se usan T-Flask específicos para células en suspensión y se mantienen sin agitación en una incubadora a 37°C en un ambiente húmedo con un 5% de CO₂. En condiciones óptimas estas células se duplican semanalmente. En cultivo no deben superar una concentración de 0.5·10⁶células/mL ya que una concentración superior puede provocar la pérdida de propiedades. Por estos motivos semanalmente se cambia el medio de cultivo ajustando la concentración celular a 0.2·10⁶células/mL. Las células LAD2 requieren de metabolitos de desecho propios secretados en el medio para crecer. Por consiguiente, al hacer el cambio de medio se debe primero eliminar la mitad del medio de cultivo en uso y reemplazarlo por la misma cantidad de medio nuevo precalentado a 37°C (hemidepleción). Antes de manipular las células se golpea suavemente el frasco de cultivo para levantar las células que se hayan podido adherir al fondo. Si es necesario centrifugarlas se debe hacer a 250g durante 5 minutos a RT. Las células LAD2 son muy sensibles, fácilmente se lisan por choque osmótico, la manipulación tiene que ser mínima y cuidadosa.

Mantenimiento cultivos RS-ATL8:

Las células RS-ATL8 crecen adheridas. Por lo tanto, requieren de frascos de cultivo específicos para este tipo celular. Para su cultivo se mantienen sin agitación en un incubador en ambiente húmedo a 37°C y con un 5% de CO₂. El medio utilizado para su mantenimiento es el siguiente: MEM con GlutaMax y suplementado con 10% de FBS (previamente inactivado a 56°C durante 30 minutos), 1% de Penicilina/Estreptomycin, 0.5mg/mL de Geneticina y 0.2mg/mL de Higromicina B. Este medio debe reemplazarse por completo cada 3-4 días. Para el cambio de medio se retira del frasco todo el medio. Se realizan dos lavados con PBS para contribuir a debilitar la adherencia de las células y se añaden 1-2mL de tripsina-EDTA al 0.05%. Una vez se desadhieren las células se añade medio con FBS para inhibir la tripsina. Se coge la cantidad de células deseada, se centrifugan a 250g durante 5 minutos a RT y se elimina

¹⁴ **NFAT**: Factor Nuclear Activador de células T; Familia de factores de transcripción de gran importancia en el sistema inmune. Estos factores de transcripción están involucrados en muchos procesos normales del cuerpo pero también en muchas enfermedades inflamatorias y cáncer.

el sobrenadante. A continuación, se añade el medio necesario y se traspasa la suspensión a un nuevo frasco de cultivo.

- **Ensayo de actividad mastocitaria: liberación de β -hexosaminidasa de mastocitos**

A continuación, se detalla la metodología del ensayo utilizado para medir la actividad biológica *in vitro*, la técnica de liberación de β -hexosaminidasa, para cada línea celular.

Ensayo liberación de β -hexosaminidasa en mastocitos LAD2:

Para realizar el ensayo primero se debe cambiar el medio de las células a uno que carezca de factores de crecimiento (sin SCF) para detener el crecimiento y controlar la densidad celular. Una vez se ha atemperado el cultivo se pre-incuban durante 15min a 37°C y al 5% de CO₂ con omalizumab o vehículo (PBS). Posteriormente se sensibilizan con 100ng/mL de IgE conjugada a biotina y se vuelven a incubar en las mismas condiciones durante 16 horas. Al día siguiente se lavan 3 veces con “*buffer release*” previamente atemperado a 37°C (**Tabla 24**). Inmediatamente después se traspasan a una placa de 96 pozos en forma de U. A cada pocillo se transfieren unas 20,000 células en un volumen de 95 μ L. Cada condición experimental estudiada se repite por cuadruplicado en una misma placa. Tras atemperar 15 minutos se estimulan los mastocitos con 100ng/mL del antígeno específico estraptavidina diluido en PBS durante 45 minutos a 37°C con 5% v/v de CO₂. Al añadir el antígeno el volumen final de cada pocillo tiene que ser de 100 μ L. Una vez se detiene la actividad mastocitaria por frío se centrifugan las placas a 250g durante 10 min a 4°C. Se recogen 50 μ L de los sobrenadantes en una placa de lectura. Los pellets de las células se lisan mecánicamente homogeneizándolos con 150 μ L de agua destilada y sometidos a dos ciclos de 10 minutos de congelación a -80°C y 10 minutos de descongelación a 37°C. Los lisados también se recogen (50 μ L) en otra placa de lectura.

Ensayo liberación de β -hexosaminidasa en RS-ATL8:

Dos días antes del ensayo se traspasan 0.5·10⁵células en 100 μ L por pocillo a placas de cultivos de 96 pocillos. Se mantiene el cultivo en incubación a 37°C y con un 5% de CO₂ durante aproximadamente 36 horas. Para empezar el ensayo se añade omalizumab o vehículo a los pocillos. Pasados 15 minutos de incubación se sensibilizan añadiendo 500ng/mL de IgE biotinilada. Al administrar esta inmunoglobulina, los cultivos se deben mantener en incubación durante toda la noche (ON). Tras la incubación se hacen tres lavados con “*buffer release*” para eliminar el exceso de IgE. Es importante que tras el último lavado en todos los pocillos quede un volumen de 95 μ L. Entonces, las células se estimulan añadiendo 100ng en 5 μ L de estraptavidina. Se mantienen los cultivos durante 45 minutos a 37°C y al 5% de CO₂ hasta que la reacción se detiene en frío. En una placa de lectura se recogen 50 μ L de sobrenadantes. A los pellets se les añade 150 μ L de agua con alcohol al 70% para lisarlos manualmente. Además, se someten a dos ciclos de 10 minutos de congelación a -80°C y 10 minutos de descongelación a 37°C. Los lisados también se recogen (50 μ L) en otra placa de lectura.

Tabla 24. Detalles del tampón “Buffer reléase” para el ensayo de desgranulación mastocitaria. Se indican la cantidad a añadir en 1 litro de agua ultrapura y la molaridad resultante. Al acabar de preparar la solución se filtra (0.22µm) bajo campana estéril y se mantiene a 4°C.

Producto	Cantidad	Molaridad (mM)
Tampón HEPES (1M)	10.00mL	10.0
Cloruro sódico (NaCl)	8.000g	137.0
Cloruro potásico (KCl)	0.200g	2.7
Fosfato disódico heptahidratado (Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O)	0.103g	0.4
Glucosa	1.008g	5.6
Cloruro de calcio dihidratado (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	0.265g	1.8
Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.320g	1.3

Una vez finalizada la estimulación para ambas líneas celulares se analiza la concentración de β-hexosaminidasa mediante un ensayo fluorométrico usando 100µL/pocillo de PNAG (P-nitrofenil N-acetil-β-D-glucosamida) al 3.5mg/mL como sustrato disuelto en tampón citrato (Tabla 25). La reacción enzimática se para a los 90 minutos con 50µL de glicina (Tabla 26). Tras detener las reacciones se leen a una longitud de onda de 405nm con un filtro de referencia a 620nm usando un espectrofotómetro SPARK® 10M (Tecan, Männerdorf, Suiza). Cada pocillo se mide dos veces y la media se utiliza para analizar los porcentajes de liberación o inhibición mastocitaria.

Tabla 25. Composición de la preparación del tampón citrato con el que se disuelve el PNAG para el ensayo de desgranulación mastocitaria. Cantidades para diluir en 200mL de agua ultrapura. La solución resultante se ajusta a pH 4.5 con NaOH al 5M, se filtra estérilmente y se almacena a 4°C.

Producto	Cantidad (g)	Molaridad (mM)
Ácido cítrico	1.681	40
Fosfato disódico heptahidratado (Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O)	1.070	20

Tabla 26. Cantidades para preparar Glicina al 400mM para el ensayo de desgranulación mastocitaria. Una vez pesada la glicina se añade a 500mL de agua ultrapura, se ajusta el pH a 10.7 con NaOH (5M), se esteriliza la solución y se almacena a RT.

Producto	Cantidad (g)	Molaridad (mM)
Glicina	15.10	400

La desgranulación mastocitaria en las diferentes condiciones experimentales se representa mediante el porcentaje de liberación de β-hexosaminidasa teniendo en cuenta las absorbancias (OD¹⁵) de los lisados celulares y sobrenadantes (83).

¹⁵ OD: Densidad óptica.

$$\% \text{liberación } \beta - \text{hexosaminidasa} = 100 \times \frac{OD_{\text{Sobrenadante}}}{OD_{\text{Total}}}$$

Siendo “ $OD_{\text{Total}} = OD_{\text{Sobrenadante}} + OD_{\text{Lisado Celular}}$ ”

Sin embargo, en el ensayo solo se lee la mitad del sobrenadante total (50µL de los 100 µL. totales que hay por condición) y los blancos se tienen que tener en cuenta. Todo esto se traduce en:

$$OD_{\text{Sobrenadante}} = 2 \times (OD_{\text{SN}} - OD_{\text{Blancos SN}})$$

Siendo “ $OD_{\text{SN}} = \text{Densidad óptica real leída de los sobrenadantes}$ ” y “ $OD_{\text{Blancos SN}} = \text{Densidad óptica media de los blancos de la placa de sobrenadantes}$ ”

De la misma manera, solo se analiza ¼ del lisado del pellet que aún contiene la otra mitad del sobrenadante. A los 50µL restantes de sobrenadante se les añade 150µL de agua destilada para lisar las células. De estos 200µL se utilizan 50µL para la placa de pellets.

$$\begin{aligned} OD_{\text{Total}} &= OD_{\text{Sobrenadante}} + OD_{\text{Lisado Celular}} = \\ &= \frac{1}{2} \times OD_{\text{Sobrenadante}} + 4 \times (OD_{\text{LC}} - OD_{\text{Blancos LC}}) = \\ &= (OD_{\text{SN}} - OD_{\text{Blancos SN}}) + 4 \times (OD_{\text{LC}} - OD_{\text{Blancos LC}}) \end{aligned}$$

Siendo “ $OD_{\text{LC}} = \text{Densidad óptica real leída de los lisados celulares}$ ” y “ $OD_{\text{Blancos LC}} = \text{Densidad óptica media de los blancos de la placa de lisados celulares}$ ”

Por lo tanto, la fórmula final utilizada para calcular los porcentajes de liberación del mediador β -hexosaminidasa es la siguiente:

$$\% \text{lib. } \beta\text{-hexo.} = 100 \times \frac{2 \times (OD_{\text{SN}} - OD_{\text{Blancos SN}})}{((OD_{\text{SN}} - OD_{\text{Blancos SN}}) + 4 \times (OD_{\text{LC}} - OD_{\text{Blancos LC}}))}$$

Asimismo, se calcularon los porcentajes de inhibición de las moléculas de omalizumab respecto a la condición del control positivo (IgE⁺/Antígeno⁺) sustrayendo los porcentajes de las condiciones de liberación basal de los controles negativos (IgE⁻/Antígeno⁻; IgE⁺/Antígeno⁻; IgE⁻/Antígeno⁺).

$$\% \text{inhibición} = 100 - \frac{(\% \text{liberación tratamiento} \times \% \text{liberación basal})}{(\% \text{liberación total} - \% \text{liberación basal})} \times 100$$

- **Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos se trataron estadísticamente mediante la prueba T-Student (*2-tailed Student's t test*) con el software Sigma-Plot versión 12.0 (Systat Software Inc., San José, CA, EEUU). Las diferencias se consideran estadísticamente significativas con una $p < 0.05$. Para comparar se usó el estadístico TOST

con la herramienta de Excel QI Macros versión 2020.07 (KnowWare International, Inc., Denver, CO, EEUU) aplicando los límites habituales para criterios de bioequivalencia (0.8-1.25), equivalentes a los intervalos de confianza de 90% (73–77). Todas las representaciones gráficas de resultados expresan la media y el error estándar de la media (SEM) de todos los valores obtenidos.

- **Material y reactivos**

A continuación, se listan todos los reactivos (**Tabla 27**) y equipos (**Tabla 26**) utilizados para llevar a cabo los ensayos celulares de liberación de β -hexosaminidasa. Todos los reactivos utilizados tanto para el mantenimiento de la línea celular como para la determinación de la actividad mastocitaria fueron de la pureza adecuada para su finalidad.

Tabla 27. Lista de reactivos del Estudio 2.2 del Sub-proyecto 2 (ensayo liberación de β -hexosaminidasa).

Reactivos	Casa Comercial	Referencia
Ácido Cítrico	Acros Organics	391971000
BSA (Albúmina sérica bovina)	Sigma-Aldrich	A9418
Cloruro de calcio dihidratado	Panreac Applichem	A4689
Cloruro potásico	Panreac Applichem	A2939
Cloruro sódico	Panreac Applichem	A2942
D-Glucosa	Panreac Applichem	A1422
Estreptavidina	Sigma-Aldrich	S0677
Glicina	Sigma Aldrich	G7126
Hidrógeno fosfato disódico heptahidratado	Panreac Applichem	131808.1210
Hidróxido de sodio	Sigma-Aldrich	S8263
IgE biotin	Abbotec	ABIN1583010
vaOMA	Absolute Antibody	Ab00874-10.17
veOMA	Absolute Antibody	Ab00874-10.17 v2
PBS (Solución salina tamponada con fosfato)	Sigma-Aldrich	P3813
PNAG (<i>p</i> -nitrofenil <i>N</i> -acetil- β - <i>D</i> -glucosamida)	Merk	487052
Sulfato de magnesio heptahidratado	Panreac Applichem	A6414
Tampón HEPES	Gibco	15630080
Xolair®	Novartis	NA
Reactivos del medio para las células LAD2		
Glutamina	Sigma-Aldrich	G7513
Human Stem Cell Factor (SCF)	MACS Miltenyi Biotec	130-093-991
Penicilina/Estreptomina (Pen/Strepto)	Sigma-Aldrich	P4333
StemPro-34	Gibco	10639-011
Reactivos del medio para las células RS-ATL8		
FBS (Suero Fetal Bovino)	Biowest	S1620-500

Geneticina	Biowest	L0015-020
Higromicina B	Sigma-Aldrich	H3274
MEM (Minimum Essential Medium) + GlutaMax	Thermo-Fisher	32561029
Penicilina/Estreptomicina (Pen/Strepto)	Sigma-Aldrich	P4333
Tripsina-EDTA 0.05%	Sigma-Aldrich	T3924

Tabla 28. Equipos utilizados en los ensayos celulares de liberación de β -hexosaminidasa, Estudio 2.2 del Sub-proyecto 2.

Descripción	Modelo	Casa comercial
Agitador	Mini-Shaker PSU-2T	Biosan
Baño	SUB-Aqua Pro	Grant
Cabina de flujo laminar	AV-100	Telstar
Centrífuga para eppendorfs	EBA 12R	Hettich Zentrifugen
Centrífuga para tubos y placas	5810 R	Eppendorf
Estufa de calentamiento	ICP 400	Memmert
Incubadores celulares	Autoflow Un-1750	NuAire
Lector de placas	Spark® 10M	Tecan
Lupa para cultivos	TELAVAL 31	Zeiss
Microscopio	Primo Star	Zeiss
Ultrasonidos	2510	Branson

- c) Estudio 2.3: Comparación de la actividad biológica de versiones/variantes de omalizumab *in vivo* mediante un modelo de anafilaxia (PCA) en ratón transgénico (Sub-objetivo 2.3).

- Muestras analizadas

En este Estudio se analizó 1 lote de cada producto. En la **Tabla 29** se muestran los detalles de las muestras analizadas.

Tabla 29. Muestras empleadas en el análisis de la actividad biológica mediante el modelo PCA.

Versión/variante	Lote	Fecha caducidad
Xolair® - Lote 4	AVXS011405	04/2019
Versión (veOMA)	Lote 2	NA
Variante (vaOMA)	Lote 2	NA

NA: No aplica.

- Animales de experimentación

Se usaron ratones transgénicos (FcεRI^{-/-} hFcεRI⁺) con fondo genético BALB/c que presentan una doble mutación, *knockouts*¹⁶ para el receptor murino de la IgE (FcεRI), y en su lugar expresan el receptor homólogo humano de alta afinidad de la IgE (FCER1A o hFcεRIα) (84) localizado principalmente en la superficie de mastocitos y basófilos, bajo el promotor humano de FCER1A con la mutación FcεR1a^{tm1Knt} (85–88). Estos ratones humanizados, hemisigotos para el transgén y homocigotos para la mutación diana (FcεRI⁻) se criaron en el Estabulario Central de la Universitat Autònoma de Barcelona a partir de dos pares de progenitores cedidos por el Dr. Jean-Pierre Kinet del Beth Israel Deaconess Medical Center de la Universidad de Harvard (Boston, MA, EEUU).

Los ratones se dividían en grupos aleatorios que incluían tanto machos como hembras de entre 8-15 semanas de edad y pesos de 20 y 40 gramos. Al tratarse de una colonia propia, la disponibilidad en animales estaba sujeta a la cría, motivo por el cual no todos los grupos se dividían exactamente en 50% machos y 50% hembras. Sin embargo, se procuró igualar al máximo el número de machos y hembras por grupo. Todos los animales fueron estabulados en grupos de 2-6 animales en racks ventilados Allentown Inc. (Allentown, NJ, EEUU). Cada rack contenía material de cama (Ecopure, Datesand, Manchester, UK), pienso en forma de pellets (Tecklad, Envigo, Cambridgeshire, UK) y agua *ad libitum*¹⁷. Las condiciones ambientales de la sala de estabulación se mantenían controladas y constantes: temperatura 20±1°C, humedad 60±10% y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas.

Para reducir el estrés de los animales durante el experimento, y consecuentemente, la alteración de los resultados, se estableció un período de adaptación de 1 semana antes del experimento que permitió la aclimatación de los ratones al bioterio y la habituación a la manipulación por parte del investigador.

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética para la Investigación Animal de la Universitat Autònoma de Barcelona (España). El desarrollo de este proyecto se realizó de acuerdo con la legislación española; Real Decreto 53/2013 relativo a la “Protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos”, y de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y el Consejo (89,90).

¹⁶ **Knockout** (o **KO**): animal modificado por ingeniería genética para que uno o más de sus genes estén inactivados y no se expresen.

¹⁷ **Ad libitum**: Expresión en latín que significa literalmente “a placer, a voluntad” que significa que tenían acceso al recurso cuando querían.

- Modelo de anafilaxia dependiente de mastocitos, PCA (Anafilaxia cutánea pasiva)

La PCA se indujo según lo descrito en 1985 por Z. Ovary *et al.* en ratas (91,92). Es una técnica bien conocida por nuestro grupo de investigación (93,94) que se utiliza para el estudio de procesos mediados por IgE o mastocitos (95–97).

La PCA se basa en sensibilizar de forma pasiva a los ratones administrándoles IgE específicas frente a un determinado antígeno. Las IgEs se fijarán a los receptores de alta afinidad FcεRI de los mastocitos y basófilos localizados en la zona administrada. Posteriormente, el antígeno reconocido por la IgE se administra por vía intravenosa (i.v.) junto con el colorante Evans Blue. Se desencadena una reacción inflamatoria en los animales mediada por mastocitos. La extravasación del colorante Evans Blue se utiliza como una medida indirecta de los cambios en la permeabilidad vascular inducidos por la liberación de sustancias vasoactivas por parte de mastocitos activados (98). Omalizumab, al tratarse de un fármaco anti-IgE, previene la activación mastocitaria evitando que las IgEs se unan a los MC y, por lo tanto, al administrar el antígeno la reacción inflamatoria debería ser menor. Se cuantifica la reacción y el grado de inhibición inducido por omalizumab.

Administración de la IgE y del antígeno específico

Antes de proceder con la sensibilización, se somete a los ratones a un proceso de sedación mediante anestesia con isoflurano. El tiempo de exposición a esta sedación es variable, de entre 2 a 5 minutos al 2-3% de isoflurano. Cuando el animal adquiere un plano anestésico adecuado se traspa a una camilla donde manteniéndolo bajo sedación se sensibiliza. En la oreja izquierda se inyectan intradérmicamente (i.d.) 20μL de una solución de IgE humana anti-NP quimérica preparada mediante dilución 1:1 de la solución de IgE madre con PBS hasta alcanzar una concentración aproximada de 15μg/mL (dosis de sensibilización de 300ng). A los animales pretratados con omalizumab, se les co-administra la IgE. En la oreja derecha se inyectan 20μL de suero fisiológico como control negativo. El antígeno (NP-BSA) se administra 24 horas post-sensibilización. Los ratones bajo plano anestésico se tratan mediante una inyección i.v. por el seno retro-orbital de 100μL de una dosis de 200μg del antígeno (NP-BSA) en PBS con un 1% de Evans Blue. Protocolo esquematizado en la **Figura 16**.

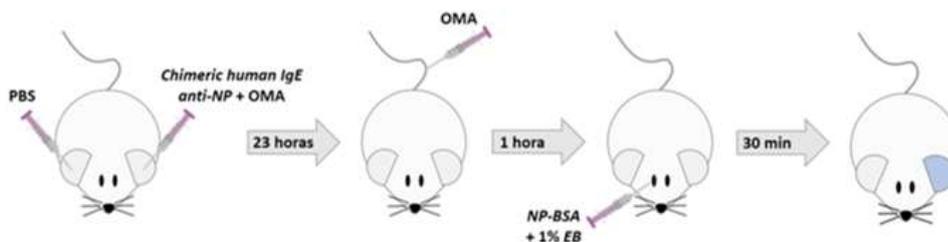


Figura 16. Esquema del modelo de anafilaxia cutánea pasiva (PCA) en ratones transgénicos (*FcεRI*^{-/-} *hFcεRI*⁺). BSA: Albúmina sérica bovina, EB: Evans Blue, OMA: Omalizumab, PBS: Tampón fosfato salino, NP: Nitrofenol.

Tratamiento con omalizumab

Tal y como se describe en la **Figura 16**, se realizan dos administraciones de omalizumab. La primera administración se efectúa en el momento de la sensibilización. A la solución de IgE con PBS se le incluye la cantidad de omalizumab según la relación IgE-Omalizumab que se desee obtener (**Tabla 30**) y se incuba durante 20 minutos a RT antes de ser administrada. La segunda administración de omalizumab se realiza 23 horas después de la sensibilización vía inyección i.v. por la cola. Se administran 100µL con la misma cantidad de omalizumab que en la primera administración diluido con PBS. Una hora después de esta administración de omalizumab se lleva a cabo la administración del antígeno, NP-BSA diluido en PBS con un 1% de Evans Blue.

Las dosis de omalizumab a administrar se determinaron en base a los resultados obtenidos en los estudios de PCA en ratones transgénicos FcεRI-/hFcεRI⁺ llevados a cabo con anterioridad en nuestro laboratorio (99).

Evaluación de la reacción de anafilaxia en la piel

Media hora después de la inyección del antígeno NP-BSA se sacrifican los animales con CO₂. Se escinden las orejas, se trocean y se sumergen en 700µL de formamida a 55°C durante 2 horas para proceder a la extracción del colorante Evans Blue. Posteriormente, las muestras se centrifugan a 12,050g durante 10 minutos a RT. En una placa de 96 pocillos se recogen 200µL de sobrenadante de cada muestra de oreja. Cada muestra se lee por duplicado. La absorbancia del Evans Blue en las muestras de tejido se determina a 620nm con un espectrofotómetro (Spark® 10M, Tecan, Männerdorf, Suiza).

Cálculo del porcentaje de inhibición de extravasación de Evans Blue

A partir de las absorbancias se calcula el porcentaje de inhibición según la siguiente fórmula.

$$\%inhibición = 100 - \left(\frac{OD_{oi} - OD_{od}}{OD_{Control\ positivo} - OD_{Control\ Negativo}} \times 100 \right)$$

OD_{oi}: Densidad óptica de la oreja izquierda

OD_{od}: Densidad óptica de la oreja derecha

OD_{Control positivo}: Densidad óptica media de todos los controles positivos

OD_{Control negativo}: Densidad óptica media de todos los controles negativos

Diseño experimental

Se evaluó el efecto de las versiones de omalizumab a diferentes dosis. Debido a la cantidad de sujetos que se incluyen, se realizó el experimento en dos fases. En la **Tabla 30** se describen los grupos empleados en el estudio.

Tabla 30. Tabla detallando los grupos experimentales del estudio de la actividad biológica mediante PCA.

Grupo (Ratio omalizumab:IgE)	Genotipo ratón	Omalizumab		hIgE anti-NP (300ng)	NP-BSA (200µg)	Tamaño (n)
		Molécula	Dosis (µg)			
Control -	WT	-	-	+	-	10
Control -	WT	-	-	+	+	10
Control -	TG	-	-	+	-	4
Control +	TG	-	-	+	+	7
(0.3:1)	TG	Xolair® vaOMA veOMA	0.1	+	+	6
(1:1)	TG		0.3	+	+	3
(3:1)	TG		1.0	+	+	6
(10:1)	TG		3.0	+	+	3
(30:1)	TG		10.0	+	+	6

- Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se trataron estadísticamente mediante la prueba T-Student con el software Sigma-Plot versión 12.0 (Systat Software Inc., San José, CA, EEUU), el test de ANOVA y el de Mann-Whitney con el software GraphPad Prism versión 7 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EEUU). Las diferencias se consideran estadísticamente significativas con una $p < 0.05$. Se utilizó el estadístico TOST con la herramienta de Excel QI Macros versión 2020.07 (KnowWare International, Inc., Denver, CO, EEUU) aplicando los límites habituales para criterios de bioequivalencia (0.8-1.25), intervalo de confianza de 90% (73–77).

Las representaciones gráficas de los resultados recogen la media y el error estándar de la media de todos los valores obtenidos.

- Material y reactivos

Todos los reactivos utilizados para realizar el ensayo *in vivo* de PCA fueron de la pureza adecuada para su finalidad y se detallan a continuación.

Tabla 31. Lista con los equipos utilizados en el Estudio 2.3 del Sub-proyecto 2 (PCA).

Descripción	Modelo	Casa comercial
Baño	SUB-Aqua Pro	Grant
Centrífuga	EBA 12R	Hettich Zentrifugen
Lector de placas	Spark® 10M	Tecan
Pletismógrafo invasivo	Buxco® FinePointe	Buxco Europe Ltd.
Politrón y fuente	IKA®-WERKE	Grob
Vaporizador Isoflurano	Isoflurano	MSS International

Tabla 32. Lista de materiales utilizados en el Estudio 2.3 del Sub-proyecto 2 (PCA).

Materiales	Casa Comercial	Referencia
Jeringas Omnican® 100	BBraun	NA
Jeringas Omnican® 50	BBraun	NA
Microsprayer® Aerolizer	Penn-Century	NA
Cánula modelo IA-1C	Penn-Century	NA
Pienso alimentario Teklad	Envigo	8904
Placas de lectura NUNC	ThermoFisher	15227905
Tubos Corning® 15mL	Sigma-Aldrich	CLS430791
Viruta EcoPure	Datesand	NA

NA: No aplica.

Tabla 33. Lista de reactivos utilizados en el Estudio 2.3 del Sub-proyecto 2 (PCA).

Reactivos	Casa Comercial	Referencia
Chimeric Human IgE anti-NP	Bio-Rad	MCA333S
Evans Blue	Sigma-Aldrich	E2129
FBS (Suero Fetal Bovino)	Biowest	S1620-500
Formamida	Sigma-Aldrich	11-0753
Gentamicina	Sigma-Aldrich	G1397
Glutamina	Sigma-Aldrich	G3126
Isoflurano	Esteve Veterinaria	13400264
Kanamicina	Sigma-Aldrich	K1377
Ketamina (Imalgene)	Merial	NA
NP-BSA	Biosearch Technologies	N-5050H
vaOMA	Absolute Antibody Ltd	Ab00874-10.17
veOMA	Absolute Antibody Ltd	Ab00874-10.17 v2
PBS (Solución salina tamponada con fosfato)	Sigma-Aldrich	P3813
Suero fisiológico	BBraun	NA
RPMI-1640	Sigma-Aldrich	R6504
Xilacina (Xilagesic®)	Calier	NA
Xolair®	Novartis Europharm Ltd.	NA

NA: No aplica.

4.2.3. Resultados y discusión

A continuación, se describen y discuten los resultados de cada Estudio del Sub-proyecto 2.

- a) **Estudio 2.1: Puesta a punto de la técnica *Surface Plasmon Resonance* (SPR) para determinar la capacidad de unión omalizumab-IgE humana en distintas versiones y evaluación de la capacidad discriminadora (Sub-objetivo 2.1).**

En este Estudio se describe la optimización del protocolo experimental y el análisis comparativo de las versiones/variantes mediante SPR para determinar la idoneidad de la técnica para su aplicabilidad en un posible ejercicio de comparabilidad.

- **Optimización de las condiciones experimentales para el análisis de la interacción omalizumab-IgE**

Antes de evaluar las versiones y variante de omalizumab se depuró la técnica hasta determinar que ajustes permitían maximizar la sensibilidad de la técnica.

Condición optimización 1: ligando IgE y analito omalizumab

En un primer abordaje se unió al chip como ligando la IgE y como analito se pasaron las versiones/variante de omalizumab. Bajo estas condiciones el sensorgrama obtenido no fue el esperado. La tendencia de las curvas de los ciclos era correcta, pero la señal obtenida era muy baja (**Figura 17**). El ruido de fondo hacía que ciclos de diferentes concentraciones se solapasen entre sí haciendo que se perdiera información e imposibilitando el ajuste. Los resultados sugerían que la unión de la IgE a la matriz del chip escondía el epítipo reconocido por omalizumab, impidiendo la formación del complejo IgE-omalizumab. Por lo tanto, no se pudo determinar la afinidad entre las moléculas analizadas.

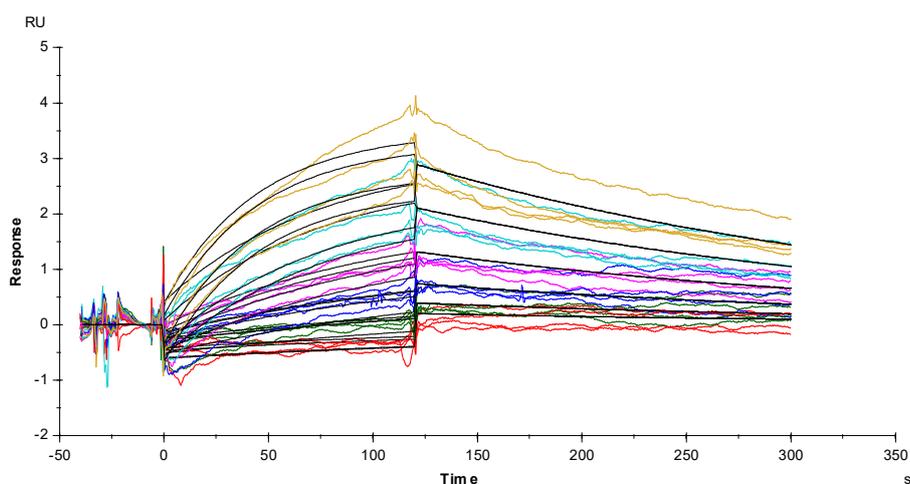


Figura 17. Sensorgrama ejemplo del análisis de interacción SPR usando como ligando IgE y como analito omalizumab. Las líneas coloreadas corresponden a las respuestas observadas a las diferentes concentraciones del analito (0.94, 1.88, 3.75, 7.5, 15 y 30nM) y las líneas negras al ajuste teórico.

Condición optimización 2: ligando omalizumab y analito IgE

Se diseñó un protocolo alternativo intercambiando ligando y analito. Se unió al chip las moléculas con función anti-IgE y como analito se usó la IgE. Como prueba de concepto, para evaluar la capacidad discriminatoria de la técnica, se unieron a la matriz del chip tres moléculas diferentes en los cuatro canales del chip: **(1)** una molécula de referencia funcionalmente irrelevante; una IgG1 sin actividad anti-IgE, **(2)** omalizumab del producto comercializado Xolair®, **(3)** la variante vaOMA, y **(4)** una mezcla 1:1 de las dos moléculas anti-IgE anteriores. La respuesta obtenida fue 20 veces mayor en comparación con la estrategia anterior, obteniendo curvas bien diferenciadas y ajustables. El análisis determinó que Xolair® tenía una mayor capacidad de unión a la diana que la variante; los complejos se formaban más rápido ($k_{a \text{ Xolair}^\circledast} > k_{a \text{ vaOMA}}$) y se deshacían más lentamente ($k_{d \text{ Xolair}^\circledast} < k_{d \text{ vaOMA}}$). Asimismo, la mezcla tenía un valor intermedio lo cual confirma la alta correlación entre la afinidad por la IgE y los resultados obtenidos (**Tabla 34**).

Tabla 34. Resultados del análisis usando como ligando las moléculas anti-IgE y como analito la IgE. Se muestran los resultados de las constantes de asociación (k_a), de disociación (k_d) y de afinidad (K_D) para cada compuesto analizado.

Ligando	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)
Xolair®	$2.12 \cdot 10^6$	0.0024	1.1
vaOMA	$1.28 \cdot 10^6$	0.0044	3.4
Mezcla (50/50)	$1.79 \cdot 10^6$	0.0030	1.7

Estos resultados demostraban que el protocolo de SPR diseñado presumiblemente permitiría el análisis comparativo de la capacidad de unión (afinidad y cinética) de distintas moléculas anti-IgE. Con toda probabilidad podría discernir entre moléculas anti-IgE con alto nivel de analogía estructural.

Se quiso evaluar si la unión a 37°C permitía aumentar la sensibilidad de la técnica. Se utilizaron el mismo chip y diseño que en el análisis anterior. Únicamente se varió la temperatura del chip al pasar el analito. Los resultados se muestran en la **Tabla 35**. El aumento de temperatura de 25°C a 37°C disminuyó la afinidad de las moléculas anti-IgE y aumentó la variabilidad entre los ciclos del sensorgrama.

Tabla 35. Resultados del análisis a 37°C usando como ligando las moléculas anti-IgE y como analito la IgE. Se muestran los resultados de las constantes de asociación (k_a), de disociación (k_d) y de afinidad (K_D) para cada compuesto analizado.

Ligando	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)
Xolair®	$3.24 \cdot 10^6$	0.0042	1.3
vaOMA	$2.34 \cdot 10^6$	0.0070	3.0
Mezcla (50/50)	$2.93 \cdot 10^6$	0.0052	1.8

Aunque el diseño a 37°C reproduce con mayor fidelidad la interacción del fármaco con su molécula diana en los pacientes, la variabilidad asociada a esta temperatura a efectos de comparación analítica no era aconsejable. En un ejercicio de comparabilidad el objetivo es alcanzar condiciones que permitan una discriminación fina entre moléculas muy parecidas y cuyos resultados sean los más reproducibles posibles.

- **Análisis comparativo entre moléculas análogas de omalizumab**

Se compararon diferentes lotes de las tres moléculas análogas (Xolair®, vaOMA y veOMA) en 4 experimentos distintos bajo las mismas condiciones. En el “**Anexo 4. Tablas resumen con los resultados de SPR**” se muestran los valores de las constantes de unión obtenidas (k_a , k_d y la K_D calculada tanto por análisis cinético como por afinidad) y representados gráficamente en la **Figura 18**. Entre los tres lotes de Xolair® existe una leve variabilidad (**Figura 18A**) atribuible, probablemente, en parte tanto a la técnica como al origen biológico del producto, lo cual evidencia la sensibilidad y precisión de la técnica. La versión veOMA exhibe unos valores muy similares a los de Xolair®. En esta molécula se observa una mayor variabilidad, y sobretodo en la **Figura 18A** el lote 2 se aleja ligeramente de los valores de referencia. Esta diferencia se ve acentuada al juntar los datos de todos los experimentos. El lote 2 de veOMA se analizó únicamente en un chip, pero cabe resaltar que en ese experimento, en todas las repeticiones, los valores de veOMA y Xolair® fueron altamente similares. Por otro lado, los valores de vaOMA, la variante de omalizumab, para todas las constantes se alejan claramente de los del producto de referencia. Se confirman los resultados preliminares en los que se observó que la variante tiene una menor capacidad de unión a la diana.

La comparación entre las versiones y variante de omalizumab se realizó comparando los valores de K_D obtenidos en el análisis cinético, parámetro que para los resultados obtenidos mejor describe la capacidad de unión a la diana. La **Tabla 36** resume el análisis estadístico que concluyó que la capacidad de unión de veOMA es equivalente estadísticamente a la del producto de referencia, sin embargo, vaOMA no lo es.

Tabla 36. Tabla comparativa de la capacidad de unión a la diana de las versiones/variantes anti-IgE estudiadas. Los datos muestran los valores de la K_D (real y normalizada (%)) medida por análisis cinético. Xolair® se usó como referencia tanto para normalizar los datos como para realizar el ensayo estadístico (TOST), realizado con el software QI Macros 2020 del Excel. nM (Nanomolaridad), DS (Desviación estándar).

	Media (Rango) K_D (nM)	Datos Normalizados (Porcentaje relativo)			
		Media (Rango)	Mediana	DS	Resultado Estadístico
Xolair®	1.0 (0.8 - 1.3)	100 (76-132)	95	15	/
vaOMA	2.8 (2.4 - 3.3)	279 (250-336)	268	36	No equivalente
veOMA	0.9 (0.6 - 1.3)	88 (61-133)	84	20	Equivalente

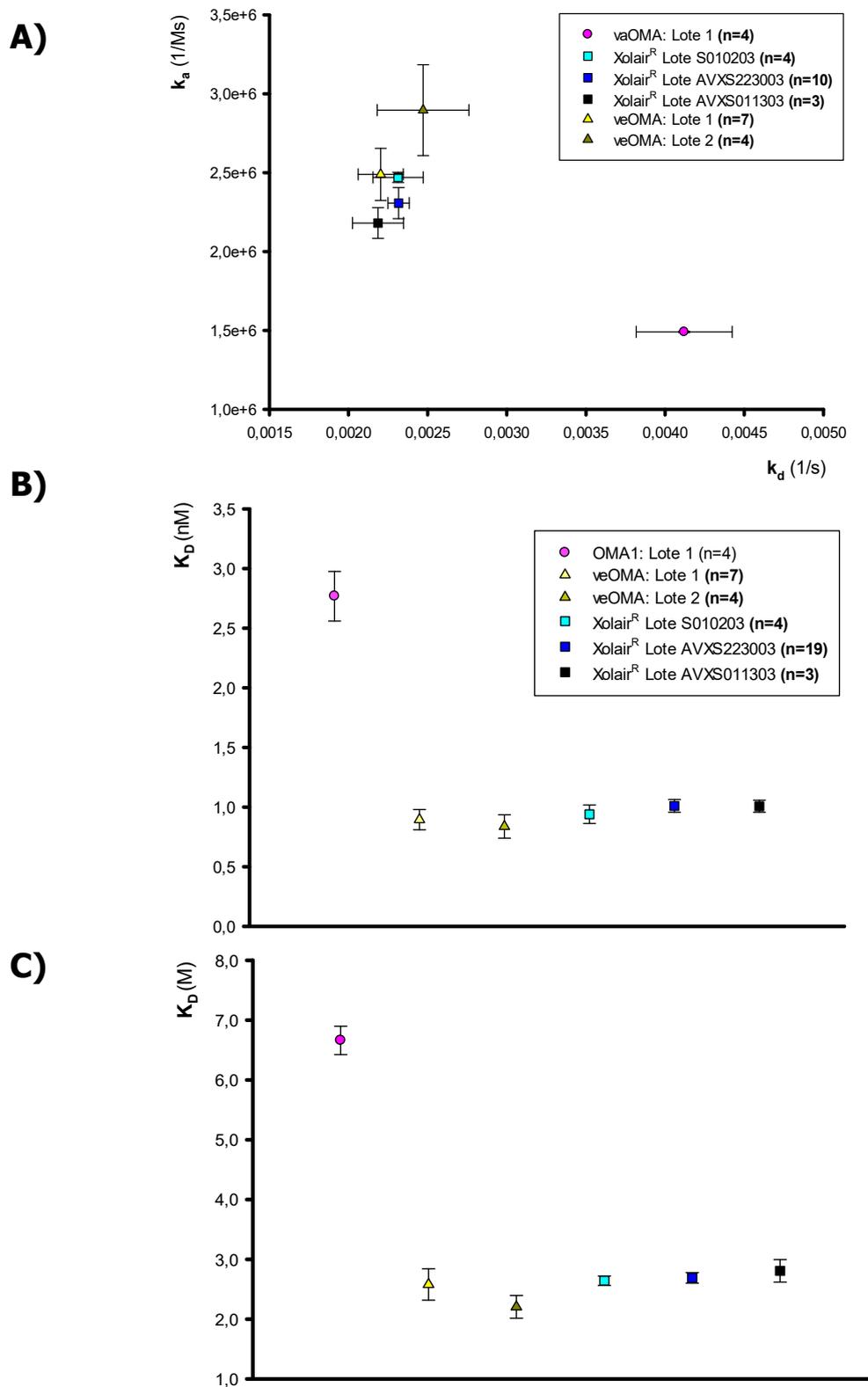


Figura 18. Representación gráfica de las constantes obtenidas en los análisis de interacción omalizumab-IgE realizados mediante la tecnología SPR de las moléculas análogas con función anti-hIgE (Xolair®, vaOMA y veOMA). **(a)** Gráfica de la constante de asociación (k_a) respecto la de disociación (k_d), **(b)** gráfica de los valores de K_D calculados mediante datos cinéticos y **(c)** gráfica de K_D calculados mediante análisis de afinidad. Valores obtenidos a partir del software BiaEval 1.1.

La interpretación que se ha hecho se ve respaldada por el análisis llevado a cabo con el software BiaEval 1.1. El software de Biacore realiza una comparación teniendo en cuenta los sensorgramas de las distintas moléculas analizadas y da un valor del porcentaje de similitud respecto a una referencia, en nuestro caso el lote S010203 de Xolair® (Figura 19). El resultado muestra que todos los lotes de Xolair® son esencialmente iguales, con valores de en torno al 100%. La leve variabilidad observada es esperable y quizás sea atribuible a la técnica, más que a diferencias menores entre lotes. Los dos lotes de veOMA también presentan una alta analogía con valores cercanos al 100%. En cambio, el porcentaje de analogía de vaOMA disminuye a un 79%.

Todos los resultados obtenidos conducen a una misma conclusión: vaOMA difiere notablemente del producto de referencia en su capacidad de unión a IgE. Sin embargo, a pesar de que la técnica permite diferenciarlas la capacidad de unión a IgE de veOMA es similar a la del producto original. El protocolo optimizado de SPR permite identificar diferencias en la actividad biológica entre las moléculas análogas de omalizumab. Esta metodología de SPR puede resultar muy útil en la comparación de la capacidad de unión a su diana de moléculas con función anti-IgE. Es probable que las diferencias observadas entre veOMA y omalizumab original en su afinidad por la IgE no tenga impacto clínico. Si bien nuestros datos no permiten determinar qué grado de analogía pudiera considerarse irrelevante, ciertamente en un análisis de múltiples lotes el objetivo sería que la variabilidad del producto problema debería contenerse dentro de la variabilidad de los lotes de omalizumab original.

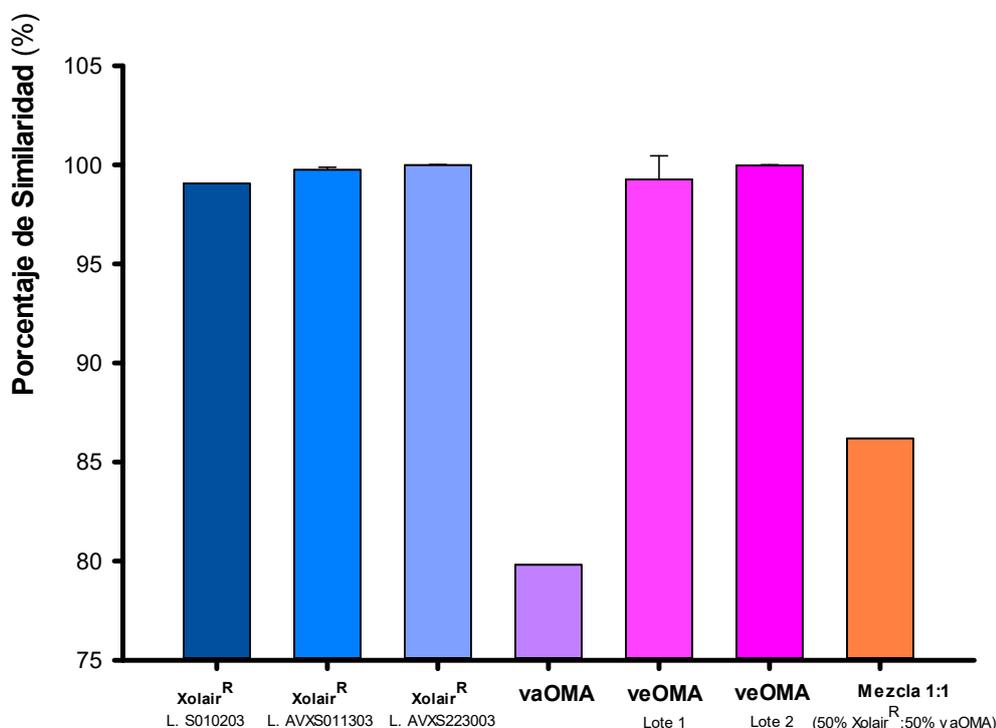


Figura 19. Puntuación de similitud (%) de las diferentes moléculas anti-IgE evaluadas. Cálculos realizados con el software BiaEval 1.1.

b) Estudio 2.2: Comparación de la actividad biológica *in vitro* de versiones/variantes de omalizumab mediante el ensayo de liberación de β -hexosaminidasa de mastocitos (Sub-objetivo 2.2).

Para evaluar la idoneidad de la técnica primero se analizó la repetibilidad del ensayo. Tras ello se caracterizó la variabilidad existente entre lotes del producto de referencia Xolair® y, por último, se comparó la actividad de las moléculas producidas frente a Xolair® utilizando los dos sistemas celulares.

- **Estudio repetibilidad**

Con el objetivo de definir la precisión de la técnica se evaluó la repetibilidad (100) usando la línea celular LAD2. En la **Tabla 37** se presentan los resultados obtenidos al medir la actividad de un mismo lote de Xolair® en 4 experimentos independientes realizados en 4 días distintos. Se observa que a concentraciones altas (ratios 100:1, 300:1, 500:1 y 1000:1) la repetibilidad de la técnica es elevada con valores de %RSD¹⁸ iguales o menores al 10%. En las concentraciones intermedias (ratios 10:1 y 30:1) se identifica una mayor variabilidad con %RSD entre 26% y 59%. Por último, a concentraciones bajas (ratios 0.1:1, 0.3:1, 1:1 y 3:1) el valor de %RSD es muy elevado, por encima del 130%.

Un %RSD menor del 20% es aceptable para ensayos *in vitro* [30]. Por lo tanto, se puede afirmar que la técnica es precisa a concentraciones altas (a partir de la ratio 100:1). La precisión de la técnica se ve mermada a concentraciones intermedias (ratios 10:1 y 30:1). Esto es atribuible al estado de la línea celular en el momento de realizar el experimento ya que se ha visto que la edad del cultivo en células LAD2 puede afectar a la cantidad de β -hexosaminidasa que las células liberan al medio al activarse (99). A concentraciones bajas, el valor elevado del %RSD se debe a que el valor del parámetro medido (Porcentaje de inhibición) es mínimo, en torno a 0, y se ve incrementado significativamente por el ruido intrínseco de la técnica. La desviación estándar de las concentraciones bajas es comparable al de las altas.

Tabla 37. Valores de la repetibilidad. Se presentan las medias de inhibición (%) dosis-dependientes de cuatro experimentos realizados en días diferentes. DS (Desviación estándar), %RSD (Coeficiente de variación), ND (No determinado).

% Inhibición	Ratio (Omalizumab:IgE)									
	0,1:1	0,3:1	1:1	3:1	10:1	30:1	100:1	300:1	500:1	1000:1
Medición 1	-1,9	6,3	-2,2	13,9	34,8	64,2	90,3	99,9	ND	ND
Medición 2	1,3	4,9	6,5	2,2	12,2	48,3	80,6	97,1	ND	102,3
Medición 3	ND	3,4	0,5	5,4	21,6	57,3	87,7	100	99,9	100,4
Medición 4	ND	-5,1	-3,9	-1,4	54,1	87,5	101,8	102,6	95,5	104,9
Mediana	-0,3	2,4	0,2	5,0	30,7	64,3	90,1	99,9	97,7	102,5
DS	2,3	5,1	4,6	6,5	18,2	16,8	8,8	2,8	3,1	2,3
RSD (%)	754	216	2026	130	59	26	10	3	3	2

¹⁸ %RSD: “Relative Standard Deviation” o “coeficiente de variación”. Medida estandarizada de medición de la dispersión. Se expresa como porcentaje del ratio de la desviación estándar entre la media.

- Estudio de variabilidad entre lotes

Se evaluó la variabilidad entre lotes del producto de referencia, Xolair® (Lotes detallados en la **Tabla 23**). En la **Tabla 38** y **Figura 20** se muestra la media del resultado de tres experimentos independientes realizados en tres días consecutivos para minimizar la variabilidad atribuible al estado celular del cultivo de LAD2, donde cada condición se evaluó por cuadruplicado.

La realización de los experimentos en días consecutivos permitió subsanar la variabilidad a concentraciones intermedias. La variabilidad observada a todas las concentraciones es inferior a la obtenida en el estudio de repetibilidad, menos en las tres más elevadas, donde aumentó ligeramente. Existe una muy leve variación entre los distintos lotes, atribuible principalmente a la técnica y posiblemente, en parte, a la actividad biológica. Sin embargo, se considera biológicamente insignificante. Se ha demostrado la robustez e idoneidad del ensayo.

La cuantificación de la β -hexosaminidasa ofrece ventajas respecto a otros mediadores; es específico de MC, se encuentra presente en MC pulmonares humanos y su determinación es sencilla (83). Además, presenta una alta sensibilidad. La producción basal de este mediador ronda aproximadamente el 10%. Al sensibilizarse se alcanzan valores del 70-80%, lo cual ofrece un amplio rango que probablemente permite la determinación de pequeñas fluctuaciones. Estas ventajas demuestran que el ensayo de liberación de β -hexosaminidasa es una herramienta de gran valor para estudiar directamente la actividad neutralizadora de omalizumab o de cualquier molécula análoga.

Tabla 38. Tabla resumen de la variabilidad entre lotes del producto comercializado Xolair®. Se presentan las medias de tres experimentos de la inhibición (%) de cada condición. DS (Desviación estándar), %RSD (Coeficiente de variación).

% Inhibición	Ratio (Omalizumab:IgE)									
	1:1	3:1	5:1	10:1	30:1	50:1	100:1	300:1	500:1	1000:1
Lote S010203	5,1	8,6	17,3	34,5	63,3	89,4	88,5	101,3	101,8	104,6
Lote AVXS011303	8,2	11,4	19,5	34,5	69,2	90,1	104,5	97,9	109,9	96,1
Lote AVXS011405	22,9	14,8	24,8	34,7	71,3	94,2	100,4	108,3	112,2	107,1
Lote AVXS223003	7,0	13,1	27,1	44,5	66,1	90,1	99,4	117,4	116,5	115,7
Media	10,8	12,0	22,1	37,1	67,5	91,0	98,2	106,2	110,1	105,9
DS	8,2	2,6	4,5	5,0	3,5	2,2	6,8	8,6	6,2	8,1
%RSD (%)	76	22	20	13	5	2	7	8	6	8

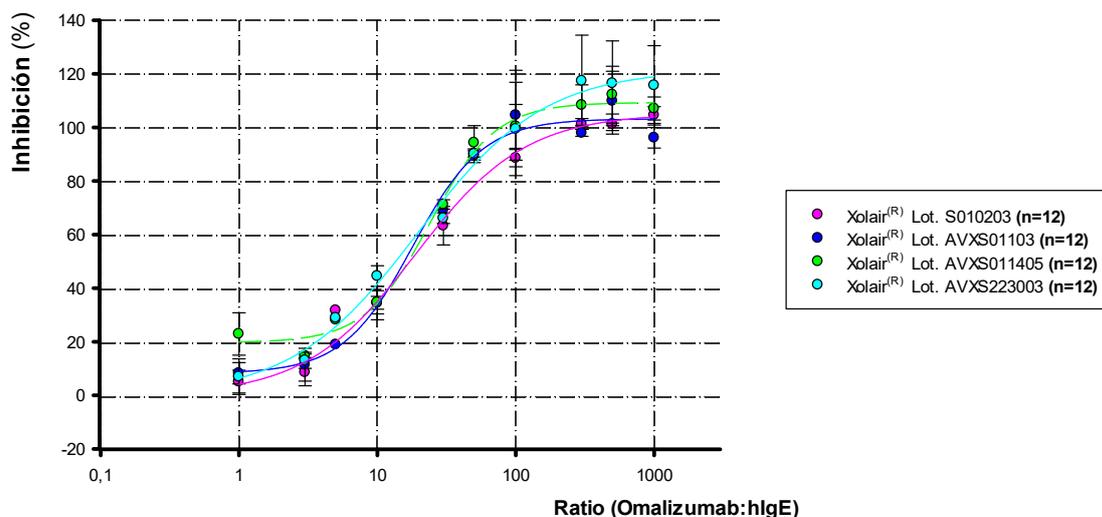


Figura 20. Representación gráfica de la variabilidad entre lotes de Xolair®. Representación del efecto inhibitorio (%) en función de la concentración administrada (Cantidad de omalizumab partido cantidad de IgE administrados) de la liberación de β -hexosaminidasa de diferentes lotes de Xolair®. Los datos se representan como media \pm SEM. Las curvas corresponden a un ajuste sigmoide logístico realizado por el software SigmaPlot v14.0.

- Comparabilidad de la actividad biológica *in vitro* en células LAD2

Se comparó directamente el producto comercializado frente a la variante y la versión. Para cada comparación se realizaron 4 experimentos en el menor lapso de tiempo posible.

Las medias de las mediciones de los cuatro ensayos se representan gráficamente en la **Figura 21**. La **Figura 21A** y la **Tabla 39** muestran los resultados al comparar la variante vaOMA con Xolair® en las que se aprecia que la actividad, porcentaje de inhibición, es equivalente para los dos compuestos en las concentraciones de los extremos, en cambio, difiere en las intermedias. Como se ve en la **Tabla 39**, la variante vaOMA tiene en general una actividad estadísticamente no equivalente e inferior respecto al producto de referencia. Sin embargo, al comparar la versión veOMA con el producto de referencia no se observan diferencias (**Figura 21B** y **Tabla 40**). En todas las concentraciones las dos versiones manifiestan un mismo nivel de actividad, las curvas de ajuste prácticamente se solapan y estadísticamente las medias son equivalentes.

El ensayo comparativo de liberación de β -hexosaminidasa ha demostrado que Xolair® y la versión (veOMA) son equivalentes en cuanto a la actividad anti-IgE. En cambio, ha permitido desvelar que las tres modificaciones aminoacídicas de la variante han disminuido la actividad de forma significativa. Estos datos se correlacionan con los obtenidos en SPR (estudio capacidad de unión a la diana) demostrando que este ensayo en cultivos de LAD2 es útil para comparar la actividad biológica anti-IgE *in vitro*. Sin embargo, no se alcanza el mismo nivel de sensibilidad, la técnica SPR pudo discernir ciertas diferencias, tanto entre lotes del producto de referencia como entre versiones, que quedan enmascaradas en esta

comparación. Es explicable que, en un ensayo biológico, como son los que se ejecutan en cultivos celulares, la variabilidad haga menos sensible el estudio de comparabilidad funcional.

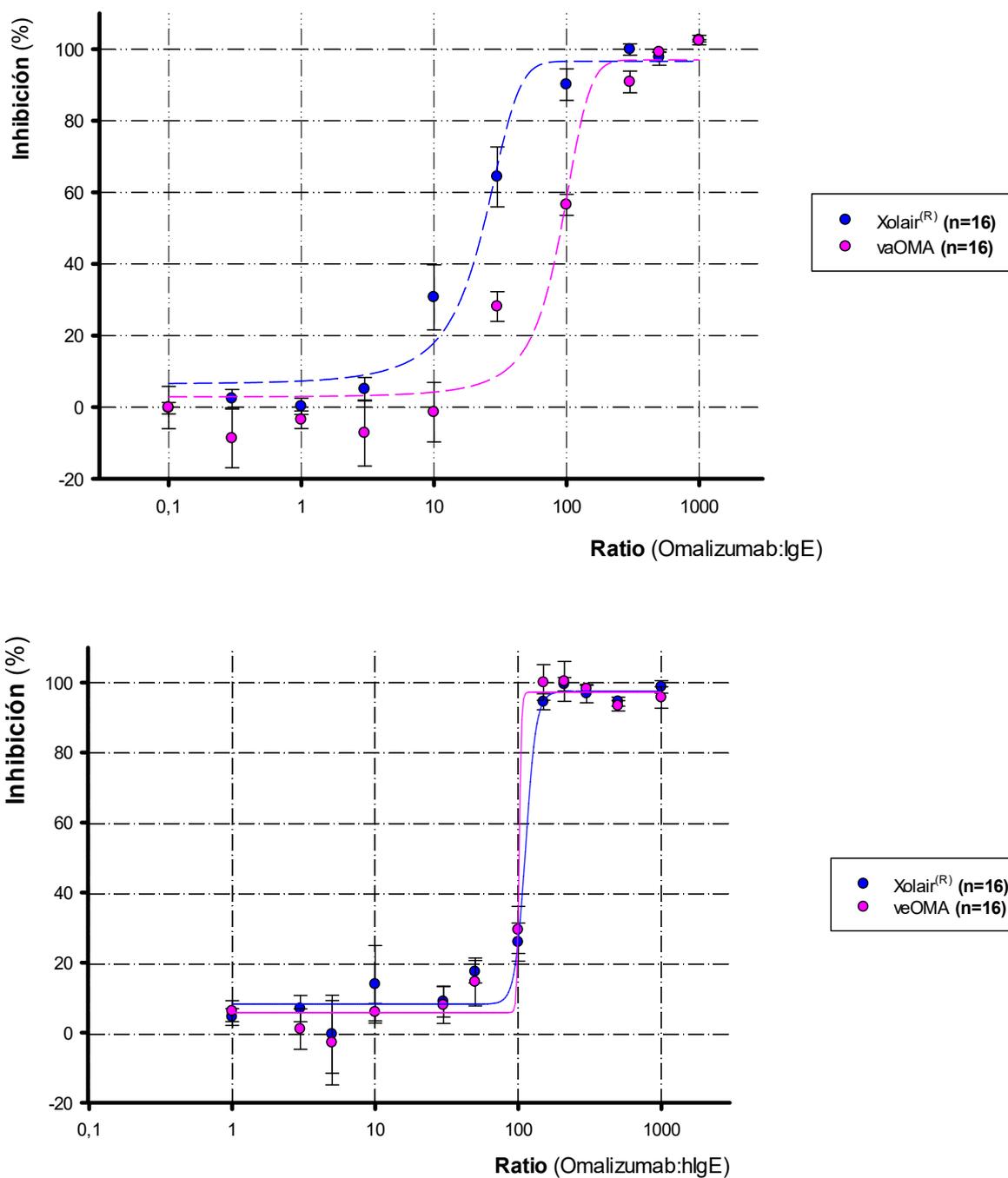


Figura 21. Comparación la capacidad inhibitoria (%) dosis-dependiente (Cantidad de omalizumab entre cantidad de IgE administrados) de la liberación de β -hexosaminidasa de diferentes versiones/variantes de omalizumab. **(a)** Comparación entre Xolair® y vaOMA, y **(b)** entre Xolair® y veOMA. Los datos se representan como media \pm SEM. Las curvas corresponden a un ajuste sigmoidal logístico realizado por el software SigmaPlot v14.0.

Tabla 39. Tabla con los valores cuantitativos de la inhibición (%) de las distintas dosis del ensayo de liberación de β -hexosaminidasa comparativo entre Xolair® y la variante vaOMA usando la línea celular LAD2. Los valores presentados corresponden a la media y la desviación estándar (DS) de 4 medidas independientes. TOST: Test de equivalencia (Two one-sided test).

Ratio (Omalizumab:IgE)	% inhibición Xolair®		% inhibición vaOMA		Resultado TOST
	Media	DS	Media	DS	
(0,1:1)	-0,30	2,26	-0,10	8,34	Equivalentes
(0,3:1)	2,38	5,12	-8,73	16,44	Equivalentes
(1:1)	0,23	4,56	-3,53	4,93	Equivalentes
(3:1)	5,03	6,54	-7,25	18,43	Equivalentes
(10:1)	30,68	18,16	-1,4	16,64	No Equivalentes
(30:1)	64,33	16,77	28,1	8,3	No Equivalentes
(100:1)	90,10	8,81	56,5	5,85	No Equivalentes
(300:1)	99,90	2,75	90,83	5,25	No Equivalentes
(500:1)	97,70	3,11	99,15	0,07	Equivalentes

Tabla 40. Tabla con los valores cuantitativos de la inhibición (%) de las distintas dosis del ensayo de liberación de β -hexosaminidasa comparativo entre Xolair® y la versión veOMA usando la línea celular LAD2. Los valores presentados corresponden a la media y la desviación estándar (DS) de 4 medidas independientes. TOST: Test de equivalencia (Two one-sided test).

Ratio (Omalizumab:IgE)	% inhibición Xolair®		% inhibición veOMA		Resultado TOST
	Media	DS	Media	DS	
(1:1)	0,46	8,74	6,15	5,95	Equivalentes
(3:1)	6,88	7,49	1,02	11,57	Equivalentes
(5:1)	-0,46	15,76	-2,87	17,04	Equivalentes
(10:1)	13,82	22,11	5,86	4,98	Equivalentes
(30:1)	8,88	8,85	7,89	10,53	Equivalentes
(50:1)	17,4	6,43	14,48	13,67	Equivalentes
(100:1)	25,86	10,89	29,35	13,44	Equivalentes
(150:1)	94,51	3,24	100,02	7,19	Equivalentes
(210:1)	99,52	2,71	100,34	8,07	Equivalentes
(300:1)	96,86	5,25	98,22	2,01	Equivalentes
(500:1)	94,55	1,83	93,36	2,06	Equivalentes
(1000:1)	98,77	3,58	95,74	6,16	Equivalentes

- Comparabilidad de la actividad biológica *in vitro* en células RS-ATL8

Siguiendo directrices reguladoras, en una caracterización óptima de la actividad biológica *in vitro* conviene emplear más de una línea celular. En pruebas preliminares con la línea RS-ATL8 se observó que la variabilidad intrínseca de la respuesta celular era mayor en comparación a LAD2. En la **Tabla 41** y la **Tabla 42** se representan los resultados cuantitativos de la comparación *head-to-head* entre la versión y la variante frente a Xolair® (las gráficas de estos datos se encuentran en el **Anexo 5. Comparación de la actividad *in vitro* en células RS-ATL8**). Se observa una correlación con los resultados obtenidos en LAD2. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad de vaOMA en las dosis intermedias (Dosis 30:1, 50:1 y 100:1), resultado que resalta más aún la inferior actividad biológica de vaOMA frente al producto de referencia (**Tabla 41**). En cambio, en el análisis estadístico entre veOMA y Xolair® estas diferencias no se observan (**Tabla 42**). El resultado estadístico muestra, salvo en un par de dosis bajas, que la versión es equivalente a Xolair®.

Si bien los estudios con la línea RS-ATL8 reflejan diferencias análogas a las observadas con LAD2, la reproducibilidad de la actividad en esta última línea la convierte en preferible para comparar versiones o variantes de omalizumab. En todo caso, se trata de estudios funcionales complementarios a SPR.

Tabla 41. Valores cuantitativos de la inhibición (%) de las distintas dosis del ensayo de liberación de β -hexosaminidasa comparativo entre Xolair® y la variante vaOMA usando la línea celular RS-ATL8. Los valores presentados corresponden a la media y la desviación estándar (DS) de 3 medidas independientes. IgE: Inmunoglobulina E; TOST: Test de equivalencia (Two one-sided test).

Ratio (Omalizumab:IgE)	% inhibición Xolair®		% inhibición vaOMA		Resultado TOST
	Media	DS	Media	DS	
(0.3:1)	6.57	34.45	2.82	1.43	Equivalentes
(1:1)	-1.63	27.55	-4.00	6.74	Equivalentes
(3:1)	-4.90	2.95	-12.97	37.96	Equivalentes
(10:1)	-3.83	15.81	-28.60	18.54	Equivalentes
(30:1)	18.53	17.85	-28.70	21.30	No Equivalentes
(50:1)	56.33	5.84	-37.20	8.79	No Equivalentes
(100:1)	99.27	6.84	-0.93	24.99	No Equivalentes
(300:1)	104.77	5.95	82.23	28.06	Equivalentes
(500:1)	105.03	4.33	100.60	4.31	Equivalentes

Tabla 42. Valores cuantitativos de la inhibición (%) de las distintas dosis del ensayo de liberación de β -hexosaminidasa comparativo entre Xolair® y la versión veOMA usando la línea celular RS-ATL8. Los valores presentados corresponden a la media y la desviación estándar (DS) de 3 medidas independientes. IgE: Inmunoglobulina E; TOST: Test de equivalencia (Two one-sided test).

Ratio (Omalizumab:IgE)	% inhibición Xolair®		% inhibición veOMA		Resultado TOST
	Media	DS	Media	DS	
(0.3:1)	-2.24	0.82	-12.29	3.79	No Equivalentes
(1:1)	-20.44	13.96	-1.54	17.90	Equivalentes
(3:1)	-13.78	18.05	8.85	13.04	No Equivalentes
(5:1)	-5.23	20.57	41.20	56.26	Equivalentes
(10:1)	26.63	32.92	45.68	33.31	Equivalentes
(20:1)	16.70	0.87	47.80	22.17	Equivalentes
(30:1)	74.54	25.23	87.23	17.45	Equivalentes
(50:1)	85.20	14.34	96.54	5.19	Equivalentes
(100:1)	101.57	4.96	101.41	2.00	Equivalentes
(300:1)	100.84	5.76	100.37	3.09	Equivalentes
(500:1)	98.49	0.15	99.65	2.99	Equivalentes

c) Estudio 2.3: Comparación de la actividad biológica de versiones/variantes de omalizumab *in vivo* mediante un modelo de anafilaxia (PCA) en ratón transgénico (Sub-objetivo 2.3).

Poder utilizar modelos murinos para estudiar la actividad biológica de omalizumab está limitado por su alta especificidad que únicamente reconoce la IgE de primates (18). No obstante, la disponibilidad de una población de ratones transgénicos que expresan el receptor humano de alta afinidad a la IgE (hFcεRI) permite estudiar la actividad anti-IgE al sensibilizar los animales pasivamente administrando IgE humana. Este animal transgénico supone una herramienta biológica de gran valor añadido para caracterizar la actividad de moléculas que bloquean las IgEs. Por esta razón, se propone evaluar la posible validez de un modelo *in vivo* para estudiar y comparar la actividad biológica de omalizumab.

- **Anafilaxis cutánea pasiva (PCA)**

La competencia del modelo de PCA se evaluó mediante la comparación del efecto *in vivo* entre las versiones y variante de omalizumab contrastándolo con la actividad biológica medida por otros procedimientos. Se diseñó un experimento en el cual se evaluaron las 3 moléculas análogas simultáneamente. Debido al tamaño de la población se optó por llevar a cabo el experimento en dos fases.

En la **Figura 22** se observan los resultados del efecto inhibitorio de cada molécula. Las dosis se miden como ratio omalizumab:hIgE, que expresa la cantidad (μg) de omalizumab que se administra por cantidad (μg) de IgE humana. Las cinco dosis estudiadas son las correspondientes a las ratios: 0.3:1, 1:1, 3:1, 10:1 y 30:1. Se observa que las dos versiones de omalizumab responden a un comportamiento dosis-respuesta, cuanto mayor es la dosis mayor es el efecto de inhibición mastocitaria. Sin embargo, aunque la variante presenta una tendencia parecida, en este último caso el comportamiento dosis-respuesta no es estadísticamente demostrable. Aunque no se muestren los datos, todos los controles negativos presentaron una extravasación basal mínima, y por su parte, los animales del grupo control positivo fueron los que presentaron los niveles más altos de extravasación. Los valores de los controles se usaron para cuantificar la inhibición.

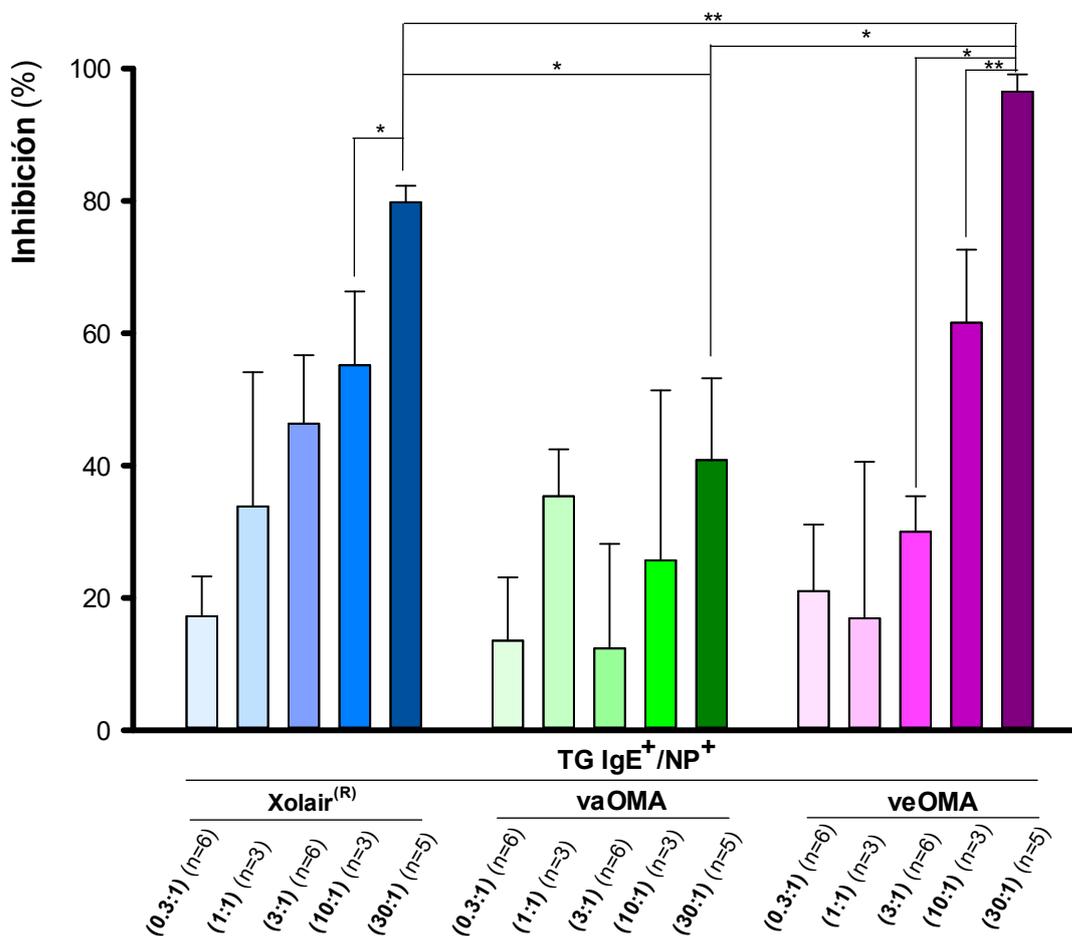


Figura 22. Comparación del efecto inhibitorio (%) de los anticuerpos anti-IgE en la respuesta inflamatoria mediada por MC en el modelo PCA. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. (*p-valor < 0.05 y **p-valor < 0.01). NP (Nitrofenol), TG (Animal transgénico).

En el comportamiento dosis-respuesta de Xolair[®] la dosis más baja (0.3:1) inhibe un 17%. A la dosis más alta se alcanza un 80% de inhibición. La misma tendencia se observa para el grupo tratado con veOMA. Estadísticamente veOMA y Xolair[®] tienen una actividad equivalente excepto para la dosis más

alta (**Tabla 43**). En la dosis (30:1) veOMA presenta una inhibición mayor que Xolair® alcanzando un valor del 97%. Al comparar la respuesta de Xolair® con vaOMA observamos el mismo resultado, aunque el perfil de la gráfica a priori puede manifestar que vaOMA presenta un comportamiento inferior a Xolair® el análisis estadístico no puede concluir que no sean equivalentes, salvo para la dosis más elevada. Si bien estimamos que la diferencia a la mayor dosis es fruto del azar, solo el análisis de numerosos lotes de uno y otro producto nos permitirían determinar si ese dato tiene relevancia y refleja alguna diferencia estructural o no.

Tabla 43. Valores cuantitativos de la inhibición (%) obtenidos en el ensayo de PCA en ratones transgénicos que expresan el receptor humano FcεRI. Los valores presentados corresponden a la media y la desviación estándar (DS). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el estadístico TOST. Xolair® se usó como referencia al comparar. IgE: Inmunoglobulina E; TOST: Test de equivalencia (Two one-sided test).

Ratio (Omalizumab:IgE)	% inhibición Xolair®		% inhibición vaOMA		Resultado TOST
	Media	DS	Media	DS	
(0.3:1)	17.21	14.78	13.53	23.45	Equivalentes
(1:1)	33.81	35.11	35.36	12.28	Equivalentes
(3:1)	46.32	25.35	12.35	38.74	Equivalentes
(10:1)	55.16	19.32	25.69	44.48	Equivalentes
(30:1)	79.80	5.51	40.82	24.71	No Equivalentes
Ratio (Omalizumab:IgE)	% inhibición Xolair®		% inhibición veOMA		Resultado TOST
	Media	DS	Media	DS	
(0.3:1)	17.21	14.78	21.01	24.66	Equivalentes
(1:1)	33.81	35.11	16.90	40.96	Equivalentes
(3:1)	46.32	25.35	29.98	13.17	Equivalentes
(10:1)	55.16	19.32	61.59	19.08	Equivalentes
(30:1)	79.80	5.51	96.51	5.81	No Equivalentes

Aunque visualmente los resultados obtenidos en el modelo de PCA son los esperables, el análisis estadístico fue incapaz de confirmar lo obtenido con las técnicas anteriores. Este modelo permite evaluar la función anti-IgE, pero su complejidad y la variabilidad inter-individual de los estudios *in vivo* disminuye notablemente la sensibilidad de la técnica. En nuestro caso, aumentando el tamaño poblacional de los grupos experimentales posiblemente mejoraría la sensibilidad; minimizando las diferencias entre las versiones y acentuando las diferencias de la variante. Sin embargo, la poca sensibilidad de la técnica la convierte en una técnica no ideal para la comparación de la actividad biológica de moléculas análogas de omalizumab porque no parece añadir valor a los abordajes anteriores. El único beneficio que puede ofrecer es la posibilidad de acometer en paralelo estudios de toxicidad derivada de su mecanismo de acción.

4.2.4. Conclusiones

Las conclusiones del Sub-proyecto 2 son:

- Es posible caracterizar la naturaleza de la unión entre omalizumab e IgE humana mediante SPR inmovilizando omalizumab como ligando y utilizando la IgE como analito.
- Dada su elevada sensibilidad, la técnica de SPR optimizada es idónea para anticipar diferencias funcionales menores entre versiones de omalizumab; incluso probablemente diferencias sin impacto clínico.
- Pese a tener una menor sensibilidad, el ensayo celular de liberación de β -hexosaminidasa con MC humanos refleja las mismas diferencias que la técnica de SPR, por lo tanto, se ha demostrado que permite comparar la actividad biológica de moléculas anti-IgE y, además, mimetiza el fenómeno biológico que ocurre en el paciente tratado con omalizumab.
- Al no interactuar directamente con las células, la línea celular no influye en la evaluación de la actividad biológica de omalizumab, por lo tanto, para la comparación bastaría con la utilización de una línea celular.
- Si bien es posible determinar el efecto de omalizumab en el modelo *in vivo* de PCA, su menor sensibilidad no permite detectar las diferencias observadas *in vitro*. Si bien, pudiera ser un procedimiento inapropiado para comparar la actividad anti-IgE convendría determinar si tiene interés para el análisis de otros efectos de omalizumab.

**Sinergismo entre
versiones/variante
de omalizumab y
agonismo de EP₂
(Objetivo 3)**

45

SUB-PROYECTO 3



4.3. SUB-PROYECTO 3: Sinergismo entre versiones/variante de omalizumab y agonismo EP₂ (Objetivo 3).

4.3.1. Introducción: planteamiento experimental

La eficacia de omalizumab se debe a su capacidad de neutralizar la IgE libre y, por lo tanto, de prevenir la sensibilización mastocitaria. En el Sub-proyecto 2 se demostró mediante estudios *in vitro* e *in vivo* que la versión de omalizumab tiene esencialmente la misma actividad biológica que el producto original. Sin embargo, la variante exhibe diferencias estadísticamente significativas. El objetivo de un ejercicio de comparabilidad analítica es plantear condiciones experimentales altamente sensibles que permitan revelar diferencias estructurales y funcionales menores entre versiones de un determinado producto. Por ejemplo, entre un candidato a biosimilar y el producto de referencia o entre versiones de un determinado producto que pueda ser sometido a un cambio en el proceso productivo o en su composición. Alineándolo con el Objetivo Específico 3, en el Sub-proyecto 3 se planteó la creación de un escenario alternativo que pudiera revelar diferencias funcionales no observadas en el Sub-proyecto 2. Se propuso evaluar las versiones y la variante de omalizumab en un escenario de co-administración con un inhibidor mastocitario; un agonista del receptor EP₂.

Existe evidencia, parte de ella generada en nuestro laboratorio, de que la activación del receptor EP₂ de la prostaglandina E2 previene la actividad mastocitaria *in vitro* (93) e *in vivo* (99,101) tanto en mastocitos de ratón como humanos (102–104). Es razonable pensar en un posible sinergismo de potenciación entre el agonismo EP₂ y la neutralización de la IgE por omalizumab. La hipótesis de sinergismo se relaciona con el hecho de que reducir la presencia de IgE en la superficie mastocitaria pudiera tener consecuencias en la potencia inhibitoria del agonista EP₂ e incluso de que un posible efecto directo de omalizumab sobre el receptor FcεRI mastocitario pudiera incidir en el bloqueo mastocitario vía EP₂, aunque esto último es menos plausible. Si el escenario de co-administración de ambos productos permitiera hacer aflorar diferencias funcionales se dispondría de una metodología de gran valor en un ejercicio de comparabilidad funcional entre versiones de productos con omalizumab.

Con la finalidad de alcanzar cada uno de los Sub-objetivos del Objetivo 3, “*Evaluar el posible sinergismo de potenciación entre versiones/variante de omalizumab y agonismo de EP₂*”, se acometió el estudio en dos etapas.

- **Estudio 3.1:** *Validación del agonismo EP₂ como estrategia de inhibición mastocitaria.*

La validación del agonismo del receptor EP₂ en la prevención de la actividad mastocitaria se llevó a cabo con el fin de determinar similitudes en el efecto de un agonista EP₂ y un compuesto neutralizante de la IgE. Se validó el efecto de activación EP₂ en un modelo de ratón transgénico (TG) generado en nuestro laboratorio que sobreexpresa EP₂ específicamente en los MC. Esta colonia de ratones permitió además investigar el impacto de la prevención de la actividad

mastocitaria en ratones expuestos a aeroalérgenos de ácaros del polvo (HDM). La sensibilización a HDM es un modelo bien caracterizado de asma alérgica en el que la IgE juega un papel predominante. No solo se evaluó el efecto del agonismo sobre EP₂ en la actividad mastocitaria, sino que también se estudiaron sus consecuencias en el proceso inflamatorio y en la reactividad de las vías aéreas.

- **Estudio 3.2:** *Estudio de sinergismo entre agonismo EP₂ y neutralización de la IgE (omalizumab): comparación de versiones/variante de omalizumab.*

Además, como se ha dicho, se estudió la existencia de un posible efecto sinérgico entre el agonismo de EP₂ y la neutralización de la IgE por omalizumab. Se escogió el agonista específico de EP₂ más efectivo y se evaluó su efecto combinado con omalizumab *in vitro* (ensayo de liberación de β-hexosaminidasa en células LAD2) e *in vivo* (protocolo PCA en ratones transgénicos). Se evaluó la capacidad discriminadora de este abordaje en la identificación de diferencias entre las versiones/variante de omalizumab y el producto original.

A continuación, se describen ambos estudios y sus resultados.

4.3.2. Material y métodos

En esta sección se describe con detalle las técnicas empleadas en la ejecución de cada estudio.

a) Estudio 3.1. Validación del agonismo EP₂ como estrategia de inhibición mastocitaria (Sub-objetivo 3.1).

- **Animales de experimentación**

Se utilizaron ratones transgénicos con fondo genético BALB/c que sobreexpresan el receptor EP₂ específicamente en los mastocitos (99). La colonia de ratones transgénicos se creó en colaboración con la Unidad de Animales Transgénicos del CBATEG de la UAB. Todos los animales se criaron en el Estabulario Central de la UAB.

Los ratones se dividieron aleatoriamente en grupos que incluían de forma equitativa tanto machos como hembras de 8 a 15 semanas de edad y de un peso de entre 20 a 40 gramos. Al tratarse de una colonia propia la disponibilidad de animales y la posibilidad de seleccionar la edad, tamaño y/o sexo es limitada. Los animales fueron estabulados en grupos de 2 a 6 individuos en racks ventilados Allentown Inc. (Allentown, NJ, EEUU). Cada rack contenía material de cama (Ecopure, Datesand, Manchester, UK), pienso en forma de pellets (Tecklad, Envigo, Cambridgeshire, UK) y agua *ad libitum*. Las condiciones ambientales de la sala de estabulación se mantuvieron controladas: temperatura 20±1°C, humedad 60±10% y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Para reducir el estrés de los animales se estableció un período de adaptación de 1 semana antes de la realización del experimento permitiendo la aclimatación al bioterio y a la manipulación por parte del investigador.

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética para la Investigación Animal de la Universitat Autònoma de Barcelona (España). El desarrollo de este proyecto se realizó de acuerdo con la legislación española; Real Decreto 53/2013 relativa a la “Protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos”, y de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y el Consejo (89,90).

- **Protocolo experimental**

Protocolo sensibilización

La sensibilización de los ratones a aeroalérgenos se llevó a cabo por exposición diaria a un extracto de HDM purificado con un contenido bajo en lipopolisacáridos (<0.5 EU/dosis) siguiendo el protocolo descrito por *Cates et al. 2004* (**Figura 23A**) (105). Los alérgenos se administraron por vía intranasal (i.n.) diariamente a una dosis de 25µg/ratón en un volumen de 35µL durante 10 días consecutivos. Para proceder a la administración y facilitar que el alérgeno alcanzara las vías respiratorias inferiores se sedaron a los animales (2.5% de isoflurano y 2% de oxígeno durante aproximadamente 2 minutos). Los animales

control recibieron solución fisiológica i.n. en lugar del extracto de HDM. Durante todo el estudio se monitorizó el peso y el estado general de los ratones siguiendo un protocolo estandarizado aprobado por el Comité de Ética de la UAB que evaluaba el comportamiento, sufrimiento, apariencia, postura y función respiratoria.

Pretratamiento con antagonista de EP₂

En algunos experimentos los animales sensibilizados se pretrataron con el antagonista selectivo de EP₂, PF-04418948 de Pfizer. Los ratones no pretratados recibieron vehículo (PBS con un 0.1% de DMSO). Como se describe en la **Figura 23B**, tanto el antagonista como el vehículo se administraron i.v. en un volumen de 10mL/kg una hora antes de la sensibilización.

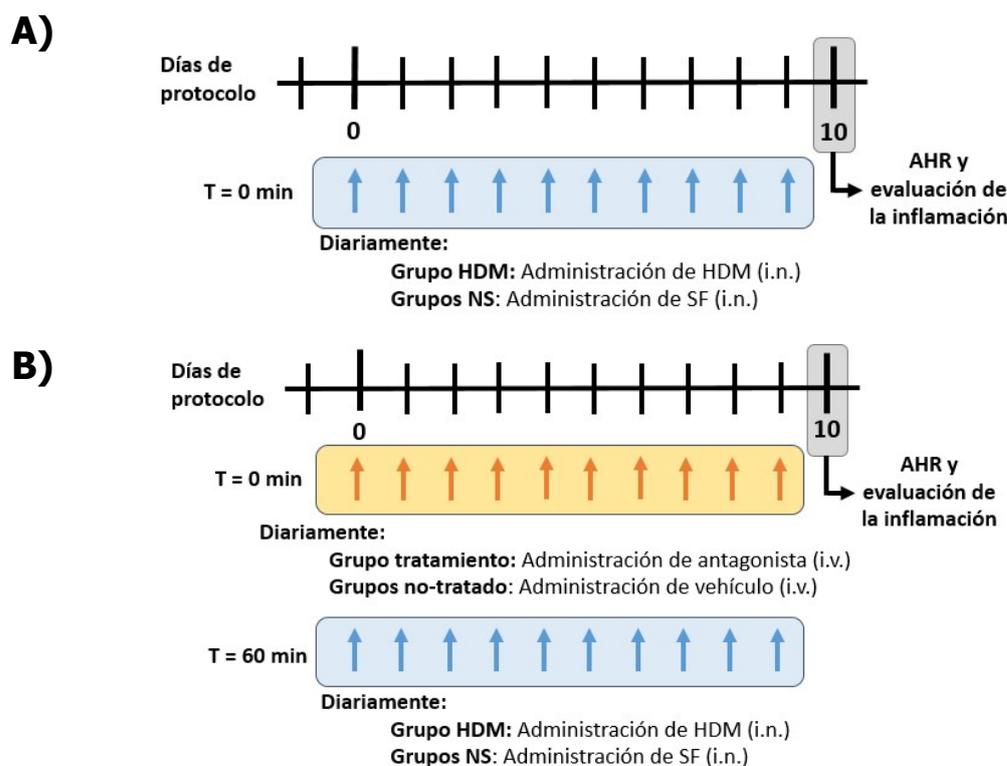


Figura 23. Protocolos experimentales. **(a)** Esquema del procedimiento de sensibilización con extracto HDM y **(b)** esquema del procedimiento de sensibilización junto al pretratamiento con antagonista. AHR (Evaluación de la hiperreactividad bronquial), HDM (Sensibilizado con ácaros del polvo), i.n. (Administración intranasal), i.v. (Administración intravenosa), NS (No sensibilizado), SF (Suero fisiológico).

- Evaluación de la respuesta de las vías respiratorias

Evaluación de la actividad mastocitaria en las vías respiratorias

La actividad mastocitaria de las vías respiratorias se evaluó midiendo la concentración de la proteasa-1 específica de los mastocitos de ratón (mMCP1) en “homogenados” de pulmón, triturando el tejido en un buffer de digestión. Después del BAL, los pulmones se extirparon y se les extrajeron las proteínas.

Para la extracción proteica se añadieron 250µL del tampón de lisis (**Tabla 44**) a los pulmones congelados y se homogeneizaron utilizando un politrón (*dispersing tool, DRIVE T8 12-18V, power supply unit 230V 50/60Hz, IKA®-WERKE GmbH Co.*). La solución resultante se centrifugó a 12050g durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se recogieron y se congelaron a -80°C hasta su análisis.

Tabla 44. *Tampón de lisis HEPES para la extracción de proteínas.*

Producto	Cantidad
Mini Complete Tablet	1 comprimido
Tampón HEPES 1M	1mL
Tritón X-100	10µL
PMSF 100mM disuelto en isopropanol	125µL
Agua ultrapura	19mL

Los niveles de mMCP1 se analizaron en el sobrenadante con un ensayo de ELISA (*Mouse MCPT-1 uncoated ELISA kit* de Invitrogen). La absorbancia se determinó por espectrofotometría utilizando el lector de placas (Spark® 10M, Tecan, Männedorf, Suiza) a 450nm usando 570nm como referencia. Los resultados se normalizaron por la concentración de proteína total en cada una de las muestras cuantificada utilizando el método de *Lovry*.

$$\text{pg mMCP} - 1 / \mu\text{g de proteína} = \frac{\text{Concentración de mMCP} - 1 \text{ (pg/mL)}}{\text{Concentración de proteína total (}\mu\text{g/mL)}}$$

Evaluación de la hiperreactividad bronquial

La reactividad de las vías respiratorias se evaluó a las 24 horas de la última administración de HDM exponiéndolas a concentraciones crecientes de metacolina nebulizada (0, 1.25, 2.5, 5, 10 y 20mg/mL). La posible hiperreactividad bronquial (AHR) se determinó midiendo la resistencia pulmonar (R_L) empleando un pletismógrafo Buxco FinePointe (Buxco, Troy, NY, EEUU). Previamente, los ratones se habían anestesiado mediante inyección intraperitoneal (i.p.) de una combinación de ketamina (100mg/kg) y xilacina (10mg/mL). Los animales se traqueotomizaron, y sus tráqueas se canulizaron con una aguja de calibre 18 para conectarlos al pletismógrafo donde fueron mantenidos ventilados durante todo el procedimiento con una bomba de aire (volumen tidal: 12.5mL/kg; frecuencia: 120 respiraciones/min; presión positiva: 2.5-3.0cm H₂O). La respuesta registrada correspondía a la máxima respuesta observada para cada dosis de metacolina durante un minuto al finalizar la nebulización. Los datos se normalizaron por la lectura basal.

Evaluación de la inflamación de las vías aéreas

Tras evaluar la AHR, los animales se sacrificaron y se les realizaron 2 lavados broncoalveolares (BAL) inyectando lentamente 0.3mL de PBS con un 2% de FBS por vía traqueal y recogiendo la suspensión

celular a los 30 segundos mediante aspiración. Las células en suspensión extraídas del BAL se tiñeron con una solución de Turk (0.01% cristal violeta en 1% de ácido acético) y se contaron en una cámara Neubauer (Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, Alemania). El *pellet* o sedimento se resuspendió en PBS al 2% de FBS y se centrifugó (citocentrífuga Shandon Cytospin 4, Thermo Electro Corporation, Cheshire, RU) a 40g durante 6 minutos para obtener las preparaciones. Finalmente, tras teñir con *Diff-Quick* se realizó el recuento diferencial contando un total de 300 células por individuo. Se calculó el número relativo de cada clase leucocitaria (eosinófilos, neutrófilos, linfocitos y macrófagos) en cada muestra según la siguiente fórmula:

$$\text{Cél. leucocitaria/mL} = \frac{\% \text{ del leucocito (respecto al total de 300)}}{\text{Concentración celular total } \left(\frac{\text{células}}{\text{mL}}\right)}$$

Diseño experimental

En la **Tabla 45** y la **Tabla 46** se describen los grupos empleados en el estudio de validación del receptor EP₂ como diana antiasmática.

Tabla 45. Grupos experimentales del estudio de validación del receptor EP₂ empleando el protocolo básico de sensibilización con HDM. HDM (Ácaros del polvo), TG (Animal Transgénico) y WT (Wild-type).

Grupo	Genotipo ratón	Sensibilización con HDM (25µg/ratón x 10 días)
Condición 1: No sensibilizado	WT / TG	-
Condición 2: Sensibilizado		+

Tabla 46. Grupos experimentales del estudio de validación del receptor EP₂ empleando el protocolo de sensibilización y pretratamiento. HDM (Ácaros del polvo), TG (Animal Transgénico), Veh. (Vehículo) y WT (Wild-type).

Grupo	Genotipo ratón	Sensibilización con HDM (25µg/ratón x 10 días)	Tratamiento con antagonista (mg/Kg)
Condición 1: No sensibilizado / sin tratamiento	WT / TG	-	Veh.
Condición 2: No sensibilizado / tratamiento (Dosis 2.5)		-	2.5
Condición 3: Sensibilizado / sin tratamiento		+	Veh.
Condición 4: Sensibilizado / tratamiento (Dosis 2.5)		+	2.5
Condición 5: Sensibilizado / tratamiento (Dosis 10)		+	10.0

- Análisis estadístico

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante *T-Student* con el software Sigma-Plot versión 12.0 (Systat Software Inc., San José, CA, EEUU), el test de ANOVA y el de Mann-Whitney con el software GraphPad Prism versión 7 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EEUU). Las diferencias se consideran estadísticamente significativas con una $p < 0.05$.

Tanto las representaciones gráficas como las tablas con los resultados recogen la media y el error estándar de la media de todos los valores obtenidos.

- Materiales y reactivos

A continuación, se detallan los equipos (**Tabla 47**), el material y los reactivos (**Tabla 48**) empleados en este Estudio 3.1.

Tabla 47. Equipos utilizados en el Estudio 3.1 del Sub-proyecto 3.

Descripción	Modelo	Casa comercial
Centrífuga	EBA 12R	Hettich Zentrifugen
Citocentrífuga	Shandon Cytospin 4	Thermo Electro Corporation
Lector de placas	Spark® 10M	Tecan
Microscopio	Primo Star	Zeiss
Pletismógrafo invasivo	Buxco® FinePointe	Buxco Europe Ltd.
Politrón y fuente de alimentación	IKA®-WERKE	Grob
Vaporizador Isoflurano	Isoflurano	MSS International

Tabla 48. Material y reactivos utilizados en el Estudio 3.1 del Sub-proyecto 3.

Reactivos	Casa Comercial	Referencia
Ácido acético	Scharlau	AC0344
Ácido sulfúrico	Scharlau	AC2070
Cristal violeta	Merk	101408
Diff-Quick	Medion Diagnostics	130832
DMSO	Sigma-Aldrich	D2650
FBS	Biowest	S1620-500
Folin & Ciocalteu's phenol	Sigma-Aldrich	F9252
HDM purificado	Alk-Abelló	NA
HEPES	Sigma-Aldrich	83264
Isoflurano	Esteve Veterinaria	13400264
Ketamina (Imalgene)	Merial	NA
Kit ELISA mMCPT-1	Invitrogen	88-7503-88
Lowry	Sigma-Aldrich	L3540
Metacolina	Sigma-Aldrich	A2251
PBS	Sigma-Aldrich	P3813

PF-04418948	Sigma-Aldrich	PZ0213
PMSF	Merk	10837091001
Suero fisiológico	BBraun	NA
Triton® X-100 PRS	Panreac	142314.1611
Xilacina (Xilagesic®)	Calier	NA

NA: No aplica.

- b) Estudio 3.2. Estudio de sinergismo entre agonismo EP₂ y neutralización de la IgE (omalizumab): comparación de versiones/variante de omalizumab (Sub-objetivo 3.2).

- **Determinación del sinergismo *in vitro***

Sistema celular

LAD2 fue la línea celular mastocitaria empleada para evaluar la posible sinergia entre omalizumab y el agonista EP₂ *in vitro*. Esta línea celular de mastocitos humanos derivada de un paciente con mastocitosis no tratado (*human leukemic mast cell line*) (78) fue cedida a nuestro equipo por los Dres. Arnold Kirshernbaum y Dean Metcalfe del NIAID-NIH de EEUU.

Condiciones de cultivo de mastocitos LAD2

Los mastocitos humanos LAD2 se cultivan en medio Stem Pro-34 suplementado con Stem-Pro Nutrient, Penicilina (100U/mL)/Streptomycin (100µg/mL), Glutamina (2mM) y SCF humano (100ng/mL) (78,82). Para su cultivo se usan T-Flask específicos para células en suspensión y se mantienen sin agitación en una incubadora a 37°C en un ambiente húmedo al 5% de CO₂. En condiciones óptimas las células LAD2 se duplican semanalmente. En cultivo no deben superar una concentración de 0.5·10⁶células/mL. Una concentración superior puede provocar la pérdida de propiedades específicas vitales para el ensayo. Por este motivo, semanalmente se cambia el medio de cultivo ajustando la concentración celular a 0.2·10⁶células/mL. Las células LAD2 requieren de metabolitos de desecho propios secretados en el medio para crecer. Por consiguiente, al hacer el cambio de medio se debe primero eliminar la mitad del medio de cultivo utilizado y reemplazarlo por la misma cantidad de medio nuevo precalentado a 37°C (hemidepleción). Antes de manipular las células se golpea suavemente el frasco de cultivo para soltar las que se hayan podido adherir al fondo. Si es necesario centrifugar se debe hacer a 250g durante 5 minutos a RT. Las células LAD2 son muy sensibles, fácilmente se lisan por choque osmótico.

Ensayo de liberación de β -hexosaminidasa

Para la medición de β -hexosaminidasa se debe utilizar un medio de cultivo sin factores de crecimiento (SCF) con el objetivo de detener la división celular y controlar la densidad. Una vez el medio de cultivo se ha atemperado, las células se pre-incuban durante 15min a 37°C y al 5% de CO₂ con el agonista de EP₂ (butaprost o evatanepag), omalizumab y/o vehículo (PBS). Posteriormente se sensibilizan con 100ng/mL de IgE conjugada a biotina y se vuelven a incubar en las mismas condiciones durante 16 horas. Al día siguiente se lavan 3 veces con “*buffer release*”, (previamente atemperado a 37°C) (**Tabla 24**). Inmediatamente después se traspasan a una placa de 96 pocillos en forma de U. A cada pocillo se transfieren 20000 células en un volumen de 90 μ L. Cada condición experimental se repite por quintuplicado en una misma placa. Tras atemperarlos durante 15 minutos se estimulan los mastocitos con 100ng/mL del antígeno específico estraptavidina diluido en PBS y se incuban durante 45 minutos a 37°C con 5% v/v de CO₂. Al añadir el antígeno el volumen final en cada pocillo debe ser de 100 μ L. Una vez se detiene la actividad mastocitaria sumergiendo la placa en agua refrigerada, se centrifugan las placas a 250g durante 10 min a 4°C. Se recogen 50 μ L de los sobrenadantes en una placa de lectura. Los pellets de las células se lisan mecánicamente homogeneizándolos con 150 μ L de agua destilada y sometidos a dos ciclos de 10 minutos de congelación a -80°C y 10 minutos de descongelación a 37°C. Los lisados también se recogen (50 μ L) en otra placa de lectura.

Tras la estimulación se analiza la concentración de β -hexosaminidasa mediante un ensayo fluorométrico usando 100 μ L/pocillo de PNAG al 3.5mg/mL como sustrato disuelto en tampón citrato (**Tabla 24**). La reacción enzimática se paró a los 90 minutos con 50 μ L de glicina (**Tabla 26**). Inmediatamente después de detener las reacciones se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 405nm con un filtro de referencia a 620nm usando un espectrofotómetro SPARK® 10M (Tecan, Männerdorf, Suiza). La concentración por pocillo se evaluó dos veces y la media de ambas mediciones se utilizó para analizar los porcentajes de desgranulación mastocitaria.

La desgranulación mastocitaria en las diferentes condiciones experimentales se expresa en porcentaje de liberación de β -hexosaminidasa teniendo en cuenta las absorbancias (OD) de los lisados celulares y de los sobrenadantes (83). Tal y como se detalla en el **Estudio 2.2 (Apartado Ensayo de actividad mastocitaria: liberación de β -hexosaminidasa de mastocitos)** la fórmula final con la que se calculan los porcentajes de liberación del mediador β -hexosaminidasa es la siguiente:

$$\%lib. \beta\text{-hexo.} = 100 \times \frac{2 \times (OD_{SN} - OD_{Blancos SN})}{((OD_{SN} - OD_{Blancos SN}) + 4 \times (OD_{LC} - OD_{Blancos LC}))}$$

Diseño experimental

A continuación, se presentan los experimentos *in vitro* del Estudio 3.2. En la **Tabla 49** se describe el diseño de los experimentos en los que se estudió la capacidad inhibitoria de los dos agonistas EP₂ evaluados, butaprost y evatanepag. El del estudio *in vitro* de sinergismo se detalla en la **Tabla 50**. Todas las condiciones se estudiaron por quintuplicado.

Tabla 49. Grupos experimentales para la caracterización de la capacidad inhibitoria mastocitaria de los agonistas de EP₂ butaprost y evatanepag mediante el ensayo de liberación de β -hexosaminidasa en LAD2. hIgE (Inmunoglobulina E humana), SA (Streptavidina).

Grupo (hIgE/Antígeno/Agonista)	hIgE anti-SA (100ng/mL)	SA (100ng/mL)	Agonista (Butaprost/Evatanepag) (μ M)
Control – (-/-/-)	-	-	-
Control – (-/-/+)	-	-	30
Control – (-/+/-)	-	+	-
Control – (-/+/+)	-	+	30
Control – (+/-/-)	+	-	-
Control – (+/-/+)	+	-	30
Control + (+/+/-)	+	+	-
Condición 1: Agonista 0.03 μ M	+	+	0.03
Condición 2: Agonista 0.1 μ M	+	+	0.1
Condición 3: Agonista 0.3 μ M	+	+	0.3
Condición 4: Agonista 1.0 μ M	+	+	1
Condición 5: Agonista 3.0 μ M	+	+	3
Condición 6: Agonista 10.0 μ M	+	+	10
Condición 7: Agonista 30.0 μ M	+	+	30

Tabla 50. Grupos experimentales para la evaluación del sinergismo de los agonistas de EP₂ (butaprost y evatanepag) junto a omalizumab del producto comercializado Xolair® mediante el ensayo de liberación de β -hexosaminidasa en LAD2. hIgE (Inmunoglobulina E humana), SA (Streptavidina).

Grupo (hIgE/Antígeno)	hIgE anti-SA (100ng/mL)	SA (100ng/mL)	Omalizumab (Xolair®) (μ g/mL)	Agonista (Butaprost/Evatanepag) (μ M)
Control – (-/-)	-	-	-	-
Control – (-/+)	-	+	-	-
Control – (+/-)	-	+	-	-
Control + (+/+)	+	+	-	-
Condición 1: Xolair® (10:1)	+	+	1	-
Condición 2: Xolair® (30:1)	+	+	3	-
Condición 3: Agonista 10 μ M	+	+	-	10

Grupo (hIgE/Antígeno)	hIgE anti-SA (100ng/mL)	SA (100ng/mL)	Omalizumab (Xolair®) (µg/mL)	Agonista (Butaprost/Evatanepag) (µM)
Condición 4: Agonista 20µM	+	+	-	20
Condición 5: Agonista 30µM	+	+	-	30
Condición 6: Agonista 40µM	+	+	-	40
Condición 7: Xolair® (10:1) + Agonista 10µM	+	+	1	10
Condición 8: Xolair® (10:1) + Agonista 20µM	+	+	1	20
Condición 9: Xolair® (10:1) + Agonista 30µM	+	+	1	30
Condición 10: Xolair® (10:1) + Agonista 40µM	+	+	1	40
Condición 11: Xolair® (30:1) + Agonista 10µM	+	+	3	10
Condición 12: Xolair® (30:1) + Agonista 20µM	+	+	3	20
Condición 13: Xolair® (30:1) + Agonista 30µM	+	+	3	30
Condición 14: Xolair® (30:1) + Agonista 40µM	+	+	3	40

- Determinación de sinergismo *in vivo* (PCA)

Animales de experimentación

Se usaron ratones transgénicos (FcεRI^{-/-} hFcεRI⁺) humanizados con fondo genético BALB/c. A estos ratones se les ha eliminado el receptor de ratón de alta afinidad de la IgE (FcεRI) y en su lugar expresan el receptor homólogo humano (FCER1A o hFcεRIα) (84). Receptor localizado principalmente en la superficie de mastocitos y basófilos y controlado por el promotor humano de FCER1A con la mutación FcεR1a^{tm1Knt} (85–88). Se criaron en el Estabulario Central de la Universitat Autònoma de Barcelona a partir de dos pares de progenitores cedidos a nuestro laboratorio por el Dr. Jean-Pierre Kinet del Beth Israel Deaconess Medical Center de la Universidad de Harvard (MA, EEUU). Los ratones se dividieron en grupos aleatorios que incluían de una forma equitativa tanto machos como hembras de entre 8-15 semanas de edad y pesos de entre 20-40 gramos. Al tratarse de una colonia propia la disponibilidad de animales y la posibilidad de seleccionar la edad, tamaño y/o sexo está limitada. Todos los animales fueron estabulados en grupos de 2-6 animales en racks ventilados Allentown Inc. (Allentown, NJ, EEUU). Cada rack contenía material de cama (Ecopure, Datesand, Manchester, UK), y pienso en forma de *pellets* (Tecklad, Envigo, Cambridgeshire, UK) y agua *ad libitum*. Las condiciones ambientales de la sala de estabulación se mantenían controladas: temperatura 20±1°C, humedad 60±10% y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Para reducir el estrés durante el experimento, y consecuentemente, la posible alteración de los resultados, se estableció un período de adaptación de 1 semana antes que permitió la aclimatación de los ratones al bioterio y a la manipulación por parte del investigador.

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética para la Investigación Animal de la Universitat Autònoma de Barcelona (España). El experimento se ejecutó de acuerdo con

la legislación española; Real Decreto 53/2013 relativo a la “Protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos”, y de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y el Consejo (89,90)

Sensibilización

Para la determinación del sinergismo *in vivo* se empleó el modelo de PCA descrito en 1985 por Z. Ovary *et al.* (91,92). Los ratones se exponen a isoflurano al 2-3% durante 2-5 minutos. Cuando adquieren un plano anestésico adecuado, se traspasan a una camilla donde se mantienen bajo sedación. En la oreja izquierda se inyectan i.d. 20 μ L de una solución de IgE humana anti-NP quimérica preparada mediante dilución 1:1 de la solución de IgE madre con PBS hasta alcanzar una concentración aproximada de 15 μ g/mL (dosis de sensibilización de 300ng). Omalizumab y butaprost se co-administran junto a la IgE. En la oreja derecha se inyectan 20 μ L de suero fisiológico como control negativo. A las 24 horas se administra el antígeno (NP-BSA). Los ratones bajo plano anestésico se tratan i.v. por el seno retro-orbital de 100 μ L de una dosis de 200 μ g de NP-BSA en PBS con un 1% de Evans Blue. Protocolo esquematizado en la **Figura 24**.

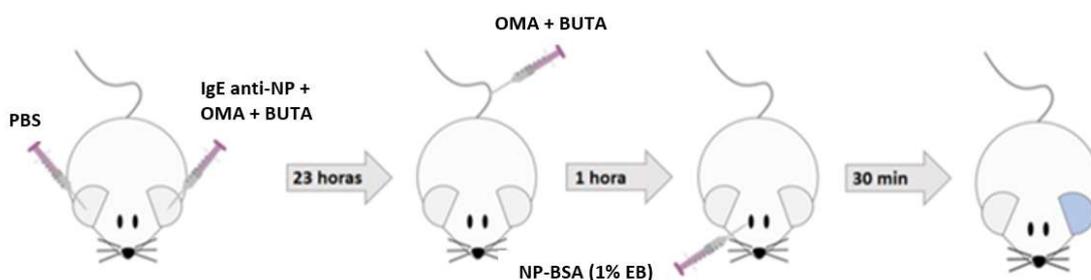


Figura 24. Esquema del protocolo del modelo de anafilaxia cutánea pasiva (PCA) para estudiar sinergismo en ratones transgénicos (*FcεRI*^{-/-} *hFcεRI*⁺). BSA: Albúmina sérica bovina, BUTA: Butaprost, EB: Evans Blue, OMA: Omalizumab, PBS: Tampón fosfato salino, NP: Nitrofenol.

Tratamiento con omalizumab y butaprost

Tal y como se describe en la **Figura 24**, se realizaron dos administraciones de omalizumab y/o butaprost. La primera administración se efectuó en el momento de la sensibilización. A la solución de IgE se le incluyó la cantidad de omalizumab y/o butaprost según la relación que se deseaba obtener para cada compuesto (**Tabla 51**). Posteriormente, se incubó 20 minutos a RT antes de ser inyectada. La segunda administración se realizó i.v. por la cola 23 horas después de la sensibilización. Se administró la misma dosis de omalizumab y/o butaprost que en la primera administración diluidos en 100 μ L de PBS. Una hora después se llevó a cabo la inoculación del antígeno. Las concentraciones de omalizumab y/o butaprost se determinaron en base a resultados previos.

Evaluación de la reacción anafiláctica

Media hora después de suministrarse el antígeno se sacrifican los animales con CO₂. Las orejas se escinden, se trocean y finalmente se sumergen en 700µL de formamida a 55°C durante 2 horas para extraer el colorante Evans Blue. Las muestras se centrifugan a 12050g durante 10 minutos a RT. En una placa se recogen 200µL de sobrenadante de cada muestra de oreja que se leen por duplicado. La absorbancia, que se correlaciona con la cantidad de Evans Blue en las muestras de tejido, se determinó a 620nm con un espectrofotómetro (Spark® 10M, Tecan, Männerdorf, Suiza).

Cuantificación de la respuesta dérmica

A partir de las absorbancias se calculó el porcentaje de inhibición con la siguiente fórmula:

$$\%inhibición = 100 - \left(\frac{OD_{oi} - OD_{od}}{OD_{Control\ positivo} - OD_{Control\ Negativo}} \times 100 \right)$$

OD_{oi/od}: Densidad óptica de la oreja izquierda u oreja derecha

OD_{Control positivo}: Densidad óptica media de todos los controles positivos

OD_{Control negativo}: Densidad óptica media de todos los controles negativos

Diseño experimental

En la **Tabla 51** se describen los grupos empleados en el estudio de evaluación del sinergismo entre omalizumab y butaprost.

Tabla 51. Grupos experimentales para el estudio del sinergismo omalizumab/butaprost mediante PCA. Buta (Butaprost), BSA (Albumina sérica bovina), hIgE (Inmunoglobulina E humana), NP (Nitrofenol), TG (Transgénico) y WT (Wild type).

Grupo	Genotipo ratón	Tratamiento		hIgE anti-NP (300ng)	NP-BSA (200µg)	Tamaño (n)
		Omalizumab (µg)	Butaprost (µg)			
Control -	WT	-	-	+	-	4
Control -	WT	-	-	+	+	4
Control -	TG	-	-	+	-	4
Control +	TG	-	-	+	+	4
Xolair® (10:1)	TG	3	-	+	+	4
Butaprost (3µg)	TG	-	3	+	+	4
Butaprost (12µg)	TG	-	12	+	+	4
Xolair® + Buta (10:1 / 3µg)	TG	3	3	+	+	4
Xolair® + Buta (10:1 / 12µg)	TG	3	12	+	+	4

- Análisis estadístico

Tanto los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* como *in vivo* se analizaron estadísticamente mediante la prueba T-Student (*2-tailed Student's t test*) con el software Sigma-Plot versión 12.0 (Systat Software Inc., San José, CA, EEUU). Las diferencias se consideran estadísticamente significativas con una $p < 0.05$.

Las representaciones gráficas de los resultados recogen la media y el error estándar de la media de todos los valores obtenidos.

- Materiales y reactivos

Todos los reactivos utilizados para realizar los ensayos *in vitro* e *in vivo* del Estudio 3.2 fueron de la pureza adecuada para su finalidad y se detallan a continuación.

Tabla 52. Equipos utilizados en el Estudio 3.2 del Sub-proyecto 3 (ensayos de liberación de β -hexosaminidasa y PCA).

Descripción	Modelo	Casa comercial
Centrífuga para eppendorfs	EBA 12R	Hettich Zentrifugen
Centrífuga para tubos y placas	5810 R	Eppendorf
Lector de placas	Spark® 10M	Tecan
Rack Ventilados	NexGen™ Mouse 500	Allentown Inc.
Vaporizador Isoflurano	Isoflurano	MSS International

Tabla 53. Reactivos utilizados en el Estudio 3.2 del Sub-proyecto 3. Además, se deben incluir los reactivos relacionados con el ensayo β -hexosaminidasa en LAD2 descritos en la **Tabla 27** y los utilizados en el modelo de PCA incluidos en la **Tabla 33**.

Reactivos	Casa Comercial	Referencia
Butaprost	Cayman Chemical	13740
Evatanepag	MedChemExpress	HY-14839
Xolair®	Novartis Europharm Ltd.	NA

NA: No aplica.

4.3.3. Resultados y discusión

A continuación se describen y discuten los resultados de cada Estudio del Sub-proyecto 3.

a) Estudio 3.1. Validación del agonismo EP₂ como estrategia de inhibición mastocitaria (Sub-objetivo 3.1).

Para validar la capacidad inhibitoria mastocitaria del agonismo de EP₂ se sensibilizaron ratones TG que sobreexpresaban EP₂ en los MC y se evaluaron tres fenómenos clave en la respuesta asmática: la actividad mastocitaria, la inflamación de las vías respiratorias y la AHR. Una vez corroborado *in vivo* el papel del receptor EP₂ mastocitario, se evaluó la capacidad inhibitoria de dos agonistas específicos de EP₂.

Parte de los resultados de este Estudio 3.1 han sido publicados en la revista Allergy, la revista más prestigiosa internacionalmente de alergia clínica y experimental: Urbano et al. 2021 "Transgenic mice overexpressing the PGE₂ receptor EP₂ on mast cells exhibit a protective phenotype in a model of allergic asthma", Allergy. Oct;76(10):3196-3199 (DOI: 10.1111/all.14988) (106).

- Evaluación de la actividad mastocitaria

Se evaluó la actividad mastocitaria cuantificando la expresión de mMCP1 en los pulmones.

Impacto de la sobreexpresión del receptor EP₂ en la actividad mastocitaria

Se evaluó el efecto de la sobreexpresión de EP₂ en la actividad mastocitaria de animales sensibilizados con HDM (**Figura 25A**). Los ratones WT y los TG no sensibilizados mostraron una actividad basal equivalente, prácticamente nula, reflejando probablemente que en los ratones TG no se altera el número basal de MC en las vías respiratorias. La actividad mastocitaria se incrementó significativamente al sensibilizar ambos grupos. Sin embargo, los animales TG sensibilizados exhibían una actividad mastocitaria notablemente menor que los WT. La producción de mMCP1 fue inferior en un 66%.

Una mayor presencia de receptores EP₂ en la superficie de los MC previene su activación *in vivo* por alérgenos de HDM. Esto sugiere que algún mecanismo natural endógeno, probablemente mediado por PGE₂ (107), activa espontáneamente los receptores EP₂ previniendo la liberación de mediadores.

Efecto del antagonismo del receptor EP₂ en la actividad mastocitaria

Para confirmar que la reducción en la producción de mediadores mastocitarios estaba modulada específicamente por el receptor EP₂ se evaluó la actividad mastocitaria en ratones sensibilizados previamente tratados con el antagonista selectivo de EP₂ PF-04418948 (**Figura 25B**). La administración del antagonista en animales no sensibilizados, tanto TG como WT, no afectó a la actividad mastocitaria basal (resultados no presentados en las gráficas). En ambos genotipos la presencia del antagonista fomentó de forma dosis-dependiente el aumento de la actividad mastocitaria inducida por la sensibilización con HDM. Las diferencias significativas presentes entre los grupos WT y TG

sensibilizados no pretratados se anularon en los ratones pretratados con el antagonista. El bloqueo específico de los receptores EP₂ previene el efecto protector espontáneo inducido por la sobreexpresión de EP₂ en los animales TG neutralizando la diferencia entre WT y TG. Sin este mecanismo protector endógeno los MC sensibilizados liberan una mayor cantidad de mediadores (histaminas, prostaglandinas y leucotrienos) que contribuyen junto a otros colectivos celulares a aumentar el proceso inflamatorio e hiperreactividad bronquial. En otras palabras, se incrementa la respuesta patofisiológica.

En una reciente publicación de nuestro grupo (104), de la que el firmante de esta tesis es coautor, se demostró que el antagonismo de EP₂ potenciaba la actividad mastocitaria *in vitro*. La observación de este fenómeno *in vivo* añade fuerza a nuestra hipótesis. El bloqueo de los receptores EP₂ impide la interacción de la PGE₂ endógena con estos y, por lo tanto, no se previene la activación de los MC.

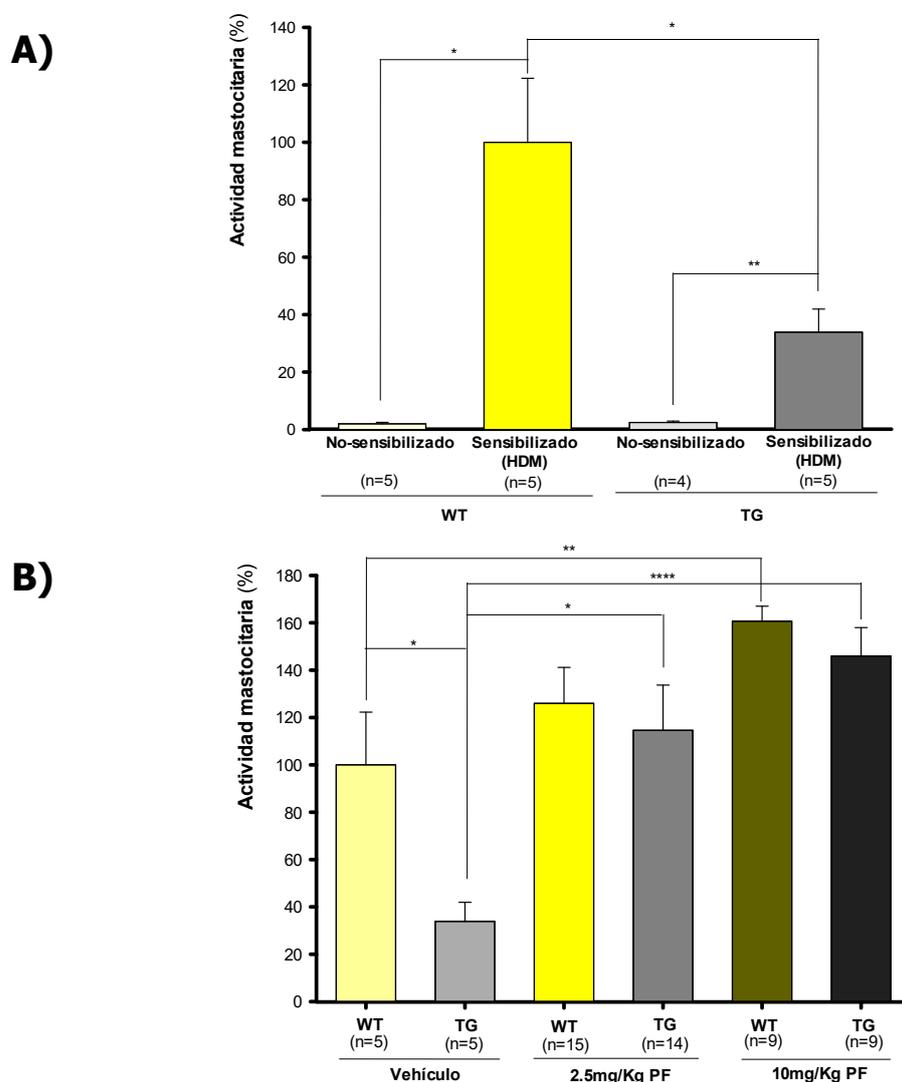


Figura 25. Actividad mastocitaria de ratones WT y TG que sobreexpresan el receptor EP₂ en los MC. **(a)** Comparación entre grupos sensibilizados y no sensibilizados por exposición a HDM durante 10 días y **(b)** pretratados con el antagonista selectivo PF-04418948. La actividad mastocitaria se evaluó al medir la producción local de la proteína mMCP1 en extractos de pulmones y normalizarla con la proteína total determinada mediante el método de Lowry. Los resultados se representan como media \pm SEM. (**p*-valor < 0.05, ***p*-valor < 0.01, ****p*-valor < 0.001, y *****p*-valor < 0.0001). HDM (Ácaros del polvo); mMCP1 (Proteasa 1 de mastocito de ratón); PF (PF-04418948); TG (Transgénico); WT (Wild type).

- Evaluación del proceso inflamatorio de las vías respiratorias

Para estudiar las consecuencias de la reducción de la actividad mastocitaria se cuantificó el proceso inflamatorio mediante el recuento de células inflamatorias en BAL.

En la **Figura 26A** se muestra que los animales sensibilizados con HDM desarrollaron un proceso inflamatorio broncovascular con predominancia de eosinófilos. De la misma forma que en la actividad mastocitaria, el número de eosinófilos fue menor en los animales TG que en los WT sensibilizados. Sin embargo, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, se alteró cualitativamente y cuantitativamente el perfil celular del proceso inflamatorio. La disminución en el número de eosinófilos se equilibró con un incremento relativo del número de macrófagos. Tanto el número de neutrófilos como de linfocitos se mantuvo equivalente en TG y WT. Por lo tanto, de igual forma que lo observado en la actividad mastocitaria, los ratones que sobreexpresan EP₂ parecen presentar un reclutamiento eosinofílico inferior respecto a los animales WT. La inflamación de las vías respiratorias se evaluó también tras pretratar a los ratones sensibilizados con el antagonista de EP₂ PF-04418948 (**Figura 26B**). Los resultados obtenidos muestran un efecto similar al observado en la actividad mastocitaria. Tanto los animales TG como WT pretratados exhibieron un incremento dosis-dependiente significativo en la infiltración eosinofílica en presencia del antagonista. Aunque estadísticamente no existen diferencias, en todas las condiciones experimentales los TG presentan un menor número de eosinófilos en comparación con los WT.

En ratones, la exposición a extractos de HDM provoca un proceso inflamatorio mediado por eosinófilos (108) inducido probablemente en parte por los MC a través de mediadores inflamatorios como la IL-5 (109,110). Los resultados obtenidos sugieren que la señal pro-inflamatoria ejercida por la activación de los MC en contacto con los aeroalérgenos, es contrarrestada por un mecanismo interno compensatorio directamente relacionado con los receptores EP₂. Cuando el efecto protector de la sobreexpresión de EP₂ es neutralizado farmacológicamente con el antagonista, el bloqueo mastocitario natural desaparece y estos liberan mediadores que reclutan células que intensifican el proceso inflamatorio. La neutralización de la activación del receptor EP₂ por el antagonista ocurre tanto en ratones TG como en WT. La diferencia entre los grupos análogos se reduce a medida que la concentración de antagonista aumenta. Este comportamiento refuerza la hipótesis de que la estimulación endógena de EP₂ es un mecanismo de protección natural. Aunque no existen diferencias estadísticamente significativas, el hecho de que los datos sean consistentes en el proceso inflamatorio y en la actividad mastocitaria, y que además se alineen con observaciones previas al estimular selectivamente EP₂ (94) nos permite sustentar nuestra teoría; existe un mecanismo compensatorio, posiblemente a través del eje PGE₂-EP₂-MC, que al activarse contrarresta la actividad mastocitaria y, en consecuencia, el reclutamiento de eosinófilos.

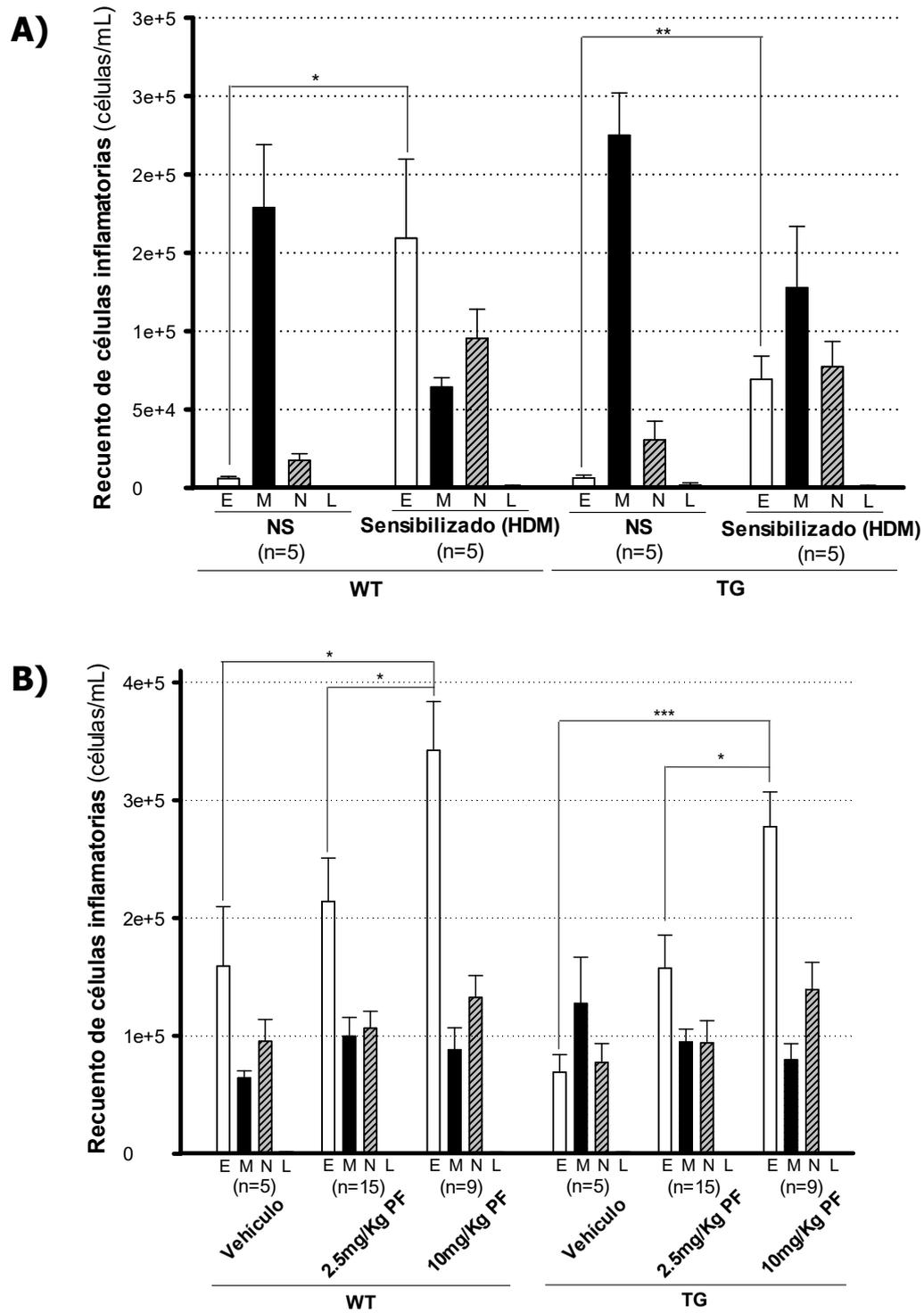


Figura 26. Evaluación de la inflamación de las vías aéreas mediante recuento diferencial de células inflamatorias (E, eosinófilos; M, macrófagos; L, linfocitos; N, neutrófilos). **(a)** Impacto de la sobreexpresión del receptor EP₂ al sensibilizar y **(b)** pretratar con el antagonista específico PF-04418948. Los resultados muestran las medias \pm SEM. (*p-valor<0.05, **p-valor<0.01 y ***p-valor<0.001). HDM (Sensibilizado con ácaros del polvo); NS (No sensibilizado); PF (PF-0441848); TG (Transgénico); WT (Wild type).

- Evaluación de la AHR

Estudios previos realizados en modelos de ratón indicaban que los eosinófilos junto a los MC son los principales responsables de la AHR que se desarrolla en pacientes asmáticos (108,111). Por lo tanto, para determinar la consecuencia de la disminución de la actividad mastocitaria atribuible a la actividad de EP₂ se evaluó mediante pletismografía invasiva la reactividad de las vías respiratorias de ratones sensibilizados con HDM a concentraciones crecientes de metacolina.

La reactividad bronquial en los ratones TG no sensibilizados era equiparable a la de los ratones WT no sensibilizados, presentando una curva base típica dosis-respuesta (**Figura 27A**). La curva dosis respuesta reprodujo un patrón de R_L atribuible a la exposición durante 10 días a un extracto de HDM. La sensibilización provocó AHR en los ratones WT. La resistencia pulmonar a la concentración más alta de metacolina (20mg/mL) en los ratones WT sensibilizados se vio incrementada en un 63.1% en comparación con el grupo WT no sensibilizado. Sin embargo, los ratones TG, que exhiben una sobreexpresión constitutiva de EP₂ en los MC, no desarrollaron AHR como consecuencia de la exposición a HDM. Las curvas dosis-respuesta a metacolina en los TG sensibilizados y no sensibilizados, presentaban un perfil muy similar, prácticamente superponible. La mayor actividad de los MC y la mayor presencia de eosinófilos en las vías respiratorias de los animales WT sensibilizados se tradujeron en un aumento de la AHR. La menor actividad mastocitaria y la reducción en la inflamación eosinofílica en los animales TG, probablemente previno el desarrollo de AHR. Estos resultados demuestran preliminarmente que la sobreexpresión de EP₂ en MC protege frente a la AHR.

En la **Figura 27B** se presentan los datos del efecto de la administración del antagonista sobre la AHR. La administración del antagonista de EP₂ no alteró los niveles basales en los grupos no sensibilizados. Sin embargo, la prevención natural de la AHR que ejercía la sobreexpresión de EP₂ en los mastocitos fue anulada por el bloqueo específico de los receptores EP₂. En presencia del antagonista independientemente de la dosis (2.5 o 10mg/Kg), TG y WT mostraron unos niveles de R_L altos y similares. Al bloquear farmacológicamente los receptores EP₂ no solo se neutralizó el efecto beneficioso derivado de su activación, sino que cualquier diferencia entre WT y TG se anuló. Se demostró que el efecto inhibitorio sobre los MC consecuencia de la estimulación endógena de los receptores EP₂ previno el desarrollo de AHR en el modelo de asma alérgica en ratones expuestos a HDM.

Por lo tanto, se ha validado el efecto protector de EP₂ en la respuesta asmática conectando tres fenómenos clave: la actividad mastocitaria, el proceso inflamatorio y la reactividad bronquial. Además, se ha demostrado que la actividad mastocitaria se puede modular a través de este receptor. Observar que el bloqueo específico de EP₂ empeora los efectos dañinos de la sensibilización con HDM y revierte el efecto protector de la sobreexpresión de EP₂ sugiere, de una manera firme, que el eje PGE₂-EP₂-MC actúa de forma natural como una barrera defensiva ante la agresión que suponen los aeroalérgenos de

HDM. Por lo tanto, es probable que exista una analogía en el efecto resultante del agonismo EP₂ y el de la neutralización de la IgE. Por eso parece razonable pensar en un posible sinergismo farmacológico.

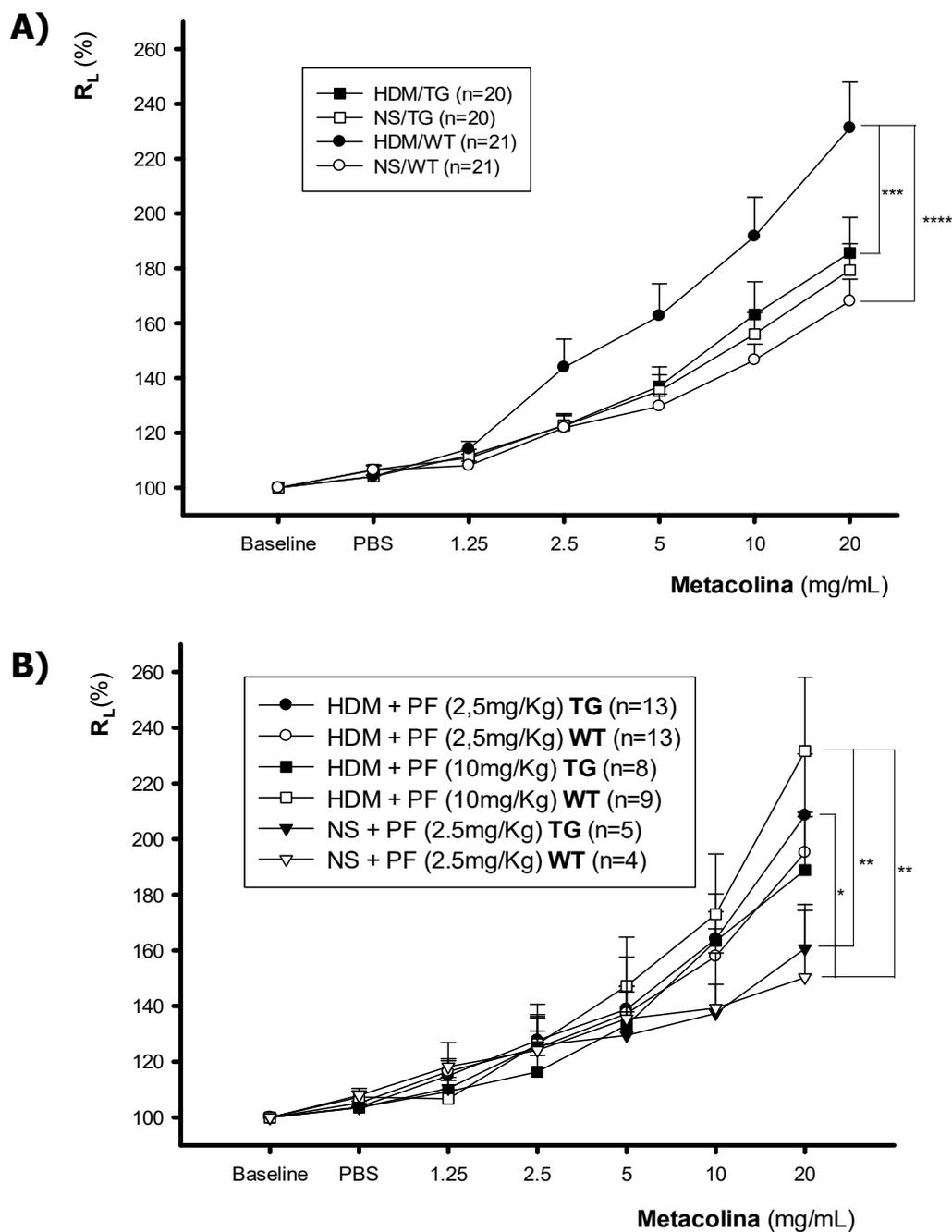


Figura 27. Hiperreactividad de las vías aéreas evaluada mediante un sistema de pletismografía invasiva y expresado como porcentaje de resistencia pulmonar (%R_L). **(a)** Respuesta de las vías aéreas a la sensibilización con HDM en ratones WT y TG. **(b)** Comparación entre grupos TG y WT tratados con el antagonista PF-0441848. Los resultados muestran las medias ± SEM. (*p-valor < 0.05, **p-valor < 0.01, ***p-valor < 0.001 y ****p-valor < 0.0001). HDM (Sensibilizado con ácaros del polvo); NS (No sensibilizado); PF (PF-0441848); PBS (Tampón fosfato); TG (Transgénico); WT (Wild type).

- **Comparación de la modulación en la desgranulación de MC mediante agonismo EP₂**

Una vez validado el papel inhibitorio sobre los MC de la activación de EP₂ y para finalizar este Estudio se propuso evaluar la capacidad de dos agonistas específicos del receptor EP₂ en la modulación de la desgranulación mastocitaria *in vitro*.

Se comparó el efecto en la liberación de mediadores mastocitarios de células LAD2. En la **Figura 28** y la **Figura 29** se representa el efecto *in vitro* sobre la desgranulación mastocitaria de los dos agonistas del receptor EP₂, butaprost y evatanepag. Se escogieron por su especificidad, pero sobre todo por su diferente naturaleza química (112). Se estudió el efecto de los agonistas a 7 concentraciones distintas seleccionadas en base a estudios previos presentados en la tesis de la Dra. Plaza (99). Previamente, se ajustaron las concentraciones realizando experimentos de prueba para asegurar que el rango de estudio era el adecuado. La **Figura 28** muestra el efecto del primer agonista, butaprost. La sensibilización mediada por la IgE y su antígeno específico inducen ≈80% de liberación de β-hexosaminidasa. Butaprost no afecta a la liberación basal, inferior al 10% en todos los controles negativos. Sin embargo, tiene un efecto inhibitorio concentración dependiente en MC sensibilizados expuestos a un antígeno específico. El efecto inhibitorio de butaprost es nulo a la concentración más baja estudiada (0.03μM). A medida que la concentración del agonista aumenta el porcentaje de liberación disminuye hasta prácticamente inhibir por completo la actividad mastocitaria (87% de inhibición respecto al control positivo) a la concentración más alta probada (30μM). En el estudio de la modulación con evatanepag (**Figura 29**) se obtuvo una liberación de β-hexosaminidasa máxima equivalente a la del estudio de butaprost (≈70%). De la misma forma que butaprost, evatanepag tampoco interfiere en la actividad basal, que se mantuvo por debajo del 10%. Evatanepag inactiva los MC pero en comparación con butaprost su capacidad inhibitoria es significativamente menor. El poder de inhibición de evatanepag no aumenta de forma directamente proporcional a la concentración de agonista administrada, pero se observa una tendencia. Esto hace que el mayor efecto, 24% de inhibición, se alcance en la concentración de 10μM. En la concentración más alta (30μM) se alcanza un nivel de inhibición del 11%.

Los resultados demuestran que el agonismo de EP₂ disminuye la liberación de mediadores mastocitarios. Se corrobora que EP₂ modula la actividad de los MC. Ambos agonistas ejercen un efecto inhibitorio dosis-dependiente. La capacidad inhibitoria de butaprost es mucho mayor que la de evatanepag, resultado que se correlaciona con las constantes de afinidad de ambos compuestos. Se verifica que butaprost es más afín a EP₂ que evatanepag.

Además de validar el efecto antiasmático del receptor mastocitario EP₂, este Estudio 3.1 ha permitido corroborar que el agonismo de EP₂ tiene similitud farmacodinámica con omalizumab y que probablemente las consecuencias fisiopatológicas en ambos casos sean similares. Mediante distintos mecanismos de acción ambas estrategias permiten prevenir la actividad mastocitaria. Este efecto

compartido permite plantear la hipótesis que el efecto resultante de su administración individual podría verse potenciado por un efecto sinérgico en administración conjunta.

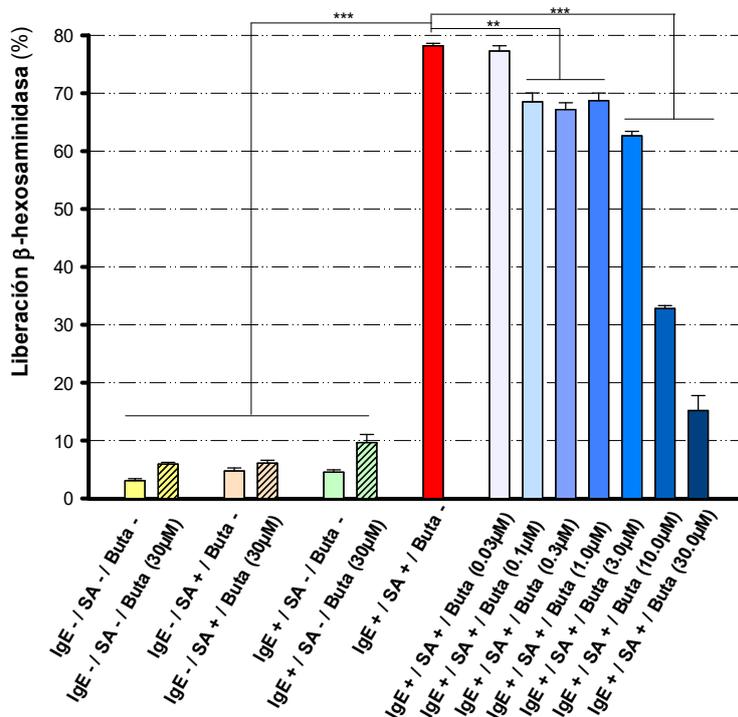


Figura 28. Efecto del agonista selectivo de EP2 butaprost en la desgranulación mastocitaria en la línea celular humana de mastocitos LAD2. Cada grupo experimental se evaluó por quintuplicado. Se expresa la media \pm SEM. (*p-valor<0.05, **p-valor<0.01 y ***p-valor<0.001). Buta (Butaprost), IgE (Inmunoglobulina E), SA (estreptavidina).

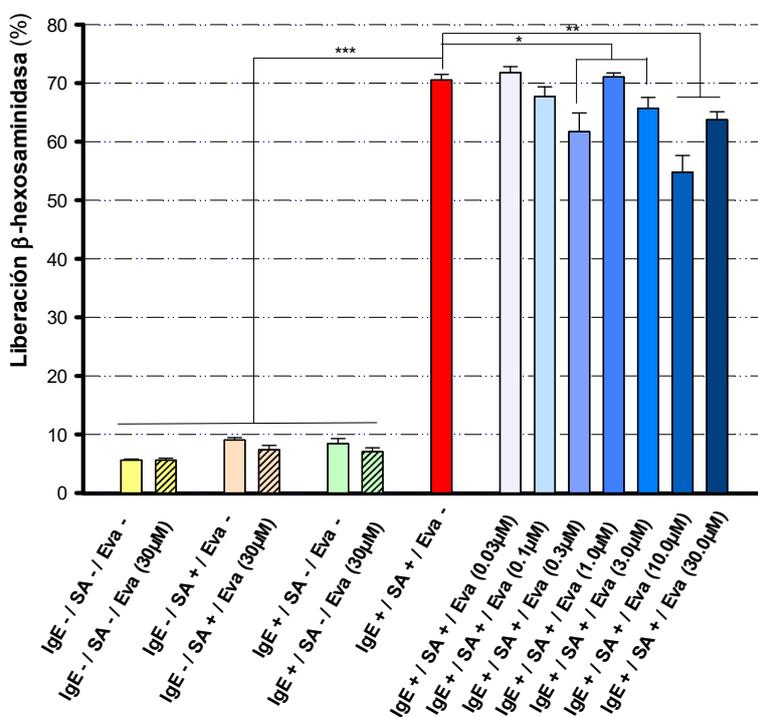


Figura 29. Efecto del agonista selectivo de EP2 evatanepag en la desgranulación mastocitaria en la línea celular humana de mastocitos LAD2. Cada grupo experimental se evaluó por quintuplicado. Se expresa la media \pm SEM. (*p-valor<0.05, **p-valor<0.01 y ***p-valor<0.001). Eva (Evatanepag), IgE (Inmunoglobulina E), SA (estreptavidina).

- a) Estudio 3.2. Estudio de la sinergia entre agonismo EP₂ y neutralización de la IgE (omalizumab): comparación de versiones/variante de omalizumab (Sub-objetivo 3.2).

Tras validar la capacidad inhibitoria mastocitaria del agonismo de EP₂ y evaluar el efecto *in vitro* de dos agonistas específicos, se analizó el efecto sinérgico entre agonismo EP₂ y bloqueo de la IgE por omalizumab en dos ensayos, uno *in vitro* y otro *in vivo*.

- **Estudio *in vitro* del efecto sinérgico entre agonismo EP₂ y neutralización de la IgE**

Se evaluó y comparó el efecto sinérgico de la administración conjunta de cada agonista EP₂ y omalizumab.

En la **Figura 30A** se muestra el efecto *in vitro* de butaprost en combinación con omalizumab sobre la desgranulación mastocitaria. Al sensibilizar las células con IgE y administrarles un antígeno específico se alcanzó una liberación de β -hexosaminidasa de $\approx 80\%$. De la misma forma que en los ensayos anteriores, en los controles negativos la liberación basal es inferior al 10%. Individualmente tanto butaprost como omalizumab inhiben la liberación de mMCP-1; efecto que aumenta al incrementar la cantidad de fármaco administrado. Al combinarlos, en la concentración de omalizumab 10:1, el efecto de butaprost se añade al de omalizumab (**Tabla 54**). No se observa una potenciación del efecto como se esperaría en un hipotético caso de sinergismo. En cambio, en la concentración de omalizumab 30:1, butaprost no tiene efecto, el porcentaje de liberación de todas las condiciones es similar e incluso mayor al de la condición en la que se administra únicamente omalizumab. Esta primera aproximación no permite concluir que exista un efecto sinérgico *in vitro* entre los dos compuestos: simplemente se observa un efecto sumatorio cuando la concentración de Xolair® es baja.

Tabla 54. Efectos inhibitorios de las condiciones estudiadas en la **Figura 30A**.

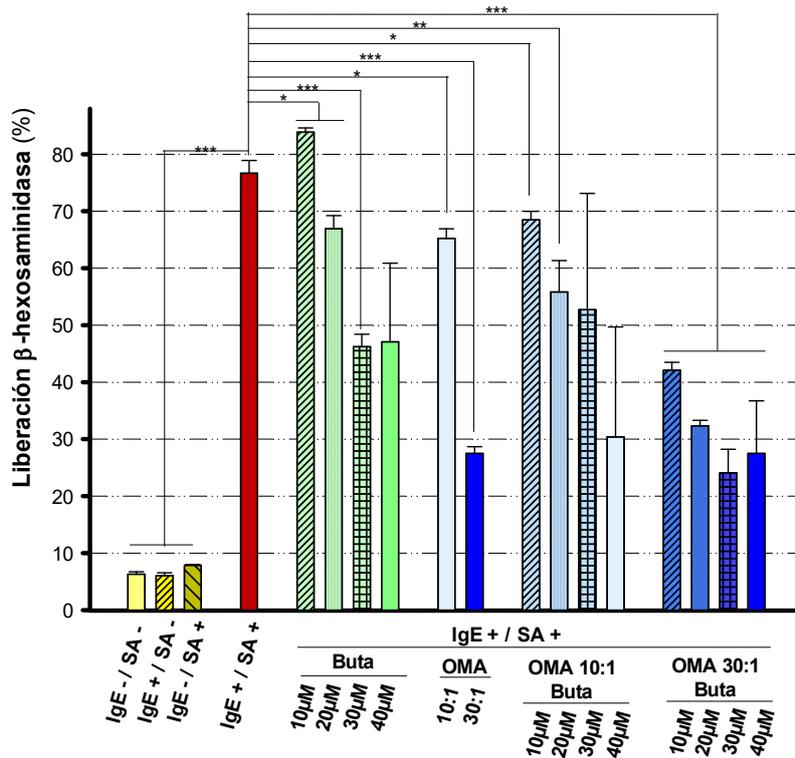
% Inhibición	Inhibición individual	Butaprost (10 μ M)	Butaprost (20 μ M)	Butaprost (30 μ M)	Butaprost (40 μ M)
Inhibición individual		-10%	14%	44%	42%
Omalizumab 10:1	16%	12%	30%	34%	66%
Omalizumab 30:1	70%	50%	63%	75%	70%

En la **Figura 30B** se representa el efecto *in vitro* de evatanepag en combinación con omalizumab sobre la desgranulación mastocitaria. Anteriormente se ha visto que evatanepag tiene una menor actividad que butaprost. Se evaluó su efecto junto a omalizumab para ver si se veía potenciado. Al sensibilizar las células y administrarles un antígeno específico se alcanzó una liberación de $\approx 70\%$. En este experimento se observó que evatanepag no tiene efecto inhibitorio a ninguna de las concentraciones testadas, para todas las concentraciones se alcanzaron valores de liberación por encima del control positivo (valores de inhibición negativos) (**Tabla 55**). Del mismo modo, al combinar los compuestos, evatanepag tampoco modifica el efecto inhibitorio individual de omalizumab. Al comparar estadísticamente el efecto individual de omalizumab con el efecto combinado no se observan diferencias en ninguna condición excepto para la condición (OMA 10:1 Evatanepag 40 μ M) en la cual la liberación aumenta (p -valor <0.01 respecto a la condición OMA 10:1, este resultado estadístico no se muestra en la gráfica para simplificar la interpretación). A la vista de que el efecto modulador de evatanepag sobre los MC era tan leve, e incluso a veces inexistente, se decidió descartar la utilización de este compuesto agonista.

Tabla 55. Efectos inhibitorios de las condiciones estudiadas en la **Figura 30B**.

% Inhibición	Inhibición individual	Evatanepag (10 μ M)	Evatanepag (20 μ M)	Evatanepag (30 μ M)	Evatanepag (40 μ M)
Inhibición individual		-14%	-21%	-25%	-21%
Omalizumab 10:1	8%	12%	12%	-10%	0%
Omalizumab 30:1	34%	27%	27%	39%	41%

A)



B)

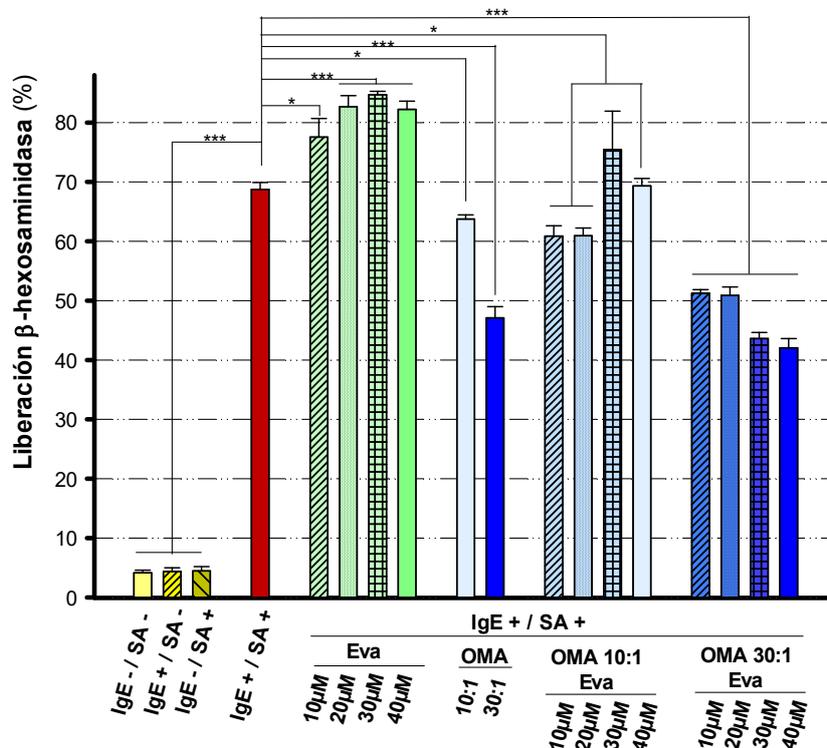


Figura 30. Efecto de la combinación entre agonismo EP2 y bloqueo de la IgE. (a) Combinación del agonista butaprost junto a Xolair® y (b) del agonista evatanepag junto a Xolair® en la desgranulación mastocitaria de la línea celular humana de mastocitos LAD2. Los resultados representan un experimento donde cada grupo experimental se hizo por quintuplicado. Se expresa la media ± SEM. (*p-valor<0.05, **p-valor<0.01 y ***p-valor<0.001). Buta (Butaprost), Eva (Evatanepag), IgE (Inmunoglobulina E), OMA (Omalizumab del producto comercializado Xolair®), SA (estreptavidina).

- **Estudio *in vivo* del efecto sinérgico entre agonismo EP₂ y neutralización de la IgE**

Al actuar en dianas distintas el experimento *in vitro* tenía la limitación de que el potencial efecto sinérgico si no se producía directamente sobre los MC podría quedar enmascarado. Se optó por evaluar su posible sinergismo *in vivo*, mediante co-administración simultánea. Se evaluó el efecto sinérgico de butaprost y omalizumab en la permeabilidad vascular dependiente de MC empleando el modelo de PCA con ratones transgénicos FcεRI^{-/-}hFcεRI⁺ (**Figura 31**).

De acuerdo con lo observado *in vitro*, tanto omalizumab (Xolair®) como butaprost tienen un efecto supresor sobre la reacción anafiláctica cutánea pasiva (PCA). Se sabe que dicha reacción local inducida por el antígeno específico NP es mediada por MC sensibilizados con IgE humana anti-NP. La reacción se induce en las orejas de los animales, lo cual ofrece la ventaja de que cada ratón es el control de sí mismo; oreja izquierda sensibilizada y oreja derecha no sensibilizada (control negativo). En las orejas no sensibilizadas no se observaron diferencias significativas, todos los animales presentaron unos niveles basales de extravasación de Evans Blue similares. Estos valores de extravasación basal se tuvieron en cuenta para calcular el porcentaje de inhibición. La dosis de Xolair® 10:1 permitió inhibir casi por completo la extravasación de Evans Blue que alcanzó un valor ($\approx 15\%$) cercano al de los controles negativos ($\approx 5\%$) (**Tabla 56**). Por otro lado, la dosis más baja ($3\mu\text{g}$) de butaprost alcanzó valores de alrededor del 70% de extravasación. En este caso el aumento de dosis del agonista ($12\mu\text{g}$) no disminuyó la extravasación, sino que la aumentó ($\approx 80\%$). Algo parecido se puede observar en las condiciones de co-administración, se aprecia una relación dosis-respuesta entre ellas, pero en comparación con la administración única de omalizumab la extravasación se ve aumentada. Estos resultados coinciden con los hallados *in vitro*. No se observa sinergismo entre los compuestos sobre la variable estudiada.

Ni la co-exposición *in vitro* ni la co-administración *in vivo* han permitido observar sinergismo entre agonismo de EP₂ y omalizumab sobre la inhibición mastocitaria. Este resultado revela que la hipótesis no se cumple. Nuestro modelo no será capaz de revelar diferencias funcionales al comparar moléculas con función anti-IgE. Pese a que no se haya observado efecto sinérgico en la actividad mastocitaria, no se puede descartar que este se pueda ver sobre otros fenómenos asmáticos clave como la inflamación de las vías aéreas o la hiperreactividad bronquial o con otros compuestos inhibitorios de los MC.

Tabla 56. Efectos inhibitorios (%) de las condiciones estudiadas en la **Figura 31**.

% Inhibición	Inhibición individual	Butaprost ($3\mu\text{g}$)	Butaprost ($12\mu\text{g}$)
Inhibición individual		32%	19%
Omalizumab 10:1	89%	62%	81%

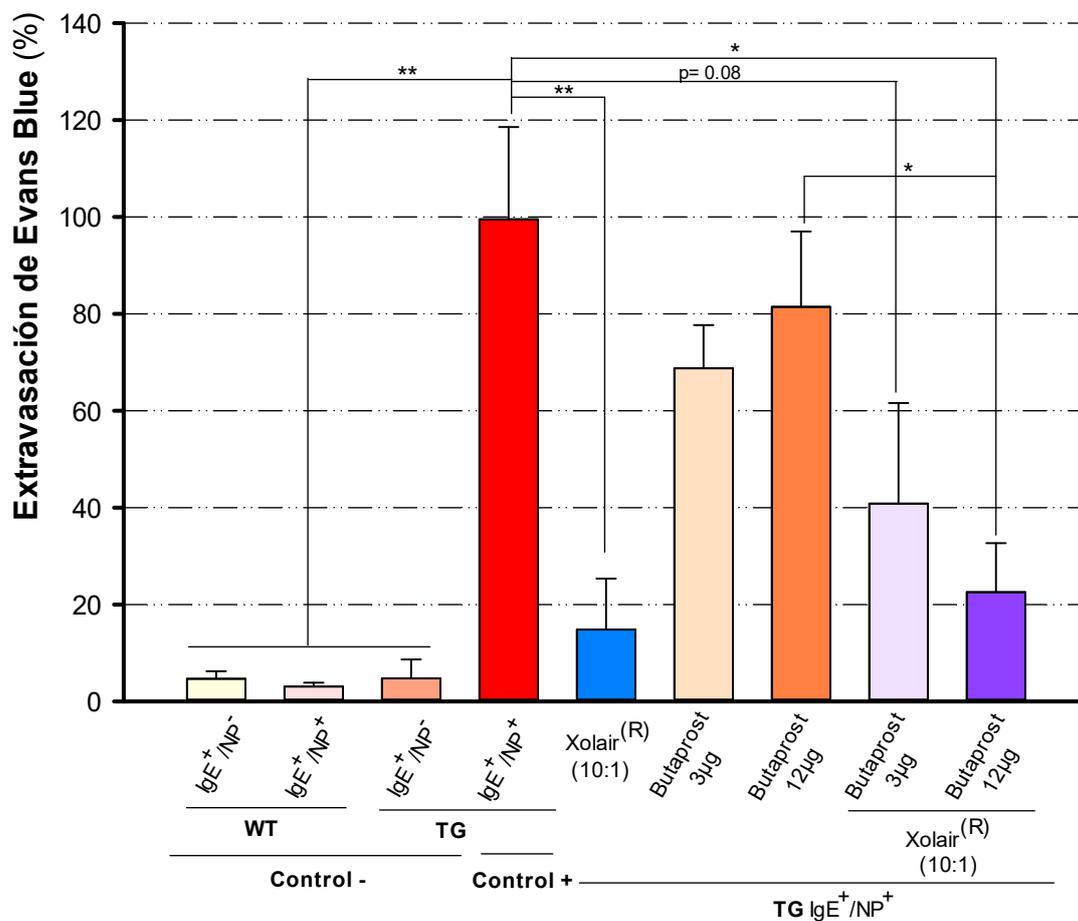


Figura 31. Efecto inhibitor (%) de la combinación entre agonismo EP2 mediante butaprost y bloqueo de la IgE con omalizumab del producto comercializado Xolair® en la respuesta mastocitaria en el modelo PCA. Se expresa la media \pm SEM de una población de 4 individuos por grupo (n=4). (*p-valor<0.05 y **p-valor<0.01). IgE (Inmunoglobulina E), NP (Nitrofenol), TG (Animal transgénico), WT (Animal wild-type).

4.3.4. Conclusiones

Las conclusiones del Sub-proyecto 3 son:

- El aumento en el número de receptores EP₂ mastocitarios previene en gran medida la activación de estas células inducida por exposición a aeroalérgenos de HDM.
- El bloqueo de la actividad mastocitaria en los ratones que sobreexpresan EP₂ se correlaciona con un menor proceso inflamatorio y una menor reactividad de las vías respiratorias a metacolina, sugiriendo que existe un eje endógeno PGE₂-EP₂-MC protector que se activa espontáneamente ante la agresión alérgica.
- Existe una similitud mecánica y efectora entre el agonismo de EP₂ y la neutralización de la IgE (omalizumab) pero la co-administración o co-exposición a un agonista de EP₂ y omalizumab tanto *in vitro* como *in vivo* no redundan en un efecto sinérgico de potenciación de la inhibición mastocitaria.
- La comparación de versiones de omalizumab en un escenario de co-administración con un agonista EP₂ no aportaría información sensible sobre la comparabilidad funcional.

5

DISCUSIÓN GENERAL



5. DISCUSIÓN GENERAL

Este proyecto de Tesis Doctoral se planteó con el objetivo de desarrollar una batería de ensayos que permitiera discriminar analíticamente y con cierto grado de fiabilidad entre biomoléculas análogas del anticuerpo monoclonal anti-hIgE omalizumab. Técnicas de esta naturaleza podrían ser aplicables a numerosos ámbitos. Por ejemplo, en el control de calidad de lotes de biomoléculas anti-IgE, en la comparación entre biomoléculas tras cambios en su proceso productivo o su composición, en la selección preliminar de clones o de posibles *biobetters*¹⁹, pero fundamentalmente, en la preevaluación de candidatos a biosimilar del producto original Xolair®. Si bien se tomó omalizumab como el comparador de referencia, la mayoría de técnicas serían extensibles a otras biomoléculas con actividad anti-IgE.

Para alcanzar ese objetivo se desarrollaron, optimizaron, evaluaron y validaron ensayos cuya sensibilidad permitiera comparar atributos estructurales y funcionales clave de omalizumab. El valor predictivo del conjunto de técnicas desarrolladas permite anticipar con ciertas garantías y de forma rápida, precisa y sensible, el grado de equivalencia analítica entre las moléculas en comparación. Cabe recordar que solo un ejercicio de comparabilidad completo confirmaría lo que la batería de técnicas desarrolladas pudiera ayudar a anticipar. Sin embargo, las técnicas escogidas resultan a nuestro juicio de utilidad en la investigación aplicada a alguno de los objetivos de comparación anticipados (e.g. desarrollo de biosimilares de Xolair®). El abordaje experimental acometido permitió seleccionar las técnicas más adecuadas, es decir, aquellas que presumiblemente permitiesen evaluar atributos de potencial importancia en el comportamiento terapéutico de omalizumab. Por otro lado, una derivada de mucha relevancia de tal desarrollo técnico es la profundización en el conocimiento de la estructura molecular y de la actividad biológica de omalizumab del producto original Xolair®.

Se han desarrollado técnicas de alta resolución, alguna de ellas nunca antes empleada en la comparabilidad de biomoléculas anti-IgE. Creemos que dicha diversidad experimental otorga solidez a las conclusiones recogidas. En esta discusión general se hace una valoración e interpretación global de los datos obtenidos en los tres Sub-proyectos y finalmente se propone un PPB. Para obtener detalles acerca de los resultados y de su interpretación, remítanse al apartado “Resultados y discusión” de cada uno de los Sub-proyecto.

¹⁹ **Biobetter.** No se trata de un término regulatorio o legal y, por lo tanto, no existe una definición oficial/consensuada. Alude a un medicamento biológico que, partiendo de la estructura de un medicamento comercializado, ofrece alguna mejora terapéutica mediante alguna modificación innovadora. Mejora que pudiera reducir la inmunogenicidad, extender el tiempo de vida media para reducir la posología, etc. Por ejemplo, podría considerarse que la darbopoetina es un *biobetter* de la EPO o que los análogos de insulina son *biobetter* de la insulina humana o que las moléculas pegiladas son *biobetters* de sus versiones no pegiladas. Un *biobetter* no es un biosimilar, es un medicamento original (41).

5.1. Versiones y variantes de omalizumab

5.1.1. Selección de versiones y variantes

Con el fin de calibrar la sensibilidad de técnicas analíticas en la discriminación entre versiones y variantes de omalizumab se generaron biomoléculas con cierta gradación en su divergencia molecular.

El mayor grado de igualdad se presumía entre lotes del producto original Xolair® y, por lo tanto, hasta 4 lotes comercializados de Xolair® se incorporaron al análisis. Era razonable anticipar que las diferencias entre ellos serían mínimas. Se trata de diferencias regulatoriamente aceptadas, y con toda probabilidad afectarían exclusivamente y levemente a modificaciones post-traduccionales (glicosilación y/o degradación). El segundo nivel de igualdad se anticipaba entre Xolair® y un potencial candidato a biosimilar. Este compartiría la estructura primaria, pero para maximizar la probabilidad de ciertas divergencias, se sintetizó en un sistema de expresión distinto a CHO. Cabe recalcar que no existe ningún biosimilar de Xolair® en el mercado. De haber existido, el seleccionado no hubiera sido un comparador idóneo. Teniendo en cuenta el contexto del proyecto, era preferible utilizar un candidato a biosimilar generado en un sistema de expresión distinto. A este candidato a biosimilar, a efectos de esta tesis, se le denomina versión del producto de referencia. Por último, se incluyó en el análisis un tercer nivel de igualdad. Se usó una molécula con diferencias en la secuencia aminoacídica (diferente en 3 aminoácidos), pero que mantiene la actividad anti-IgE. A esa variación se le unen otras potenciales fuentes de diferenciación al producirse en un sistema de expresión distinto. La secuencia se seleccionó de entre las diversas proteínas protegidas en la patente de Xolair®. En esta tesis, a esta molécula particularmente divergente se le denomina variante.

Conviene detenerse en la explicación sobre la selección y producción del candidato a biosimilar. En efecto, la línea celular empleada en la producción de una glicoproteína tiene una gran importancia. El sistema de expresión influye tanto en el plegamiento de la molécula como en el patrón de glicosilación. Xolair® está producido en células CHO. La versión y variante análogas, en HEK-293. Ambas líneas celulares son de mamífero, sistema de expresión de elección hasta la fecha para producir glicoproteínas como los anticuerpos monoclonales. Por un lado, las **células CHO** son el sistema de expresión más utilizado para producciones a gran escala de anticuerpos monoclonales (113). Actualmente más del 60% de los fármacos biológicos terapéuticos están producidos en esta plataforma (19). Este sistema es muy conocido y proporciona producciones eficientes, robustas y seguras, presentando una probabilidad ínfima de sintetizar isoformas no esperadas (20). Además, son capaces de producir glicoproteínas recombinantes complejas compatibles con humanos (114). Otras células de mamífero no-humanas tienen otros mecanismos de glicosilación los cuales pueden unir glicanos con potencial antigénico (e.g. Neu5Gc o galactosa- α -1,3-galactosa) que pudieran promover su potencial inmunogénico (115,116). Por otro lado, las **células HEK-293** son de origen humano, lo que, entre muchas otras ventajas, reduce el

riesgo de reacciones inmunogénicas inducibles por glicanos no humanos (20). Ambos sistemas de expresión poseen ventajas e inconvenientes, pero son dos de los sistemas más empleados en la síntesis de glicoproteínas terapéuticas recombinantes. Al poseer distintos mecanismos internos de PTMs se puede predecir con cierta seguridad que las proteínas resultantes tendrán diferencias fisicoquímicas detectables. El análisis de estas moléculas funcionalmente equivalentes, pero con distinto grado de analogía molecular, permitirá determinar la capacidad discriminadora de las técnicas. En el hipotético caso de querer obtener el mejor candidato a biosimilar, es decir, esencial igualdad, el riesgo de diferencias sería menor si se emplease CHO. Se justificaría otra fuente, por ejemplo, si su eficiencia productiva fuera notablemente superior. La exigencia regulatoria de la EMA determina que la igualdad entre biosimilar y producto de referencia debe de estar contenida en atributos críticos en el margen aceptado de variabilidad entre lotes del original de referencia y la selección de un sistema de expresión distinto obligaría seguramente a un especial esfuerzo en la comparación. Por último, cabe recordar que la variación de un único aminoácido puede influir drásticamente tanto en la estructura final de la molécula como en la capacidad de unión a la diana. En el desarrollo de cualquier fármaco biológico, pero sobre todo al trabajar con biosimilares, es esencial conocer y verificar la secuencia aminoacídica de la proteína. Por este motivo, convenía confirmar que, de entre las secuencias protegidas en la patente, la de omalizumab era la anticipada, y sobre todo que las secuencias aminoacídicas de las versiones y variantes se correspondían con lo esperado.

5.1.2. Confirmación de la estructura primaria

Si bien se presumió que la secuencia aminoacídica se correspondería con lo anticipado, con el fin de asegurar que no hubiera diferencias inesperadas, el primer atributo que se evaluó fue la estructura primaria. Se utilizaron dos técnicas: PMF y secuenciación *de novo*.

Hoy en día es habitual emplear la espectrometría de masas en la determinación de la secuencia aminoacídica. Como se planteó la necesidad de dilucidar la secuencia exacta, se propusieron dos metodologías en base a su potencial discriminatorio: el análisis del mapa de huella peptídica o PMF, y la secuenciación *de novo*. Cada técnica tiene sus ventajas e inconvenientes. Dependiendo de lo seguro que se esté de la secuencia primaria de la proteína analizada, se puede escoger una u otra técnica.

La PMF permitió determinar que la secuencia de Xolair® era con alta probabilidad la esperada. Sin embargo, la técnica presenta limitaciones, porque no es capaz de cubrir el 100% de la secuencia. Esto se apreció al comparar la variante con el producto de referencia. Aunque el resultado permitía demostrar que ambas proteínas no compartían secuencia, la técnica no pudo determinar la diferencia exacta. La aplicación de la técnica de secuenciación *de novo* resolvió el problema. Se determinó la secuencia completa de Xolair® y de la versión veOMA. Se confirmó, por lo tanto, que la secuencia de omalizumab de Xolair® coincidía con la secuencia anticipada mediante la revisión de la patente y que esta estaba compartida con la versión veOMA.

Para este atributo se concluyó que la metodología de PMF empleada tiene una finalidad puramente comparativa. Para confirmar con rotundidad la secuencia aminoacídica se requiere de análisis más exhaustivos. De acuerdo con el objetivo de esta tesis se concluyó que la metodología de secuenciación *de novo* era la idónea. A partir de un único análisis permite obtener un resultado preciso del 100% de la secuencia.

La mejor forma de calibrar el impacto de las potenciales diferencias moleculares (variabilidad aminoacídica y PTMs) es mediante estudios analíticos funcionales. En efecto, no es tanto la estructura en sí, sino las consecuencias funcionales de las variaciones estructurales lo que pudiera alterar el comportamiento terapéutico de moléculas análogas a omalizumab. Por eso se caracterizaron fisicoquímicamente las moléculas obtenidas y se estudió la correlación entre la heterogeneidad estructural y la actividad biológica fundamental.

5.2. Caracterización estructural y variabilidad inherente

Cuando se comparan moléculas es esencial establecer el grado de igualdad molecular. El principio básico en farmacología de que la estructura hace la función, explica que dos moléculas estructuralmente idénticas compartan actividad terapéutica. Por lo tanto, en un ejercicio de comparabilidad en el que se rige una hipótesis de igualdad, conviene incluir un amplio abanico de métodos de vanguardia capaces de caracterizar de forma precisa y comparar todos los atributos estructurales. Las moléculas biológicas están sujetas a cierta variabilidad, y si bien pueden compartir esencialmente la estructura, en cierto grado siempre diferirán en algún atributo molecular. Por eso, cuando se detectan diferencias, por leves que sean, conviene establecer su impacto terapéutico mediante un análisis de la actividad biológica.

Se identificaron bibliográficamente los atributos estructurales considerados críticos en la actividad terapéutica de omalizumab, algunos de ellos comunes en todos los mAb, y se han ideado o desarrollado métodos para evaluarlos. La glicosilación y la conformación nanomolecular son sin ninguna duda clave. En este trabajo se estimó la heterogeneidad molecular entre lotes de Xolair® para ambos atributos, la versión y la variante, y su posible implicación en la actividad anti-IgE. Con este abordaje se calibró la capacidad discriminatoria de los métodos analíticos desarrollados.

5.2.1. Glicosilación de omalizumab

Los estudios de glicosilación se pueden subdividir en tres niveles: evaluación de proteínas intactas, de glicopéptidos y de glicanos libres (117). Los análisis de la **proteína intacta** proporcionan información de la masa molecular proteica y de las principales PTMs. Permite realizar un cribado rápido de las principales especies de glicanos, sin profundizar en su caracterización. Por ejemplo, no aportan información de los sitios de anclaje de los glicanos. El análisis de **glicopéptidos** permite obtener información más precisa. En este caso las proteínas intactas se digieren en pequeños péptidos o

glicopéptidos. Estos aportan información del sitio de unión, un dato crucial en el desarrollo de biosimilares que tienen múltiples sitios de glicosilación. En el último nivel, el análisis de **glicanos libres** se obtiene una caracterización cualitativa y cuantitativa exhaustiva del perfil de glicosilación. Es robusta, precisa y reproducible (118). Debido al contexto de un ejercicio de comparación y al desconocimiento del patrón preciso de omalizumab del producto original, se seleccionó el análisis de glicanos libres como la metodología más adecuada. Además, como omalizumab posee un único sitio de unión de azúcares, el aminoácido Asparagina de la posición 301 de la región Fc de la cadena pesada, se hizo innecesario evaluar los sitios de anclaje específico.

Se caracterizó el patrón de glicosilación de cuatro lotes de Xolair® y un lote de la versión veOMA. La glicosilación de la variante vaOMA no se determinó debido a que al ser producida en el mismo sistema que veOMA se anticipó que poseería un perfil similar. Como se ha dicho, además del interés de aplicar una técnica que discriminara entre estas moléculas, resultaba muy interesante la caracterización exhaustiva del producto original Xolair® utilizando lotes producidos en un período razonablemente extenso; una información hasta ahora no publicada. Se determinaron los glicanos cualitativa y cuantitativamente.

Los resultados mostraron la existencia de diferencias cuantitativas entre lotes de Xolair®. Se acentuaban en los lotes con caducidades alejadas entre sí, sugiriendo que los procesos de producción han podido sufrir cambios a lo largo de la vida comercial del medicamento y se han traducido en una variabilidad del producto final. Además, como se anticipó, se identificaron diferencias aún mayores, cualitativas y cuantitativas, entre omalizumab original y veOMA, sin duda atribuibles a la utilización de un sistema de expresión diferente.

El estudio ha permitido concluir que esta metodología de caracterización del patrón de glicanos tiene una capacidad discriminatoria muy elevada.

5.2.2. Conformación espacial de omalizumab: la luz del sincrotrón

Como se ha comentado, la estructura tridimensional (estructura secundaria y terciaria) tiene una gran relevancia en la función proteica. La implementación de una tecnología innovadora de alta resolución como la luz sincrotrón en la caracterización de moléculas biológicas supone un hito de gran interés con posibles múltiples futuras aplicaciones. Por este motivo, dicha metodología se ha aplicado en esta tesis en la determinación comparada de la estructura tridimensional de moléculas análogas de omalizumab.

Los estudios preliminares indicaron que, dada la excesiva flexibilidad en la zona bisagra de omalizumab, era preferible fraccionar la proteína para su análisis. Se logró hacer crecer cristales de calidad de la región Fab de omalizumab de Xolair®. Su difracción permite obtener una estructura molecular con una alta resolución. La estructura de la región Fab de omalizumab había sido evaluada y publicada ya anteriormente (64–66). Los datos obtenidos en esta tesis reproducen lo observado; demostrando que la

metodología de cristalización para Fab era óptima, robusta y reproducible. Sin embargo, la resolución obtenida en este estudio ha mejorado significativamente la de cualquier estructura de omalizumab publicada. Esto permite vaticinar que la técnica de análisis por luz de sincrotrón podría tener una alta capacidad discriminatoria y, por ende, un elevado potencial comparativo.

El análisis no se ha podido realizar en este proyecto por distintas razones: (1) La obtención de cristales de calidad es un procedimiento muy lento, (2) el tratamiento de los datos obtenidos mediante la difracción de los cristales resultó ser más complejo de lo esperable, y (3) al emplear la metodología para una aplicación novedosa, se planteó un plan de acción conservador y se decidió minimizar los riesgos mediante un abordaje particularmente lento. La resolución de los datos obtenidos con Xolair® sugiere que la técnica tendrá un potencial discriminatorio elevado. Sin embargo, a la luz de los datos preliminares, no parece que revele diferencias en la región Fab entre lotes de Xolair®. En cambio, parece que no solo se detectarían las diferencias aminoacídicas de la variante, sino que la técnica podría llegar a detectar diferencias de empaquetado debidas al sistema de producción celular. Los resultados obtenidos en Xolair® para Fab son, por lo tanto, prometedores. Conviene desarrollar la metodología de fragmentación, purificación y cristalización de Fc para obtener cristales también de esta región. Una vez se demuestre la robustez en la obtención de cristales para ambas fracciones se deberá evaluar la capacidad discriminatoria de la técnica evaluando Xolair® en paralelo con moléculas análogas como la versión y la variante seleccionadas en esta tesis, u otras.

Una vez estudiadas las diferencias moleculares e identificadas las variaciones en la glicosilación se quiso determinar qué impacto funcional pudieran tener.

5.3. Sensibilidad de las pruebas funcionales *in vitro* e *in vivo*

Los ensayos funcionales no clínicos permiten determinar si las diferencias estructurales en atributos clave pudieran correlacionarse con modificaciones relevantes en su actividad biológica y en última instancia con el comportamiento clínico del medicamento. Se trata de un análisis particularmente importante en un estudio comparativo. Las técnicas de evaluación funcional dependerán de la naturaleza del biomedicamento, es decir, se establecen caso por caso. El abordaje experimental mediante el análisis comparativo de los mismos lotes de Xolair®, la versión y la variante pretende identificar: (1) la capacidad discriminatoria de técnicas de caracterización funcional específicas para omalizumab, y (2) el posible impacto funcional de las diferencias estructurales previamente identificadas.

Tras revisar la bibliografía se definieron los parámetros funcionales críticos: la capacidad de unión a la diana (IgE humana) y la actividad biológica, mediante metodologías específicas tanto *in vitro* como *in vivo*.

5.3.1. Capacidad discriminadora de los estudios funcionales

Evaluar la interacción anticuerpo-antígeno es crítico para caracterizar la función de un anticuerpo monoclonal. La tecnología SPR es la herramienta más útil. Proporciona datos cuantitativos de la afinidad y cinética de unión de cualquier molécula con su diana (119–121).

La variabilidad observada en la capacidad de unión entre los lotes de Xolair®, aunque existente, era mínima y, por lo tanto, con toda probabilidad irrelevante desde el punto de vista terapéutico. Es probable que las diferencias observadas entre lotes sean atribuibles tanto a la variabilidad inherente de la técnica como a la del propio producto. Además, observamos que la versión de omalizumab tenía una capacidad de unión a la diana similar a la del producto de referencia. De acuerdo con nuestros resultados, las diferencias en el patrón de glicosilación entre los lotes del producto original y la versión candidata a biosimilar, no se traducían en diferencias en la capacidad de unión a la IgE. De estos resultados se puede deducir que la glicosilación no modula significativamente la actividad biológica de omalizumab. Por lo tanto, ciertas diferencias en el patrón de glicosilación, al menos cuantitativas, se pueden admitir sin que anticipen alteración de la eficacia de omalizumab. Por otro lado, y en consonancia con lo esperado, se demostró que la capacidad de unión de la variante no era equivalente a las de omalizumab original o de la versión candidata a biosimilar. La modificación de tres aminoácidos no impedía que reconociera la misma diana que omalizumab, pero sí disminuía su afinidad. Interesante porque la secuencia aminoacídica alterada también fue protegida por la patente. La técnica ofrece una alta capacidad discriminadora y, por lo tanto, resulta de interés aplicarla en un ejercicio de comparación de biomoléculas neutralizantes de la IgE humana.

El desarrollo de la técnica de análisis de unión omalizumab-hIgE descrita en el Sub-proyecto 2 permitió crear una metodología de SPR idónea para caracterizar y comparar la capacidad de unión a su diana de cualquier molécula anti-IgE. Los resultados obtenidos nos llevan a concluir que las diferencias moleculares observadas, específicamente en el patrón de glicosilación, no tienen un impacto relevante en la identificación y unión a IgE de omalizumab, y muy probablemente no se traducirían en cambios de eficacia.

Para completar el estudio de unión se evaluó la actividad biológica. El ensayo *in vitro* de liberación de β -hexosaminidasa en MC permite caracterizar la actividad de moléculas neutralizadoras de IgE. El método consiste en la detección de la concentración en el medio extracelular de β -hexosaminidasa, una enzima presente en los MC. Esta se libera cuando las IgE de MC sensibilizados reconocen su alérgeno específico y estos reaccionan desgranulando. Se trata de una herramienta analítica de gran valor que permite estudiar directamente la actividad neutralizadora de omalizumab, o de cualquier otra molécula análoga.

Antes del estudio comparativo, se validó la técnica experimentalmente. Los resultados demostraron que la técnica era repetible, sobre todo a concentraciones altas. A concentraciones bajas existía una

variabilidad mayor entre análisis atribuible al estado celular. Para completar la validación se analizaron 4 lotes de Xolair® en días consecutivos. La variabilidad de los resultados disminuyó significativamente en casi todas las concentraciones. Se demostró que la técnica era potencialmente idónea para ser empleada en un estudio de comparabilidad.

Se propuso estudiar la funcionalidad *in vitro* en dos líneas celulares siguiendo criterios de las agencias reguladoras. Estudiar y comparar la funcionalidad utilizando dos líneas celulares ofrece mayores garantías respecto de las conclusiones en comparabilidad. Ambas células exhibieron el mismo resultado. Sin embargo, el error asociado a las LAD2 era mucho menor que el de las RS-ATL8. El análisis mediante LAD2 demostró ser más preciso. Además, como la interacción de omalizumab no es con la célula, sino que actúa directamente con la IgE evitando que esta se una a la célula, la funcionalidad de la molécula anti-IgE no parece depender tanto de la población mastocitaria escogida. La variabilidad en los resultados dependerá intrínsecamente de las características celulares. Con todo esto, se puede concluir que para estudiar la funcionalidad *in vitro* de omalizumab solo es necesario usar la línea celular que ofrezca unos mejores resultados, en este caso, la línea celular LAD2. Solamente en el caso poco probable de que omalizumab ejerciese un efecto directo sobre los mastocitos se justificaría un abordaje en más de una población.

Los resultados mostraron que la técnica era capaz de detectar diferencias entre las moléculas analizadas tanto mediante el uso de células LAD2 como RS-ATL8. No se observaron diferencias entre el producto original y la versión. Sin embargo, sí que se encontraron entre el producto original y la variante. En conclusión, el análisis de liberación de β -hexosaminidasa mediante células LAD2 permite determinar diferencias funcionales, entre moléculas neutralizadoras de la IgE.

El estudio funcional de omalizumab, o de cualquier anticuerpo, mediante técnicas que evalúen sus propiedades inmunoquímicas permite caracterizar la capacidad de unión que tiene la molécula a su antígeno y comparar moléculas análogas de una forma precisa y exacta. Sin embargo, el entorno donde se produce el análisis difiere mucho al del paciente y no refleja la actividad biológica de una manera fiel. Los ensayos biológicos pronostican mejor la actividad, estos reproducen de una forma más fidedigna el ambiente, mecanismo de acción y los eventos que se producen en los sistemas biológicos tras la interacción anticuerpo-antígeno. Los ensayos biológicos emplean células u organismos vivos en los cuales el fármaco genera o regula una cascada de señales cuya respuesta es medible y comparable. La complejidad del organismo empleado está directamente relacionada con la pérdida de sensibilidad de la técnica. Sin embargo, el resultado conjunto que se obtiene mediante un abordaje ortogonal permite extraer una conclusión más afinada en el contexto de biosimilaridad.

Los resultados funcionales obtenidos mediante la técnica de SPR y el ensayo celular mostraron una notable correlación. El empleo de ambos abordajes en la caracterización comparada funcional permite

anticipar con fidelidad lo que presumiblemente se observaría en un abordaje completo de comparación de la actividad biológica.

5.3.2. Limitaciones de las técnicas *in vivo*

Las diferencias observadas en la capacidad de unión a IgE de omalizumab y sus moléculas análogas mediante SPR se identificaron también en los ensayos celulares. La aplicación de ambos abordajes experimentales es pertinente en un ejercicio de comparación. ¿Qué puede aportar la comparación funcional en modelos *in vivo*? Para dar respuesta a esta pregunta se optó por un modelo PCA que permite profundizar en la caracterización de la actividad mastocitaria de omalizumab. Por lo general los estudios *in vivo* son menos sensibles debido a la variabilidad interindividual existente en organismos complejos. Sin embargo, su evaluación resultaba de interés puesto que el abordaje siempre conviene hacerlo caso por caso y el hecho de disponer de un ratón transgénico pudiera ser un elemento diferenciador. Además, PCA es un modelo bien caracterizado que cuantifica la sensibilización por IgE en la oreja de los animales, en el que cada animal tiene su propio control negativo; lo cual incrementa su sensibilidad en un ejercicio de comparación.

No se detectaron diferencias entre lotes de Xolair®, algo esperable puesto que, mediante las técnicas más sensibles (SPR y ensayo celular) tampoco se observaron. Tampoco se detectaron diferencias *in vivo* entre original, versión e incluso variante, lo cual indicaba que el modelo de PCA empleado tenía una alta variabilidad ligada a la complejidad del sistema utilizado que escondía las diferencias observadas mediante las otras técnicas. Pese a disponer de unos animales transgénicos ideales para evaluar la función anti-IgE *in vivo*, el poder discriminatorio de esta técnica es limitado.

En conclusión, el modelo de PCA en transgénicos permite detectar el efecto anti-IgE pero no alcanza la sensibilidad suficiente para discriminar entre variaciones leves post-traduccionales, lo cual confirma que la técnica de SPR y el ensayo celular son más apropiados para hacer aflorar diferencias funcionales. Se puede anticipar que, de la misma manera que en el modelo de ratón las diferencias no se detectan, es probable que en entornos de mayor variabilidad como es en práctica clínica, muy probablemente tampoco se substanciarían.

Para mejorar la caracterización funcional y aprovechar la disponibilidad de esta línea de ratón transgénica se deberían considerar nuevas estrategias metodológicas *in vivo* con menos variabilidad que permitieran obtener datos más precisos.

5.4. Estudios de actividad sinérgica

Para ahondar en la caracterización funcional de omalizumab se diseñó un estudio que pudiera revelar diferencias funcionales menores, no anticipables con métodos clásicos. Con el objetivo de alcanzar este hito se creó un escenario alternativo de co-administración: omalizumab junto a un agonista de EP₂. Esta estrategia se cimienta sobre evidencia generada en los últimos años en nuestro laboratorio donde se demostró que la activación del receptor EP₂ también previene la actividad mastocitaria. Estos antecedentes fueron validados y publicados por nuestro grupo en la revista *Allergy* empleando ratones transgénicos que sobreexpresan el receptor EP₂ en los MC (106). Inicialmente se demostró la capacidad inhibitoria mastocitaria del agonismo de EP₂. Mediante la evaluación de fenómenos clave en la respuesta asmática en animales transgénicos sensibilizados con HDM se validó el efecto antiasmático del receptor mastocitario EP₂ (93,104,122). El bloqueo de la actividad mastocitaria en los ratones que sobreexpresan EP₂ se correlaciona con un menor proceso inflamatorio y una menor reactividad de las vías respiratorias a metacolina, sugiriendo que existe un eje endógeno PGE₂-EP₂-MC que se activa espontáneamente ante la agresión alérgica como se propuso en el trabajo de Rosa Torres *et al.* 2015 (107). Tras la validación, se estudió el efecto modulador de dos agonistas, butaprost y evatanepag, en la desgranulación de MC mediante el agonismo de EP₂. Los resultados demostraron que tanto los agonistas de EP₂ como omalizumab tienen un efecto similar y, por lo tanto, que su efecto individual podría verse potenciado en una administración conjunta. Lamentablemente, nuestros estudios indicaron que no es así.

La estrategia de co-administración de butaprost y Xolair® no se sustancia en un efecto sinérgico. Por un lado, los resultados *in vitro* solo permiten ver un efecto de inhibición sumatorio a concentraciones bajas de Xolair®. Por otro lado, la metodología *in vivo* reafirmó que ambos compuestos tienen capacidad inhibitoria en sistemas animales pero sus efectos no se ven potenciados en co-administración. La comparación de versiones/variantes de omalizumab en un escenario de co-administración con un agonista EP₂ no aporta información sensible sobre la comparabilidad funcional.

En conclusión, aunque el abordaje en base a los antecedentes era esperanzador, la estrategia propuesta no es pertinente en un ejercicio de comparación.

5.5. Programa Predictivo de Biosimilaridad (PPB)

El trabajo desarrollado ha permitido en esencia 2 cosas: (1) caracterizar estructural y funcionalmente omalizumab del producto original Xolair® y (2) evaluar el poder discriminatorio de algunas técnicas que pueden resultar clave en un ejercicio de comparación entre moléculas con actividad anti-IgE. La agrupación de dichas técnicas permite generar una tecnología que, como ya se ha mencionado anteriormente, podría aplicarse a múltiples ámbitos. Entre ellos se destaca uno particularmente interesante, el desarrollo de biosimilares de Xolair®.

La demostración mediante criterios regulatorios rigurosos de que un candidato a biosimilar y el producto original de referencia son en esencia lo mismo requiere de numerosos estudios transversales. Solo un análisis extenso de ambos productos acompañado de un ejercicio de comparación permitirá a los laboratorios determinar el grado de igualdad y a las agencias evaluadoras certificar, o no, la biosimilaridad. Conviene disponer de herramientas que anticipen ese grado de igualdad en atributos clave para que, por ejemplo, entre varios candidatos se preseleccione la molécula con mayor potencial para ser biosimilar. Nuestro trabajo, además de cumplir con otros objetivos, ofrece cierta fiabilidad en la predicción del grado de igualdad. Si bien, la superación de dichas pruebas no es garantía de que vaya a superarse el extenso ejercicio de comparación requerido y, por lo tanto, de que pueda considerarse biosimilar, su aplicación ofrecería cierta confianza y permitiría a los laboratorios productores de biosimilares tomar decisiones trascendentales. Denominamos a este conjunto de pruebas seleccionadas caso por caso, Programa Predictivo de Biosimilaridad o PPB.

El objetivo del PPB es demostrar con un nivel de certeza conveniente que la calidad estructural y funcional del biosimilar es comparable con la del medicamento original. Aunque determinadas diferencias son aceptables, el grado de igualdad que las administraciones sanitarias exigen es muy elevado. Las agencias emiten recomendaciones (en forma de guías o directrices) y no suelen especificar cuáles son los atributos críticos ni las técnicas que hay que emplear en la evaluación de un producto y, por lo tanto, es labor de los desarrolladores establecer qué aspectos estructurales y funcionales son esenciales.

En el desarrollo de un biosimilar, la comparación analítica es clave en la identificación del grado de igualdad. La sensibilidad de las técnicas analíticas permite detectar pequeñas diferencias. Por eso el PPB se centra en este apartado. La caracterización analítica y posterior comparación se debe hacer tanto a nivel estructural como funcional. Las técnicas utilizadas en un ejercicio de comparación tienen que ser de vanguardia y deben validarse, es decir, demostrar que su capacidad discriminatoria es óptima y puede detectar diferencias entre moléculas de omalizumab altamente similares. En esta Tesis se han desarrollado y se han estudiado técnicas que permiten evaluar atributos clave, y de este modo, elegir las que presumiblemente aportan más valor.

Como ya se ha dicho el PPB que proponemos puede tener diversas aplicaciones, pero fundamentalmente se centra en la preevaluación de candidatos a biosimilar del producto original omalizumab Xolair®. Laboratorios farmacéuticos pueden acogerse a algunos de los métodos y optimizar así el desarrollo de biosimilares con omalizumab.

A continuación, se resumen los estudios que formarían parte de ese PPB en el caso de candidatos a biosimilar de Xolair® diferenciando entre estudios estructurales y funcionales:

Técnicas para la comparación estructural:

- En ocasiones, en las patentes, la secuencia aminoacídica de la proteína terapéutica comercializada se esconde entre las de proteínas alternativas. Antes de desarrollar un candidato biosimilar es esencial cerciorarse de cuál es la **estructura primaria**. La secuencia aminoacídica es clave en biosimilaridad y, por lo tanto, es imprescindible evaluarla en la anticipación de biosimilaridad. Tal y como describe la EMA en su directriz '*Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (EMA/CHMP/BWP/247713/2012)*' la secuencia aminoacídica de un biosimilar debe ser confirmada y ser exactamente la misma que la del producto de referencia (123). Por lo tanto, en un PPB es esencial verificar de forma inequívoca que ambas moléculas, candidato y referencia, comparten secuencia. Para alcanzar este objetivo se ha escogido la metodología de **secuenciación de novo** presentada en el Subproyecto 1. Esta proporciona datos de calidad con un poder discriminatorio excelente. En este caso la técnica no es específica para omalizumab pero permite obtener una cobertura completa de la secuencia a partir de un único análisis, capacidad esencial que garantiza su idoneidad.
- Un atributo sujeto a una particular heterogeneidad, incluso entre lotes del producto original, y que puede tener implicaciones en el perfil beneficio-riesgo de proteínas terapéuticas complejas es el **patrón de glicosilación**. La glicosilación es una PTM que depende principalmente del proceso de síntesis del principio activo. Este parámetro está directamente relacionado con reacciones inmunológicas no deseadas (124,125). Es por este motivo que tanto las directrices de la FDA (126) como de la EMA (127) recomiendan su monitorización. De este modo, en un estudio de comparabilidad diseñado para evaluar moléculas en estadios tempranos de desarrollo es imprescindible caracterizar cualitativa y cuantitativamente el perfil de glicanos. Para ello se ha escogido la metodología de **análisis de glicanos libres**. La metodología ha demostrado tener una capacidad discriminatoria elevada. Este análisis ha permitido detectar el perfil de glicanos, cuantificarlos y determinar el tipo de enlaces que forman. Una caracterización en detalle que proporciona un gran valor en el desarrollo de una proteína terapéutica. El conjunto de datos que aporta permite pronosticar en cierta medida el riesgo atribuible (e.g. inmunogénicos) a posibles divergencias en la glicosilación.

Técnicas para la comparación funcional:

Las agencias reguladoras de referencia cada vez otorgan más importancia a la demostración de igualdad en la actividad biológica entre los candidatos a biosimilar y sus productos de referencia. Si leves diferencias moleculares no se traducen en diferencias funcionales empleando técnicas comparativas de alta sensibilidad, es razonable pensar que las diferencias estructurales puedan considerarse clínicamente aceptables.

- La tercera metodología incluida en el PPB permite comparar la función del candidato a biosimilar con la del producto de referencia. Empleando la **técnica de SPR** se ha desarrollado una metodología específica para detectar diferencias en la **afinidad por la diana** de moléculas anti-IgE, un parámetro clave para omalizumab. Esta técnica ha demostrado tener un alto poder discriminatorio permitiendo una caracterización precisa de la funcionalidad.
- Por último, proponemos evaluar comparativamente **la actividad biológica *in vitro***. **El ensayo de liberación de β -hexosaminidasa empleando células LAD2** es la cuarta, y última, metodología incluida en el PPB. Su capacidad discriminatoria es suficientemente sensible como para detectar diferencias de proteínas análogas a omalizumab. Los resultados obtenidos mediante el ensayo celular se correlacionaban con los de la técnica de SPR validando la metodología. Este ensayo permite obtener una visión general de como la molécula se comportará clínicamente. Como se ha comentado anteriormente, omalizumab al no interactuar directamente con la célula, no parece que requiera de más de una línea celular para corroborar los datos.

Tabla 57. Resumen de la propuesta del PPB.

Comparabilidad analítica	Parámetro	Nivel	Método analítico	Objetivo
Estructural	Estructura primaria	Secuencia aminoacídica	Secuenciación <i>de novo</i> por MS	Demostrar que el CB* comparte secuencia aminoacídica con omalizumab
	Glicosilación	Análisis de glicanos libres	HILIC UPLC WAX-HPLC LC-FLD-MS	Caracterizar el perfil de glicanos y demostrar que no contiene azúcares inmunogénicos
Funcional	Propiedades inmunológicas	Afinidad por la diana	SPR	Comparar afinidad a la diana
	Actividad biológica	Ensayo celular	Ensayo liberación de β -hexosaminidasa en LAD2	Comparar funcionalidad

*CB: Candidato a biosimilar o molécula análoga en comparación frente a omalizumab de Xolair®.

El PPB tiene margen de mejora. Hay ciertos parámetros que creemos clave para omalizumab de los cuales no disponemos, por el momento, de metodologías que permitan aportar resultados de calidad.

- De la misma forma que la estructura primaria, el plegamiento de los aminoácidos también es esencial en biosimilaridad. Una incorrecta disposición estructural puede alterar la actividad proteica. Para ofrecer más garantías en los resultados, el PPB debería de incluir una metodología de alta resolución para la caracterización de la **estructura nanomolecular**. Los estudios de la estructura molecular realizados **mediante la luz de sincrotrón** nos permiten vaticinar que esta técnica permitiría obtener los resultados deseados. Sin embargo, ciertas dificultades han impedido

su desarrollo. Hasta donde conocemos, nunca antes se había propuesto utilizar esta tecnología para fines comparativos en biosimilaridad. Implementar esta tecnología sería un gran hito que permitiría identificar diferencias sutiles, indetectables para otras técnicas, entre moléculas altamente similares.

- El uso de ensayos *in vivo* en biosimilaridad no está aconsejado. Según la directriz de la EMA “*Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies: non-clinical and clinical issues*” para demostrar biosimilaridad de anticuerpos monoclonales no se requieren estudios de comparabilidad *in vivo* no clínicos a no ser que se cumplan unas condiciones muy específicas (67). Esta directriz está fundamentada en que los estudios *in vivo* normalmente no añaden información relevante dado a su limitada sensibilidad y a que los resultados obtenidos en animales muchas veces no se correlacionan a humanos. Sin embargo, nuestro grupo de investigación posee una herramienta clave, una línea de ratones transgénicos que expresan el receptor humano de la IgE. Anticipamos que quizás el uso de una técnica *in vivo* para evaluar la funcionalidad con estos ratones podría aportar valor añadido al PPB. Sin embargo, el abordaje *in vivo* no es capaz de detectar las diferencias encontradas *in vitro* por su baja sensibilidad.

En conclusión, si se incluyen los estudios propuestos, el PPB sería una herramienta de valor en la caracterización, comparación y determinación preliminar del grado de igualdad de una molécula con función anti-IgE con respecto al omalizumab del producto de referencia Xolair®.

Aunque, sin lugar a duda hay margen de mejora, la batería de pruebas seleccionadas puede resultar útil a organizaciones que quieran acometer un plan de desarrollo de un biosimilar de Xolair®. Evaluar una molécula en etapa temprana de desarrollo mediante este programa permitiría, de una forma rápida y con bajos recursos obtener una visión global del potencial a ser candidato a biosimilar.

CONCLUSIONES



6. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han permitido alcanzar las siguientes conclusiones:

1. El uso de anticuerpos monoclonales que reconocen la misma diana o epítipo, pero que difieren molecularmente entre sí, es una estrategia útil en el desarrollo, optimización y validación de técnicas analíticas de alta sensibilidad para un ejercicio de comparación.
2. El análisis de glicanos libres permite caracterizar con un óptimo detalle el patrón de glicosilación de anticuerpos y, por su elevada sensibilidad, identificar diferencias entre lotes comercializados de omalizumab original (Xolair®) esencialmente iguales.
3. Omalizumab presenta un único sitio de anclaje de glicanos en cada una de sus cadenas pesadas. El perfil de glicanos de omalizumab del producto Xolair® presenta un perfil de glicanos seguro con una cierta variabilidad, con azúcares y ramificaciones típicas de mamíferos y sin presencia de ácidos siálicos inmunogénicos.
4. Los resultados anticipan que la utilización de la luz del sincrotrón permitirá caracterizar con una elevada resolución la estructura nanomolecular de lotes y versiones de omalizumab, y probablemente de otras proteínas terapéuticas, permitiendo la comparación de la estructura proteica, información clave en el desarrollo de biosimilares.
5. La técnica optimizada de SPR anticipa la actividad biológica de omalizumab determinada mediante el ensayo celular de liberación de β -hexosaminidasa. La evaluación conjunta de ambas técnicas permite una caracterización fina de la actividad biológica proporcionando datos sensibles de comparabilidad.
6. El modelo *in vivo* de la PCA en ratón transgénico que expresa el receptor humano de la IgE, si bien permite caracterizar la actividad anti-IgE de omalizumab en ratón, no es lo suficientemente sensible como para identificar las diferencias funcionales determinadas mediante SPR y el ensayo *in vitro*.
7. La co-administración de un agonista de EP₂ y omalizumab no redundaba en un efecto sinérgico de potenciación que permita refinar o incrementar la sensibilidad de la comparación funcional entre versiones de omalizumab o entre biomoléculas neutralizadoras de IgE.

Conclusión general:

La combinación de las técnicas analíticas de secuenciación de la estructura primaria *de novo*, del análisis de glicanos libres, de SPR y del ensayo celular de β -hexosaminidasa en LAD2 proporciona una herramienta ágil y fiable para anticipar el grado de igualdad entre versiones de omalizumab: dicha batería de técnicas, a la que denominamos PPB, puede ser útil en la selección de candidatos a biosimilar de Xolair® o en el diseño de un ejercicio de comparabilidad más personalizado.



REFERENCIAS



7. REFERENCIAS

1. Lu R-M, Hwang Y-C, Liu I-J, Lee C-C, Tsai H-Z, Li H-J, et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci* [Internet]. 2020 Dec 2;27(1):1. Available from: <https://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12929-019-0592-z>
2. Liu H, Gaza-Bulseco G, Faldu D, Chumsae C, Sun J. Heterogeneity of Monoclonal Antibodies. *J Pharm Sci* [Internet]. 2008 Jul;97(7):2426–47. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354916326302>
3. Beyer B, Schuster M, Jungbauer A, Lingg N. Microheterogeneity of Recombinant Antibodies: Analytics and Functional Impact. *Biotechnol J* [Internet]. 2018 Jan;13(1):1700476. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/biot.201700476>
4. Wang Y-C, Peterson SE, Loring JF. Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells. *Cell Res* [Internet]. 2014 Feb 12;24(2):143–60. Available from: <http://www.nature.com/articles/cr2013151>
5. Ebbers HC, Fehrmann B, Ottosen M, Hvorslev N, Høier P, Hwang JW, et al. Batch-to-Batch Consistency of SB4 and SB2, Etanercept and Infliximab Biosimilars. *BioDrugs* [Internet]. 2020;34(2):225–33. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40259-019-00402-0>
6. Schiestl M, Stangler T, Torella C, Čepeljnik T, Toll H, Grau R. Acceptable changes in quality attributes of glycosylated biopharmaceuticals. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2011 Apr 8;29(4):310–2. Available from: <http://www.nature.com/articles/nbt.1839>
7. European Medicines Agency (EMA). ICH guideline Q10 on Pharmaceutical Quality System (EMA/CHMP/ICH/2007) [Internet]. Committee for Human Medicinal Products. 2015 [cited 2021 Apr 16]. p. 1–20. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002871.pdf
8. Boven K, Stryker S, Knight J, Thomas A, van Regenmortel M, Kemeny DM, et al. The increased incidence of pure red cell aplasia with an Eprex formulation in uncoated rubber stopper syringes. *Kidney Int* [Internet]. 2005 Jun;67(6):2346–53. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815507242>
9. McKoy JM, Stonecash RE, Cournoyer D, Rossert J, Nissenson AR, Raisch DW, et al. Epoetin-associated pure red cell aplasia: past, present, and future considerations. *Transfusion* [Internet]. 2008 Aug;48(8):1754–62. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1537-2995.2008.01749.x>

10. Wang X, An Z, Luo W, Xia N, Zhao Q. Molecular and functional analysis of monoclonal antibodies in support of biologics development. *Protein Cell* [Internet]. 2018 Jan 21;9(1):74–85. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13238-017-0447-x>
11. Vezér B, Buzás Z, Sebeszta M, Zrubka Z. Authorized manufacturing changes for therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) in European Public Assessment Report (EPAR) documents. *Curr Med Res Opin* [Internet]. 2016 May 3;32(5):829–34. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1185/03007995.2016.1145579>
12. Lamanna WC, Holzmann J, Cohen HP, Guo X, Schweigler M, Stangler T, et al. Maintaining consistent quality and clinical performance of biopharmaceuticals. *Expert Opin Biol Ther* [Internet]. 2018;18(4):369–79. Available from: <https://doi.org/10.1080/14712598.2018.1421169>
13. Kaplan AP, Giménez-Arnau AM, Saini SS. Mechanisms of action that contribute to efficacy of omalizumab in chronic spontaneous urticaria. *Allergy* [Internet]. 2017 Apr;72(4):519–33. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/all.13083>
14. Gevaert P, Omachi TA, Corren J, Mullol J, Han J, Lee SE, et al. Efficacy and safety of omalizumab in nasal polyposis: 2 randomized phase 3 trials. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2020;146(3):595–605. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.05.032>
15. Abraham I, Alhossan A, Lee CS, Kutbi H, MacDonald K. ‘Real-life’ effectiveness studies of omalizumab in adult patients with severe allergic asthma: systematic review. *Allergy* [Internet]. 2016 May;71(5):593–610. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/all.12815>
16. European Medicines Agency (EMA). EMEA/H/C/000606-II/0093 - Xolair(R): - Summary of Product Characteristics [Internet]. 2015 [cited 2020 Feb 9]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xolair-epar-product-information_en.pdf
17. European Medicines Agency. ICH Topic Q 8 (R2) Pharmaceutical Development - Note for Guidance on Pharmaceutical Development [Internet]. Vol. 8. 2009 [cited 2020 Nov 4]. p. 25. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/note-guidance-pharmaceutical-development_en.pdf
18. European Medicines Agency (EMA). Xolair, INN-omalizumab - Scientific Discussion [Internet]. [cited 2020 Nov 6]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-discussion/xolair-epar-scientific-discussion_en.pdf
19. Goh JB, Ng SK. Impact of host cell line choice on glycan profile. *Crit Rev Biotechnol* [Internet].

- 2018;38(6):851–67. Available from: <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1416577>
20. Dumont J, Euwart D, Mei B, Estes S, Kshirsagar R. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol* [Internet]. 2016 Nov 1;36(6):1110–22. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388551.2015.1084266>
 21. Novartis Pharmaceuticals. Product monograph [Internet]. 2015 [cited 2020 Nov 13]. Available from: https://www.novartis.ca/sites/www.novartis.ca/files/xolair_scrip_e.pdf
 22. E.M.A. European Medicines Agency: EMA/CHMP/BWP/49348/2005 - Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: Quality issues. [Internet]. E.M.A. Publication. 2006 [cited 2020 Nov 13]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003953.pdf
 23. Topp EM. Commentary: Current Perspectives on the Aggregation of Protein Drugs. *AAPS J* [Internet]. 2014 May 22;16(3):413–4. Available from: <http://link.springer.com/10.1208/s12248-014-9580-0>
 24. Liu H, May K. Disulfide bond structures of IgG molecules. *MAbs* [Internet]. 2012 Jan 27;4(1):17–23. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/mabs.4.1.18347>
 25. Lamanna WC, Mayer RE, Rupprechter A, Fuchs M, Higel F, Fritsch C, et al. The structure-function relationship of disulfide bonds in etanercept. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 21;7(1):3951. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-04320-5>
 26. Harris RJ, Chin ET, Macchi F, Keck R. Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing [Internet]. Shire SJ, Gombotz W, Bechtold-Peters K, Andya J, editors. Vol. 17, *American Journal of Therapeutics*. New York, NY: Springer New York; 2010. 121 p. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-76643-0>
 27. Cacia J, Keck R, Presta LG, Frenz J. Isomerization of an Aspartic Acid Residue in the Complementarity-Determining Regions of a Recombinant Antibody to Human IgE: Identification and Effect on Binding Affinity. *Biochemistry* [Internet]. 1996 Jan 1;35(6):1897–903. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi951526c>
 28. Ouellette D, Alessandri L, Chin A, Grinnell C, Tarcsa E, Radziejewski C, et al. Studies in serum support rapid formation of disulfide bond between unpaired cysteine residues in the VH domain of an immunoglobulin G1 molecule. *Anal Biochem* [Internet]. 2010;397(1):37–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2009.09.027>

29. Food and Drug Administration. NDA/BLA Multi-disciplinary Review and Evaluation {BLA 103976, Supplement 5231} {Xolair/Xolair} Reference ID: 4326577. September 8, 2017 for initial rollout (NME/original BLA reviews) [Internet]. 2018 [cited 2020 Feb 9]. Available from: <https://www.fda.gov/media/124199/download>
30. Sacha G, Rogers JA, Miller RL. Pre-filled syringes: a review of the history, manufacturing and challenges. *Pharm Dev Technol* [Internet]. 2015 Jan 2;20(1):1–11. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10837450.2014.982825>
31. Sharma B. Immunogenicity of therapeutic proteins. Part 2: Impact of container closures. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2007;25(3):318–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.01.006>
32. U.S. Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). Guidance for Industry: Changes to an Approved Application: Biological Products [Internet]. 1997 [cited 2021 Mar 15]. Available from: <https://www.fda.gov/media/77277/download>
33. Kheddo P, Tracka M, Armer J, Dearman RJ, Uddin S, Van Der Walle CF, et al. The effect of arginine glutamate on the stability of monoclonal antibodies in solution. *Int J Pharm* [Internet]. 2014;473(1–2):126–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.06.053>
34. Falconer RJ. Advances in liquid formulations of parenteral therapeutic proteins. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2019;37(7):107412. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.06.011>
35. Ratanji KD, Derrick JP, Dearman RJ, Kimber I. Immunogenicity of therapeutic proteins: Influence of aggregation. *J Immunotoxicol* [Internet]. 2014 Apr 6;11(2):99–109. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/1547691X.2013.821564>
36. Somerville L, Bardelas J, Viegas A, D'Andrea P, Blogg M, Peachey G. Immunogenicity and safety of omalizumab in pre-filled syringes in patients with allergic (IgE-mediated) asthma. *Curr Med Res Opin* [Internet]. 2014 Jan;30(1):59–66. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1185/03007995.2013.844115>
37. Dranitsaris G, Jacobs I, Kirchoff C, Popovian R, Shane LG. Drug tendering: drug supply and shortage implications for the uptake of biosimilars. *Clin Outcomes Res* [Internet]. 2017 Sep;Volume 9:573–84. Available from: <https://www.dovepress.com/drug-tendering-drug-supply-and-shortage-implications-for-the-uptake-of-peer-reviewed-article-CEOR>
38. European Commission. Commission Directive 2003/63/EC amending Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council on the Community code relating to medicinal products for human use (25 June 2003). *Off J Eur Union* [Internet]. 2003; Available from:

- <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:159:0046:0094:en:PDF>
39. Section 351(k) of the Public Health Service Act as amended by the Patient Protection and Affordable Care Act under the Biologics Price Competition and Innovation (BCPI) Act. USA; 2010 p. 3590–686.
 40. EMA. Guideline on similar biological medicinal products (CHMP/437/04 Rev 1) [Internet]. 2014. Available from: www.ema.europa.eu/contact
 41. de Mora F. Biosimilar: what it is not. *Br J Clin Pharmacol* [Internet]. 2015 Nov;80(5):949–56. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bcp.12656>
 42. IMS. Delivering on the potential of Biosimilar Medicines: The role of functioning competitive markets [Internet]. 2016 [cited 2020 Jul 2]. Available from: <https://www.medicinesforeurope.com/wp-content/uploads/2016/11/Delivering-on-the-potential-biosimilr-ok9.pdf>
 43. Ramírez Herráinz E, Morell Baladrón A. Biosimilares: impacto económico de su utilización en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. *Actual en Farmacol y Ter* [Internet]. 2017;15(4):259–63. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6253842>
 44. Calleja-Hernández MÁ, Martínez-Sesmero JM, Santiago-Josefat B. Biosimilars of monoclonal antibodies in inflammatory diseases and cancer: Current situation, challenges, and opportunities. *Farm Hosp* [Internet]. 2020;44(3):100–8. Available from: <https://revistafarmaciahospitalaria.sefh.es/gdcr/index.php/fh/article/view/11280/11280ing>
 45. Patel PK, King CR, Feldman SR. Biologics and biosimilars. *J Dermatolog Treat* [Internet]. 2015 Jul 4;26(4):299–302. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/09546634.2015.1054782>
 46. Schiestl M, Zabransky M, Sörgel F. Ten years of biosimilars in Europe: development and evolution of the regulatory pathways. *Drug Des Devel Ther* [Internet]. 2017 May;Volume 11:1509–15. Available from: <https://www.dovepress.com/ten-years-of-biosimilars-in-europe-development-and-evolution-of-the-re-peer-reviewed-article-DDDT>
 47. GaBI Journal Editor. Patent expiry dates for biologicals: 2016 update. *Generics Biosimilars Initiat J* [Internet]. 2017 Mar 15;6(1):27–30. Available from: <http://gabi-journal.net/patent-expiry-dates-for-biologicals-2016-update.html>
 48. BiosanaPharma. Press release BiosanaPharma announces successful outcome of comparative phase I study of BP001 , a biosimilar candidate to Xolair ® [Internet]. 2020 [cited 2020 Jul 27]. Available from: <https://7301a529-be14-475b-8c71->

- b839f438e656.filesusr.com/ugd/3f142e_3299ecc4fa3647068ebd69ee29b2c3a2.pdf
49. BiosanaPharma Announces Successful Outcome Of Comparative Phase I Study Of BP001, A Biosimilar Candidate To Xolair (omalizumab) [Internet]. Biosimilar Development. [cited 2021 Sep 27]. Available from: <https://www.biosimilardevelopment.com/doc/biosanapharma-announces-successful-phase-i-study-of-bp-a-biosimilar-xolair-omalizumab-0001>
 50. BiosanaPharma Product development [Internet]. [cited 2021 Sep 27]. Available from: <https://www.biosanapharma.com/productdevelopment>
 51. Celltrion. To Compare Efficacy and Safety of CT-P39 and EU-approved Xolair in Patients With Chronic Spontaneous Urticaria (omalizumab) [Internet]. ClinicalTrials.gov. 2021 [cited 2021 Sep 27]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04426890>
 52. Fountain Biopharma pipeline - FB317 [Internet]. [cited 2020 Jul 27]. Available from: https://www.fountainmab.com/home_03.php?p=7&a=53
 53. Glenmark. GLENMARK PHARMACEUTICALS ANNOUNCES ENCOURAGING PHASE 1 RESULTS SUPPORTING BIOSIMILARITY CRITERIA FOR GBR 310 COMPARED TO THE REFERENCE PRODUCT OMALIZUMAB [Internet]. 2018 [cited 2020 Jul 27]. Available from: <https://glenmarkpharma-us.com/press/glenmark-pharmaceuticals-announces-encouraging-phase-1-results-supporting-biosimilarity-criteria-for-gbr-310-compared-to-the-reference-product-omalizumab/>
 54. Sorrento Therapeutics. Sorrento Announces Positive Data from a Combined Phase 2 & 3 Clinical Study of STI-004, an Anti-IgE Biosimilar Antibody [Internet]. 2016 [cited 2020 Jul 27]. Available from: <https://investors.sorrentotherapeutics.com/news-releases/news-release-details/sorrento-announces-positive-data-combined-phase-2-3-clinical>
 55. Novartis Pharmaceuticals. Novartis Product Sales - Full year 2020 product sales [Internet]. 2021. Available from: <https://www.novartis.com/investors/financial-data/product-sales>
 56. Feagan BG, Choquette D, Ghosh S, Gladman DD, Ho V, Meibohm B, et al. The challenge of indication extrapolation for infliximab biosimilars. *Biologicals* [Internet]. 2014 Jul;42(4):177–83. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1045105614000451>
 57. Weise M, Kurki P, Wolff-Holz E, Bielsky M-C, Schneider CK. Biosimilars: the science of extrapolation. *Blood* [Internet]. 2014 Nov 20;124(22):3191–6. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/124/22/3191/33381/Biosimilars-the-science-of-extrapolation>
 58. Ebbers HC. Biosimilars: In support of extrapolation of indications. *J Crohn's Colitis* [Internet].

- 2014;8(5):431–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.crohns.2014.02.007>
59. Jardieu P, Presta LG. NUCLEIC ACID ENCODING ANTI-IGE ANTIBODIES [Internet]. Vol. 2. United States; US 7,351,816 B2, 2008. Available from: <https://patentimages.storage.googleapis.com/2d/a9/c8/d80a93e27d9e6d/US7351816.pdf>
60. Royle L, Campbell MP, Radcliffe CM, White DM, Harvey DJ, Abrahams JL, et al. HPLC-based analysis of serum N-glycans on a 96-well plate platform with dedicated database software. *Anal Biochem* [Internet]. 2008 May;376(1):1–12. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269707007944>
61. Brockhausen I. *Glycobiology Protocols - Methods in Molecular Biology*. 2006. 125–144 p.
62. Jung SK, Lee KH, Jeon JW, Lee JW, Kwon BO, Kim YJ, et al. Physicochemical characterization of Remsima®. *MAbs* [Internet]. 2014 Sep 3;6(5):1163–77. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/mabs.32221>
63. Kim S, Song J, Park S, Ham S, Paek K, Kang M, et al. Drifts in ADCC-related quality attributes of Herceptin®: Impact on development of a trastuzumab biosimilar. *MAbs* [Internet]. 2017;9(4):704–14. Available from: <https://doi.org/10.1080/19420862.2017.1305530>
64. Jensen RK, Plum M, Tjerrild L, Jakob T, Spillner E, Andersen GR. Structure of the omalizumab Fab. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Commun* [Internet]. 2015 Apr 1;71(4):419–26. Available from: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S2053230X15004100>
65. Wright JD, Chu H-M, Huang C-H, Ma C, Wen Chang T, Lim C. Structural and Physical Basis for Anti-IgE Therapy. *Sci Rep* [Internet]. 2015 Sep 26;5(1):11581. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep11581>
66. Mitropoulou AN, Ceska T, Heads JT, Beavil AJ, Henry AJ, McDonnell JM, et al. Engineering the Fab fragment of the anti-IgE omalizumab to prevent Fab crystallization and permit IgE-Fc complex crystallization. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Commun* [Internet]. 2020 Mar 1;76(3):116–29. Available from: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S2053230X20001466>
67. European Medicines Agency (EMA). Guideline on Similar Biological Medicinal Products Containing Monoclonal Antibodies - Non-Clinical and Clinical Issues. *Biotechnol Law Rep* [Internet]. 2011 Apr;30(2):235–42. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-monoclonal-antibodies-non-clinical_en.pdf
68. GE Healthcare Life Sciences. *Biacore™ T200 Instrument Handbook* [Internet]. 28th-9768th–63rd ed. 2010. Available from: <https://shared-resources.dhvi.duke.edu/sites/shared->

- resources.dhvi.duke.edu/files/Biacore T200 Instrument Handbook.pdf
69. GE Healthcare. Biacore™ T200 - Software Handbook [Internet]. 28th-9768th–78th ed. Vol. 200, Manual. 2015. 1–8 p. Available from: <https://rrc.uic.edu/wp-content/uploads/sites/112/2020/02/BiacoreT200SoftwareHandbook.pdf>
 70. GE Healthcare. Biacore T200 - Getting Started [Internet]. 2013. Available from: https://cmi.hms.harvard.edu/files/cmi/files/biacoret200_gettingstarted_handbook.pdf
 71. GE Healthcare. Biacore™ Assay Handbook [Internet]. GE Healthcare Bio-Sciences AB. 2002. 129 S. : Ill., graph. Darst. Available from: <http://publications.rwth-aachen.de/record/56938>
 72. GE Healthcare. HiTrap Protein A HP - HiTrap affinity columns Instructions 71-7002-00 AP [Internet]. Manual. 2009. p. 1–16. Available from: <http://wwwuser.gwdg.de/~jgrossh/protocols/protein-purification/ProtA-HiTrap.pdf>
 73. Lakens D. Equivalence Tests. Soc Psychol Personal Sci [Internet]. 2017 May 5;8(4):355–62. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1948550617697177>
 74. Hofmann HP, Kronthaler U, Fritsch C, Grau R, Müller SO, Mayer R, et al. Characterization and non-clinical assessment of the proposed etanercept biosimilar GP2015 with originator etanercept (Enbrel®). Expert Opin Biol Ther [Internet]. 2016;16(10):1185–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14712598.2016.1217329>
 75. Food and Drug Administration. History of Bioequivalence for Critical Dose Drugs. In: <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/./UCM209319.pdf> [Internet]. 2010. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/./UCM209319.pdf>
 76. Visser J, Feuerstein I, Stangler T, Schmiederer T, Fritsch C, Schiestl M. Physicochemical and Functional Comparability Between the Proposed Biosimilar Rituximab GP2013 and Originator Rituximab. BioDrugs [Internet]. 2013 Oct 7;27(5):495–507. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s40259-013-0036-3>
 77. European Medicines Agency (EMA). Guideline on the investigation of bioequivalence. Committee for Medical Products for Human Use (CHMP). [Internet]. Vol. 569, Committee for Medical Products for Human Use (CHMP). 2010. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-bioequivalence-rev1_en.pdf
 78. Kirshenbaum AS, Akin C, Wu Y, Rottem M, Goff JP, Beaven MA, et al. Characterization of novel stem cell factor responsive human mast cell lines LAD 1 and 2 established from a patient with mast cell sarcoma/leukemia; activation following aggregation of FcεRI or FcγRI. Leuk Res

- [Internet]. 2003 Aug;27(8):677–82. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0145212602003430>
79. Nakamura R, Ishiwatari A, Higuchi M, Uchida Y, Nakamura R, Kawakami H, et al. Evaluation of the Luciferase Assay-Based In Vitro Elicitation Test for Serum IgE. *Allergol Int* [Internet]. 2015;61(3):431–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.2332/allergolint.11-OA-0407>
80. Nakamura R, Uchida Y, Higuchi M, Nakamura R, Tsuge I, Urisu A, et al. A convenient and sensitive allergy test: IgE crosslinking-induced luciferase expression in cultured mast cells. *Allergy* [Internet]. 2010 Oct;65(10):1266–73. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1398-9995.2010.02363.x>
81. Dibbern DA, Palmer GW, Williams PB, Bock SA, Dreskin SC. RBL cells expressing human FcεRI are a sensitive tool for exploring functional IgE–allergen interactions: studies with sera from peanut-sensitive patients. *J Immunol Methods* [Internet]. 2003 Mar;274(1–2):37–45. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022175902003691>
82. Rådinger M, Jensen BM, Kuehn HS, Kirshenbaum A, Gilfillan AM. Generation, Isolation, and Maintenance of Human Mast Cells and Mast Cell Lines Derived from Peripheral Blood or Cord Blood. In: *Current Protocols in Immunology* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2010. p. 1–12. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142735.im0737s90>
83. Kuehn HS, Radinger M, Gilfillan AM. Measuring Mast Cell Mediator Release. In: *Current Protocols in Immunology* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2010. p. 1–10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2982193/pdf/nihms249752.pdf>
84. Garman SC, Wurzburg BA, Tarchevskaya SS, Kinet J-P, Jardetzky TS. Structure of the Fc fragment of human IgE bound to its high-affinity receptor FcεRIα. *Nature* [Internet]. 2000 Jul;406(6793):259–66. Available from: <http://www.nature.com/articles/35018500>
85. Dombrowicz D, Flamand V, Brigman KK, Koller BH, Kinet J-P. Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor α chain gene. *Cell* [Internet]. 1993 Dec;75(5):969–76. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867493905407>
86. Dombrowicz D, Lin S, Flamand V, Brini AT, Koller BH, Kinet J-P. Allergy-Associated FcRβ Is a Molecular Amplifier of IgE- and IgG-Mediated In Vivo Responses. *Immunity* [Internet]. 1998 Apr;8(4):517–29. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761300805567>

87. Dombrowicz D, Nutten S, Desreumaux P, Neut C, Torpier G, Peeters M, et al. Role of the High Affinity Immunoglobulin E Receptor in Bacterial Translocation and Intestinal Inflammation. *J Exp Med* [Internet]. 2001 Jan 1;193(1):25–34. Available from: <https://rupress.org/jem/article/193/1/25/20084/Role-of-the-High-Affinity-Immunoglobulin-E>
88. Dombrowicz D, Brini AT, Flamand V, Hicks E, Snouwaert JN, Kinet JP, et al. Anaphylaxis mediated through a humanized high affinity IgE receptor. *J Immunol* [Internet]. 1996;157(4):1645–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8759751>
89. Ministerio de la Presidencia. Rd 53/2013. Boe 2013 p. 11370–421.
90. D.O.U.E. Directiva 2010/63/UE. D.O.U.E. 2010 p. 33–79.
91. Ovary Z. Immediate Reactions in the Skin of Experimental Animals Provoked by Antibody-Antigen Interaction*. In p. 459–508. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/391325>
92. Inagaki N, Goto S, Nagai H, Koda A. Pharmacological Characterization of Mouse Ear PCA. *Int Arch Allergy Immunol* [Internet]. 1985;78(2):113–7. Available from: <https://mail.google.com/mail/u/0/?ui=2&view=bsp&ver=ohhl4rw8mbn4%5Cnpapers2://publication/doi/10.1002/adfm.201101687>
93. Serra-Pages M, Olivera A, Torres R, Picado C, de Mora F, Rivera J. E-prostanoid 2 receptors dampen mast cell degranulation via cAMP/PKA-mediated suppression of IgE-dependent signaling. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2012 Dec;92(6):1155–65. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.0212109>
94. Serra-Pages M, Torres R, Plaza J, Herrerias A, Costa-Farré C, Marco A, et al. Activation of the Prostaglandin E2 receptor EP2 prevents house dust mite-induced airway hyperresponsiveness and inflammation by restraining mast cells' activity. *Clin Exp Allergy* [Internet]. 2015 Oct;45(10):1590–600. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cea.12542>
95. Zhang K, Elias M, Zhang H, Liu J, Kepley C, Bai Y, et al. Inhibition of Allergic Reactivity through Targeting FcεRI-Bound IgE with Humanized Low-Affinity Antibodies. *J Immunol* [Internet]. 2019 Dec 1;203(11):2777–90. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1900112>
96. Rossi M, Ruvo M, Marasco D, Colombo M, Cassani G, Verdoliva A. Anti-allergic properties of a new all-D synthetic immunoglobulin-binding peptide. *Mol Immunol* [Internet]. 2008 Jan;45(1):226–34. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016158900700168X>

97. Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med* [Internet]. 2012 May 4;18(5):693–704. Available from: <http://www.nature.com/articles/nm.2755>
98. River C. Passive Cutaneous Anaphylaxis Model [Internet]. 2018. Available from: <https://www.criver.com/products-services/discovery-services/vivo-pharmacology/inflammation-and-immunology-pharmacology-models/pharmacodynamic-models/passive-cutaneous-anaphylaxis-model?region=3696>
99. Plaza J. Validación Preclínica del Receptor EP2 Matocitario como Diana Terapéutica Antiasmática. Universitat Autònoma de Barcelona; 2016.
100. Patil P, Peng RD, Leek JT. A statistical definition for reproducibility and replicability. *BioRxiv* [Internet]. 2016;8–13. Available from: <https://click.endnote.com/viewer?doi=10.1101%2F066803&token=WzE3MjE2MDQsIjEwLjExMDEvMDY2ODAzIl0.dMLaOSk7YjNTzPru1WHtHj1fOBo>
101. Torres R, Herrerias A, Serra-Pagès M, Marco A, Plaza J, Costa-Farré C, et al. Locally administered prostaglandin E2 prevents aeroallergen-induced airway sensitization in mice through immunomodulatory mechanisms. *Pharmacol Res* [Internet]. 2013;70(1):50–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2012.12.008>
102. Kay LJ, Yeo WW, Peachell PT. Prostaglandin E 2 activates EP 2 receptors to inhibit human lung mast cell degranulation. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2006 Apr;147(7):707–13. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1038/sj.bjp.0706664>
103. Säfholm J, Manson ML, Bood J, Delin I, Orre A-C, Bergman P, et al. Prostaglandin E2 inhibits mast cell-dependent bronchoconstriction in human small airways through the E prostanoid subtype 2 receptor. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2015 Nov;136(5):1232-1239.e1. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674915004893>
104. Plaza J, Torres R, Urbano A, Picado C, de Mora F. In Vitro and In Vivo Validation of EP2-Receptor Agonism to Selectively Achieve Inhibition of Mast Cell Activity. *Allergy Asthma Immunol Res* [Internet]. 2020;12(4):712. Available from: <https://e-aair.org/DOIx.php?id=10.4168/aair.2020.12.4.712>
105. Cates EC, Fattouh R, Wattie J, Inman MD, Goncharova S, Coyle AJ, et al. Intranasal Exposure of Mice to House Dust Mite Elicits Allergic Airway Inflammation via a GM-CSF-Mediated Mechanism. *J Immunol* [Internet]. 2004;173(10):6384–92. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.173.10.6384>
106. Urbano A, Plaza J, Turon S, Pujol A, Costa-Farré C, Marco A, et al. Transgenic mice overexpressing the PGE 2 receptor EP 2 on mast cells exhibit a protective phenotype in a model

- of allergic asthma. *Allergy* [Internet]. 2021 Oct 10;76(10):3196–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/all.14988>
107. Torres R, Picado C, de Mora F. The PGE2-EP2-mast cell axis: An antiasthma mechanism. *Mol Immunol* [Internet]. 2015;63(1):61–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2014.03.007>
108. Sivapalan N, Wattie J, Inman MD, Sehmi R. Lung-Homing of Endothelial Progenitor Cells and Airway Vascularization Is Only Partially Dependant on Eosinophils in a House Dust Mite-Exposed Mouse Model of Allergic Asthma. Melo RCN, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Oct 3;9(10):e109991. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0109991>
109. Rosenberg HF, Phipps S, Foster PS. Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2007 Jun;119(6):1303–10. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674907006495>
110. Foster PS, Mould AW, Yang M, Mackenzie J, Mattes J, Hogan SP, et al. Elemental signals regulating eosinophil accumulation in the lung. *Immunol Rev* [Internet]. 2001 Feb;179(1):173–81. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-065X.2001.790117.x>
111. Kuo C-HS, Pavlidis S, Zhu J, Loza M, Baribaud F, Rowe A, et al. Contribution of airway eosinophils in airway wall remodeling in asthma: Role of MMP-10 and MET. *Allergy* [Internet]. 2019 Jun;74(6):1102–12. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/all.13727>
112. Ganesh T. Prostanoid Receptor EP2 as a Therapeutic Target. *J Med Chem* [Internet]. 2014 Jun 12;57(11):4454–65. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm401431x>
113. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2018 Dec 6;36(12):1136–45. Available from: <http://www.nature.com/articles/nbt.4305>
114. Donini R, Haslam SM, Kontoravdi C. Glycoengineering Chinese hamster ovary cells: a short history. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2021 Apr 30;49(2):915–31. Available from: <https://portlandpress.com/biochemsoctrans/article/49/2/915/228062/Glycoengineering-Chinese-hamster-ovary-cells-a>
115. Ghaderi D, Taylor RE, Padler-Karavani V, Diaz S, Varki A. Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2010 Aug 25;28(8):863–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/nbt.1651>
116. Chung CH, Mirakhur B, Chan E, Le Q-T, Berlin J, Morse M, et al. Cetuximab-Induced Anaphylaxis and IgE Specific for Galactose- α -1,3-Galactose. *N Engl J Med* [Internet]. 2008 Mar 13;358(11):1109–17. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa074943>

117. Duivelshof BL, Jiskoot W, Beck A, Veuthey JL, Guillaume D, D'Atri V. Glycosylation of biosimilars: Recent advances in analytical characterization and clinical implications. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2019;1089:1–18. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.08.044>
118. Reusch D, Habegger M, Falck D, Peter B, Maier B, Gassner J, et al. Comparison of methods for the analysis of therapeutic immunoglobulin G Fc-glycosylation profiles—Part 2: Mass spectrometric methods. *MAbs* [Internet]. 2015 Jul 4;7(4):732–42. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19420862.2015.1045173>
119. Sirin S, Apgar JR, Bennett EM, Keating AE. <sc>AB</sc> -Bind: Antibody binding mutational database for computational affinity predictions. *Protein Sci* [Internet]. 2016 Feb 6;25(2):393–409. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pro.2829>
120. Bee C, Abdiche YN, Stone DM, Collier S, Lindquist KC, Pinkerton AC, et al. Exploring the Dynamic Range of the Kinetic Exclusion Assay in Characterizing Antigen-Antibody Interactions. Hofmann A, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Apr 30;7(4):e36261. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0036261>
121. Azimzadeh A, Van Regenmortel MH V. Antibody affinity measurements. *J Mol Recognit* [Internet]. 1990 Jun;3(3):108–16. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmr.300030304>
122. Herrerias A, Torres R, Serra M, Marco A, Pujols L, Picado C, et al. Activity of the cyclooxygenase 2-prostaglandin-E prostanoid receptor pathway in mice exposed to house dust mite aeroallergens, and impact of exogenous prostaglandin E2. *J Inflamm* [Internet]. 2009 Dec 30;6(1):30. Available from: <https://journal-inflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-9255-6-30>
123. European Medicines Agency (EMA). EMA/CHMP/BWP/247713/2012 - Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance : quality issues (revision 1) 2014, Julio 2020.
124. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA. The Impact of Glycosylation on the Biological Function and Structure of Human Immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2007 Apr;25(1):21–50. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702>
125. Wright A, Morrison SL. Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering. *Trends Biotechnol* [Internet]. 1997 Jan;15(1):26–32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779996100627>
126. Food and Drug Administration. Quality Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a

- Reference Product [Internet]. Guidance for Industry. 2015. p. 1–22. Available from: <https://www.fda.gov/media/135612/download>
127. European Medicines Agency. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues (EMA/CHMP/BMWP/42832/2005) [Internet]. 2006. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-active_en-1.pdf
128. Inc. NPC. Xolair(R), PRODUCT MONOGRAPH. Farumashia. 2016.
129. Harvey DJ, Merry AH, Royle L, P. Campbell M, Dwek RA, Rudd PM. Proposal for a standard system for drawing structural diagrams of N - and O -linked carbohydrates and related compounds. *Proteomics* [Internet]. 2009 Aug;9(15):3796–801. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pmic.200900096>

8-

REFERENCIAS



8. ANEXOS

8.1. Anexo 1. Gráficas de los análisis del estudio de glicosilación

8.1.1. Anexo 1.1. Cromatogramas de los triplicados analizados por HILIC

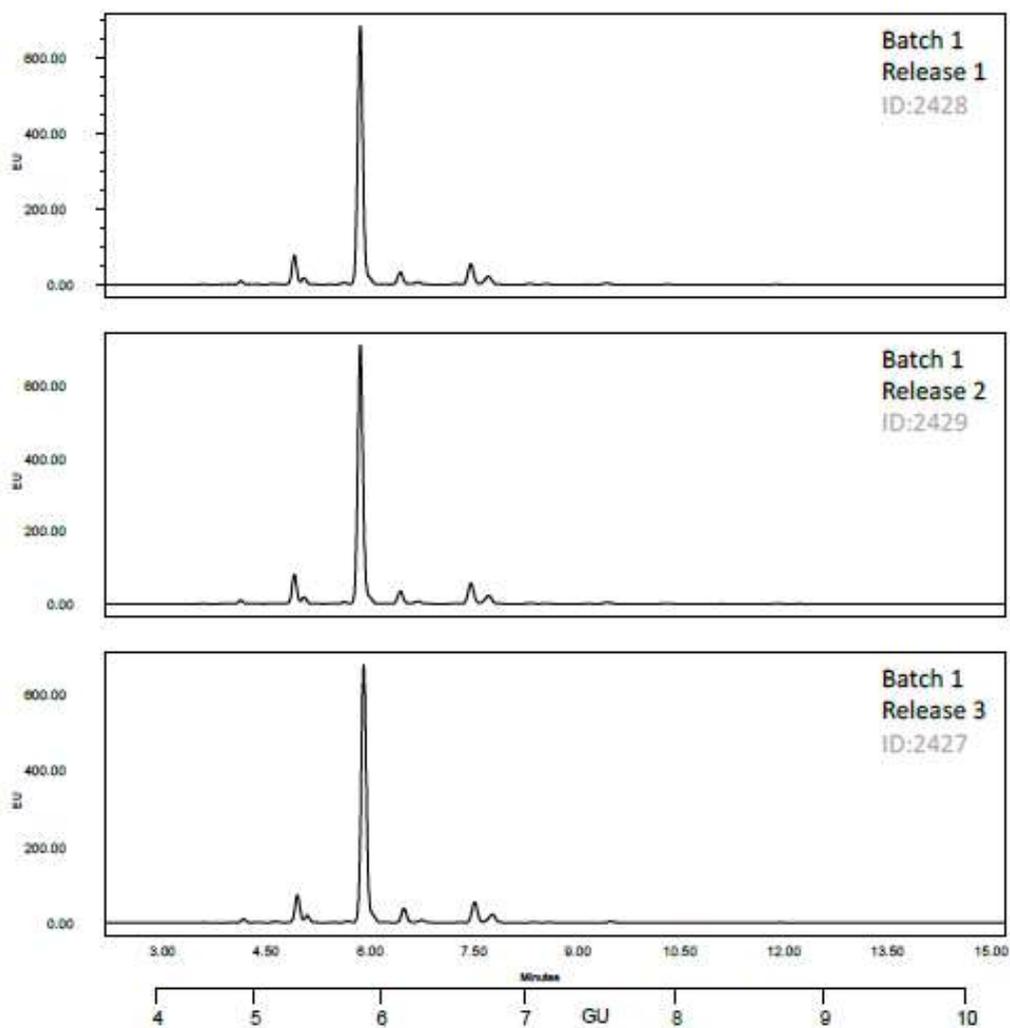


Figura 32. Cromatogramas del análisis por triplicado de los glicanos marcados fluorescentemente con 2-AB del lote 1 de Xolair® por la técnica HILIC.

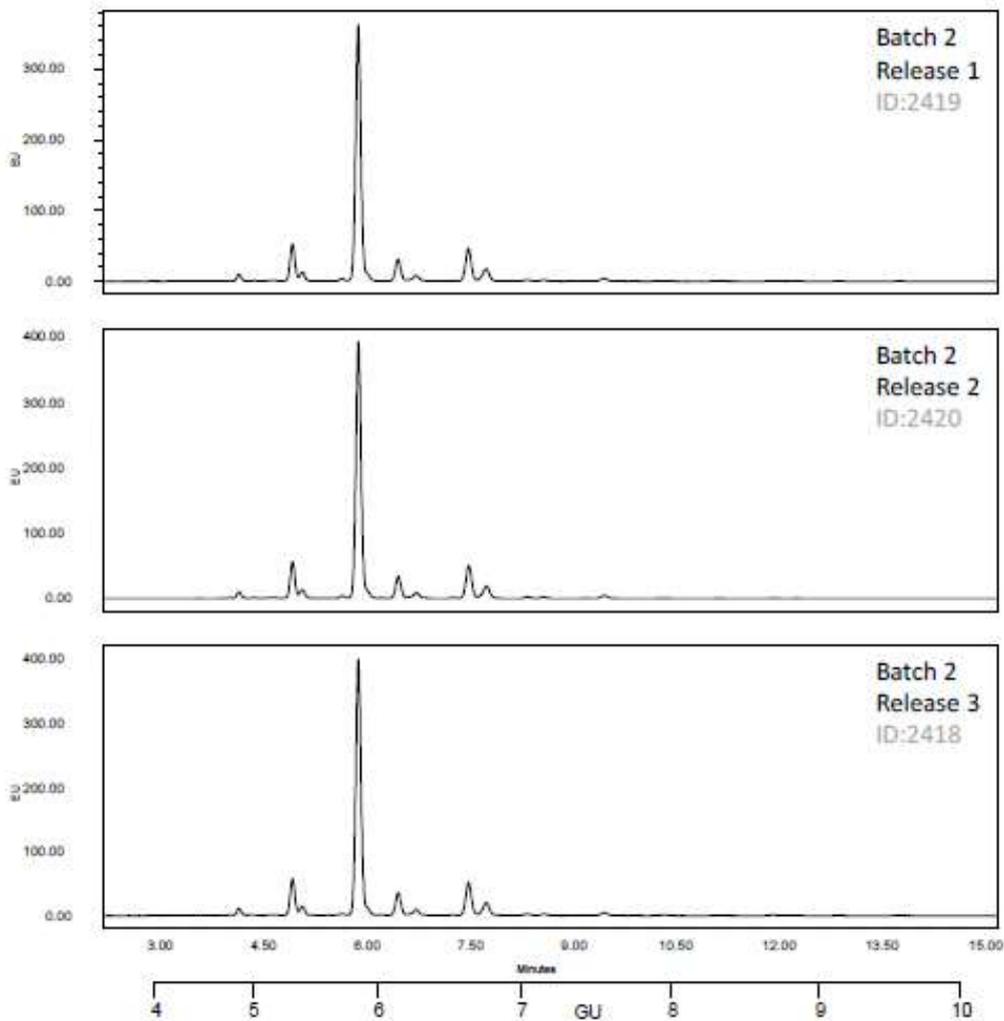


Figura 33. Cromatogramas del análisis por triplicado de los glicanos marcados fluorescentemente con 2-AB del lote 2 de Xolair® por la técnica HILIC.

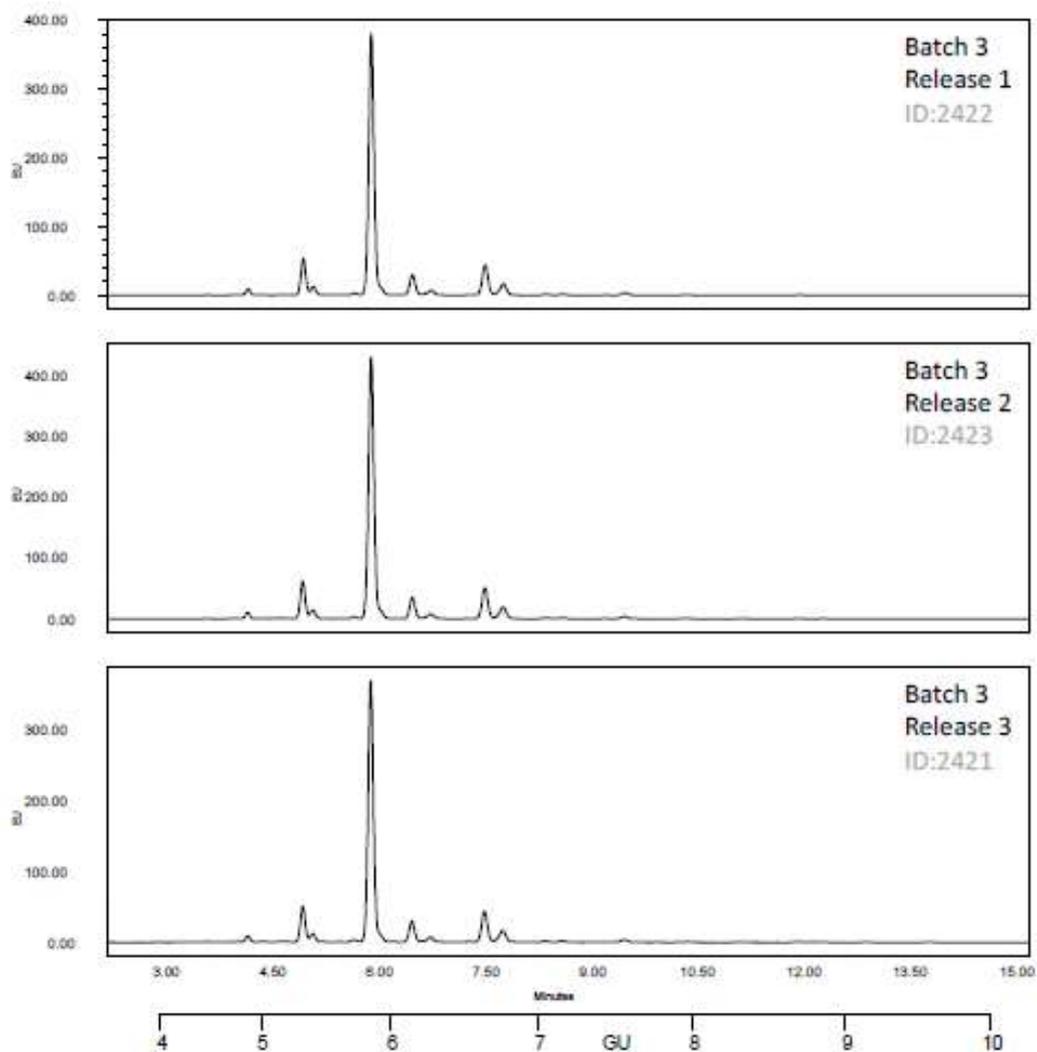


Figura 34. Cromatogramas del análisis por triplicado de los glicanos marcados fluorescentemente con 2-AB del lote 3 de Xolair® por la técnica HILIC.

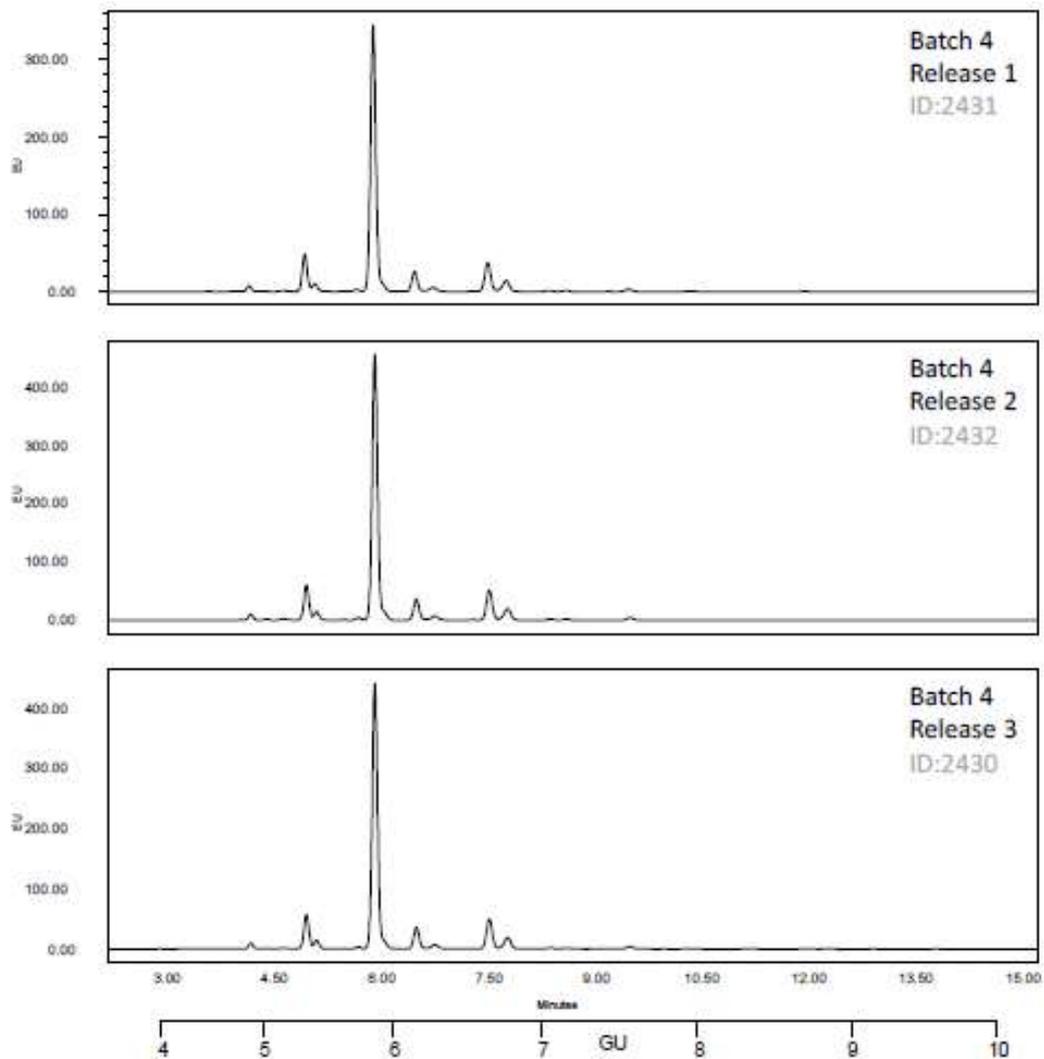


Figura 35. Cromatogramas del análisis por triplicado de los glicanos marcados fluorescentemente con 2-AB del lote 4 de Xolair® por la técnica HILIC.

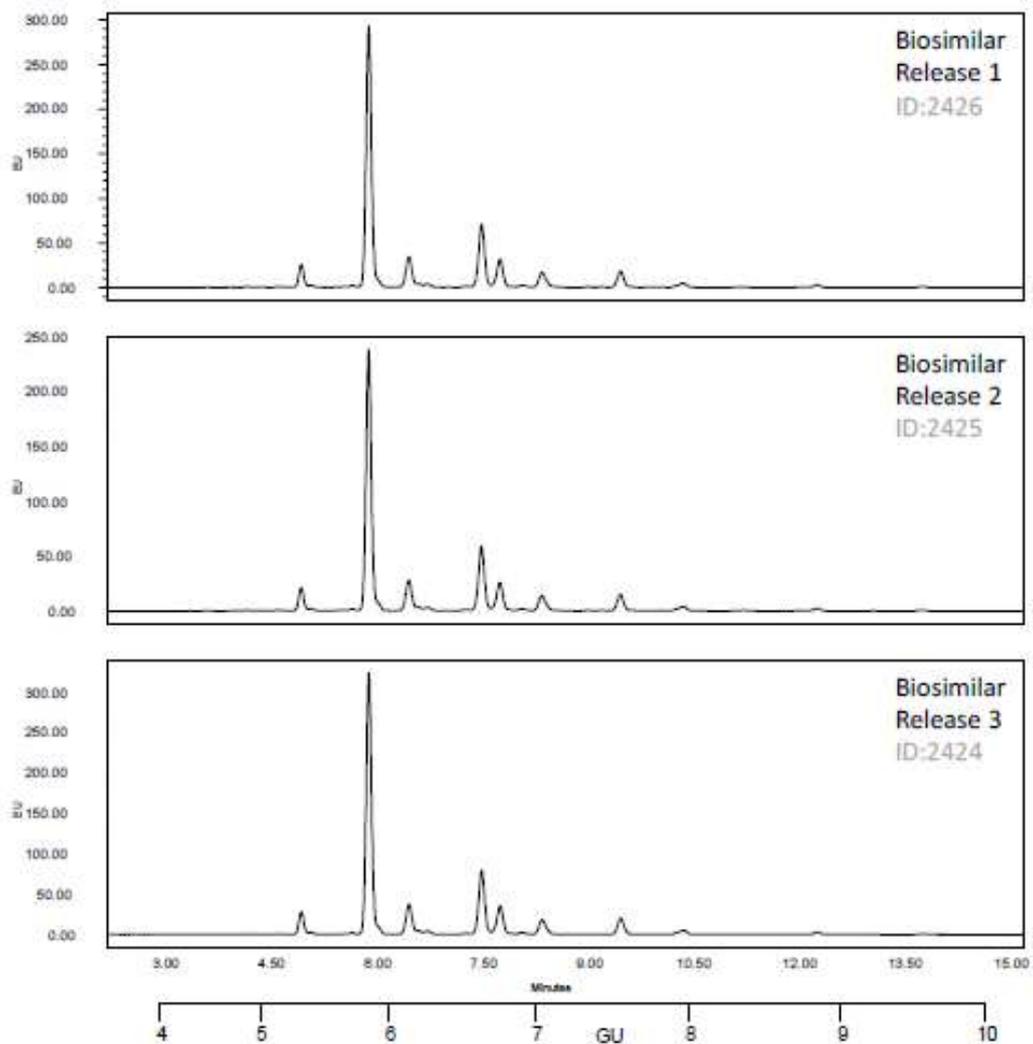


Figura 36. Cromatogramas del análisis por triplicado de los glicanos marcados fluorescentemente con 2-AB de un lote de la molécula veOMA por la técnica HILIC.

8.1.2. Anexo 1.2. Digestión y caracterización de los *N*-glicanos

a) Cromatogramas de las digestiones

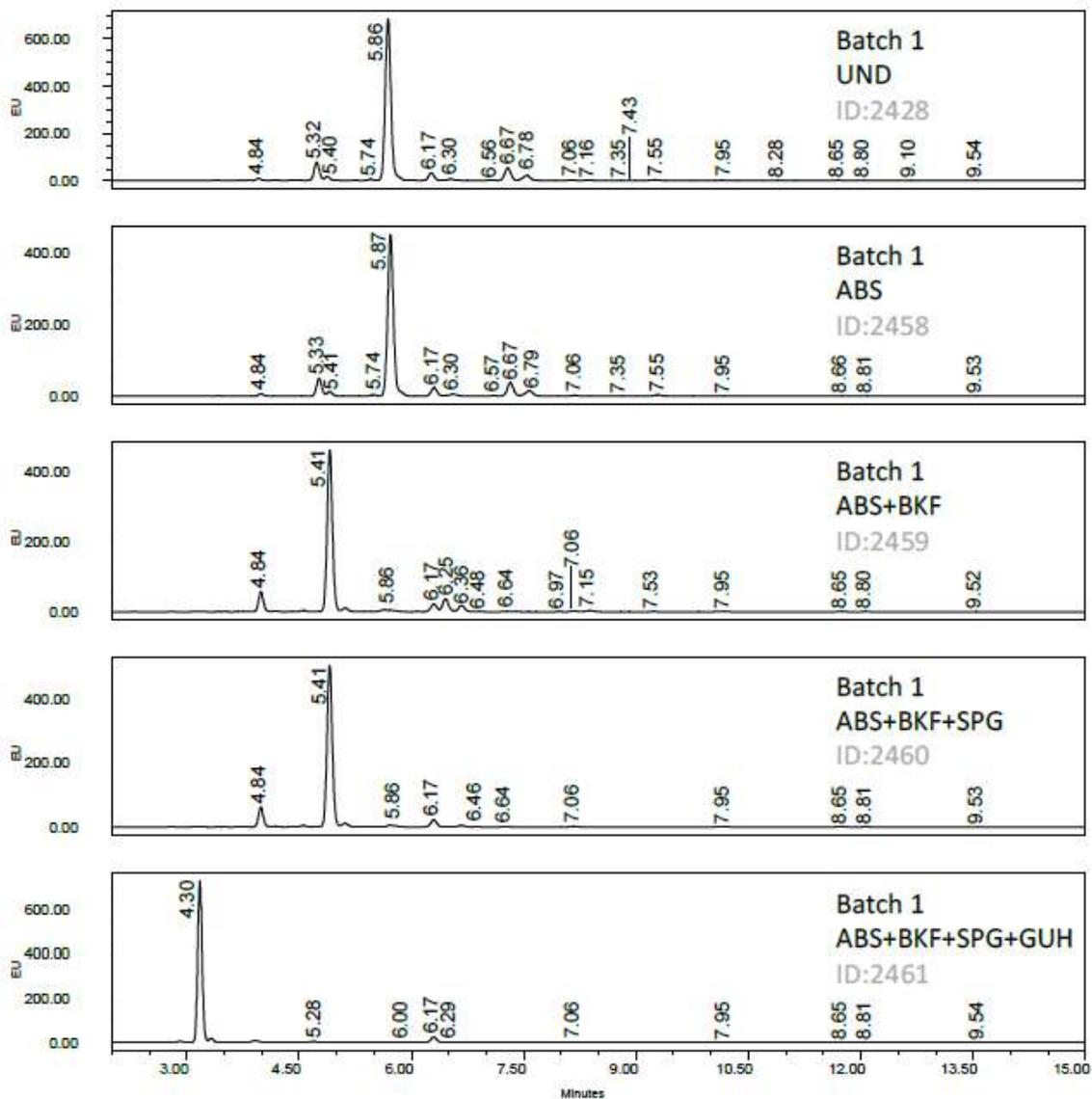


Figura 37. Cromatogramas de la técnica de separación por HILIC de la muestra de *N*-glicanos del lote 1 de Xolair®. El primer cromatograma corresponde a la muestra de *N*-glicanos sin digerir (UND) y luego (hacia abajo) los cromatogramas resultados de las digestiones con enzimas exoglicosidasas. ABS: *Athrobacter ureafaciens* sialidasa, BKF: α -fucosidasa de riñón bovino, SPG: β -Galactosidasa de *Streptococcus pneumonia*, GUH: Hexosaminidasa de *Streptococcus pneumonia*. En la **Figura 42** se muestran con más detalle los sitios específicos de corte de cada enzima usada.

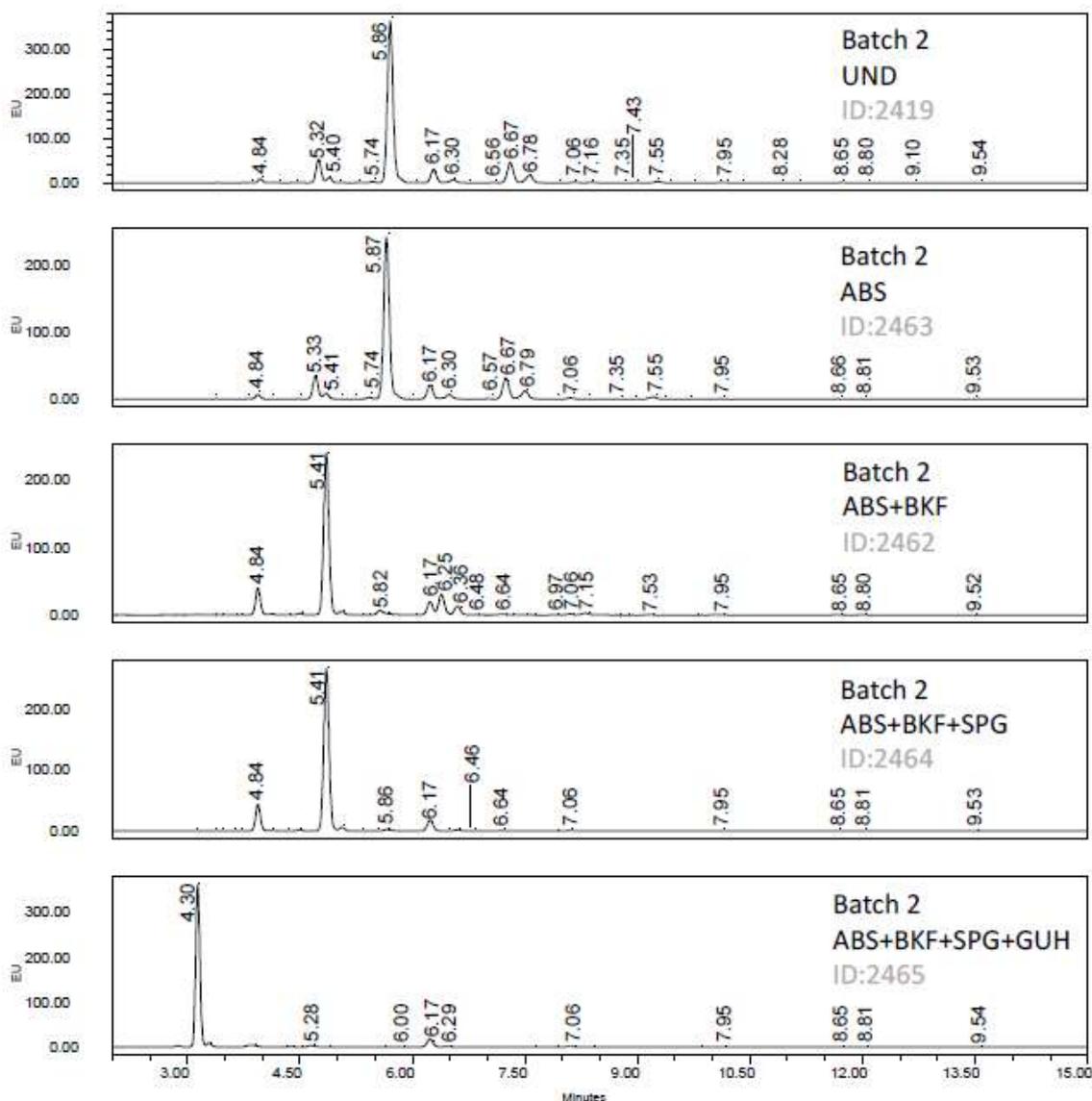


Figura 38. Cromatogramas de la técnica de separación por HILIC de la muestra de N-glicanos del lote 2 de Xolair®. El primer cromatograma corresponde a la muestra de N-glicanos sin digerir (UND) y luego (hacia abajo) los cromatogramas resultados de las digestiones con enzimas exoglicosidasas. ABS: *Athrobacter ureafaciens* sialidasa, BKF: α -fucosidasa de riñón bovino, SPG: β -Galacosidasa de *Streptococcus pneumonia*, GUH: Hexosaminidasa de *Streptococcus pneumonia*. En la **Figura 42** se muestran con más detalle los sitios específicos de corte de cada enzima usada.

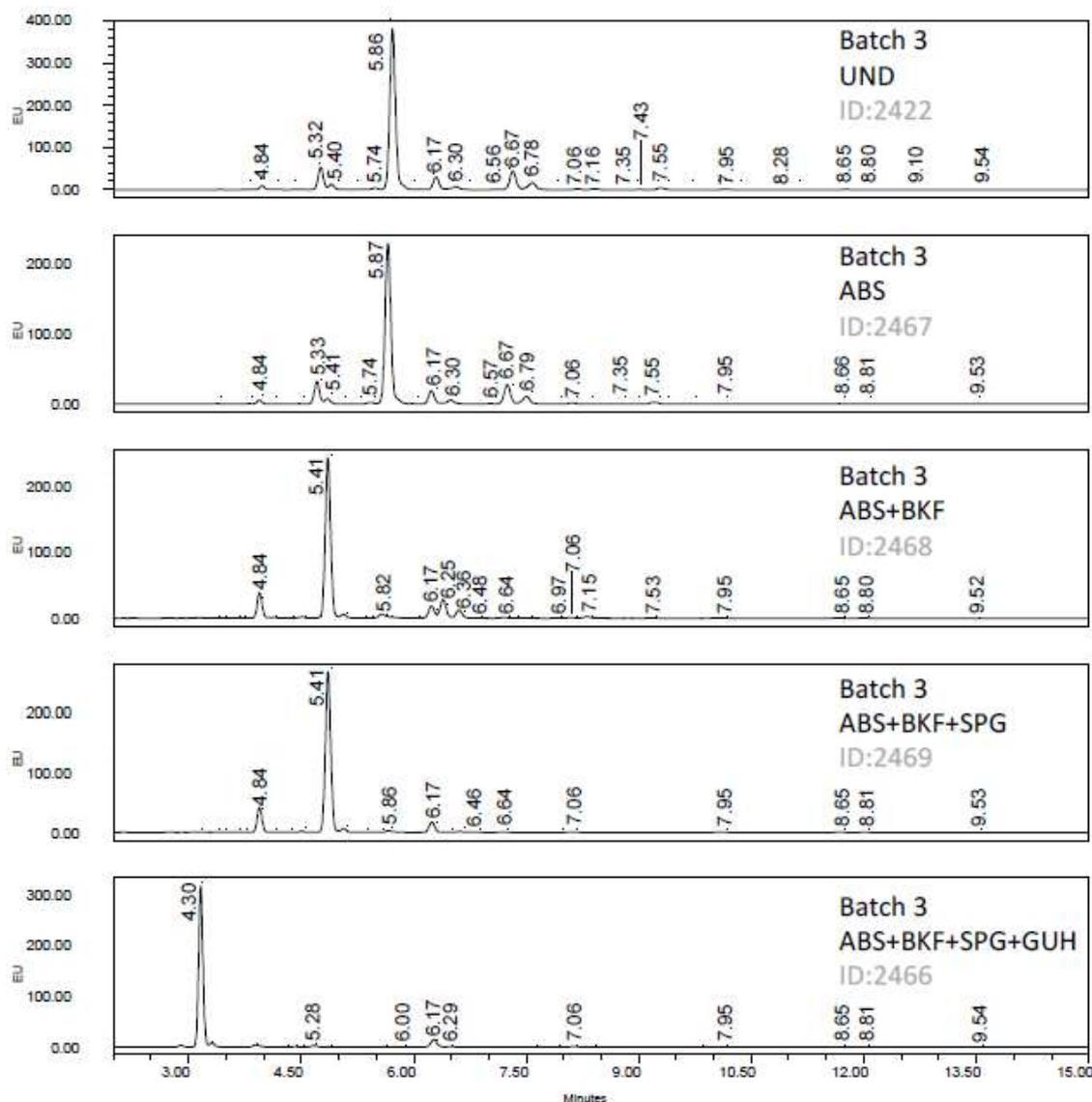


Figura 39. Cromatogramas de la técnica de separación por HILIC de la muestra de N-glicanos del lote 3 de Xolair®. El primer cromatograma corresponde a la muestra de N-glicanos sin digerir (UND) y luego (hacia abajo) los cromatogramas resultados de las digestiones con enzimas exoglicosidasas. ABS: *Athrobacter ureafaciens* sialidasa, BKF: α -fucosidasa de riñón bovino, SPG: β -Galacosidasa de *Streptococcus pneumonia*, GUH: Hexosaminidasa de *Streptococcus pneumonia*. En la **Figura 42** se muestran con más detalle los sitios específicos de corte de cada enzima usada.

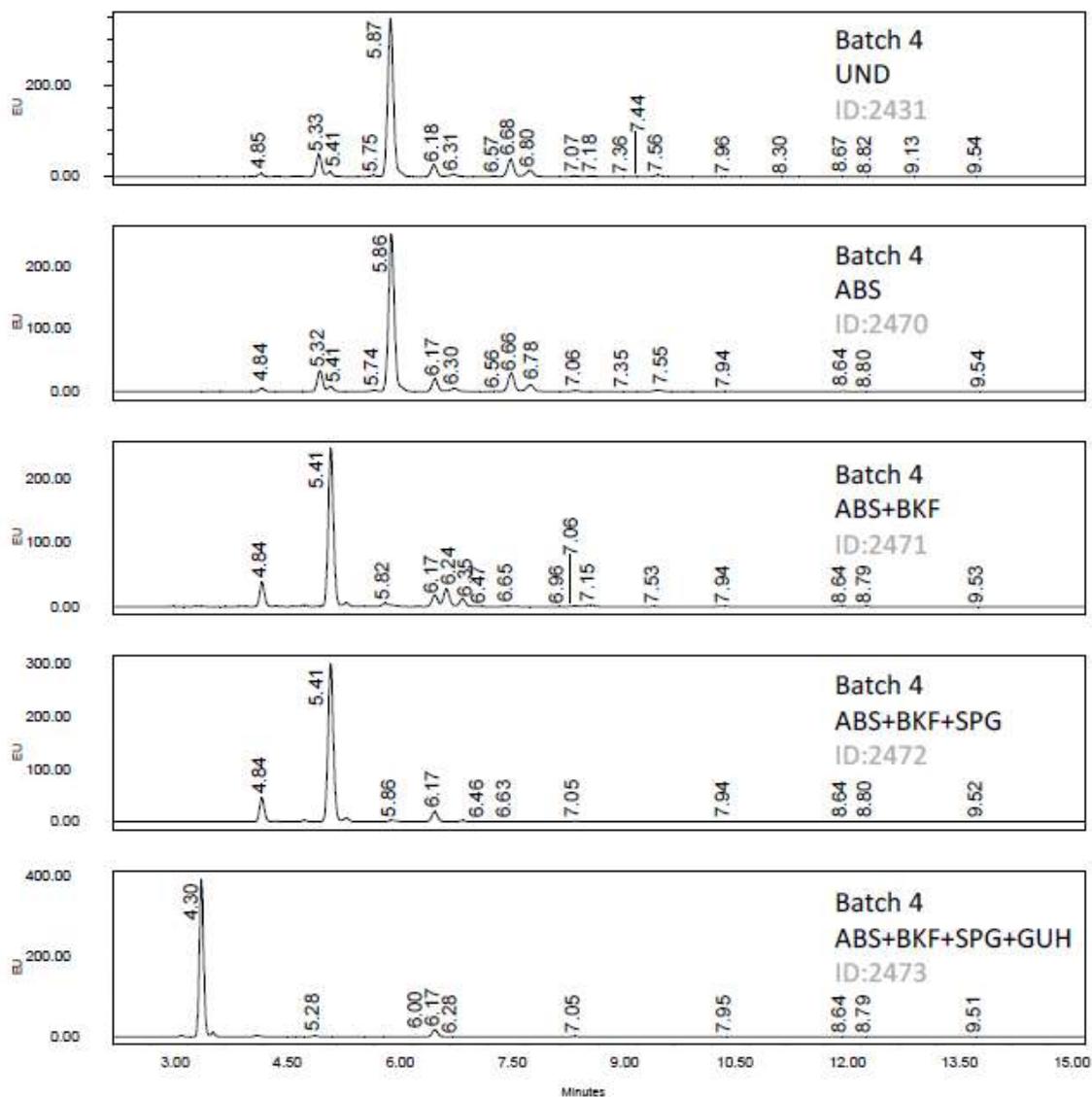


Figura 40. Cromatogramas de la técnica de separación por HILIC de la muestra de N-glicanos del lote 4 de Xolair®. El primer cromatograma corresponde a la muestra de N-glicanos sin digerir (UND) y luego (hacia abajo) los cromatogramas resultados de las digestiones con enzimas exoglicosidasas. ABS: *Athrobacter ureafaciens* sialidasa, BKF: α -fucosidasa de riñón bovino, SPG: β -Galactosidasa de *Streptococcus pneumonia*, GUH: Hexosaminidasa de *Streptococcus pneumonia*. En la **Figura 42** se muestran con más detalle los sitios específicos de corte de cada enzima usada.

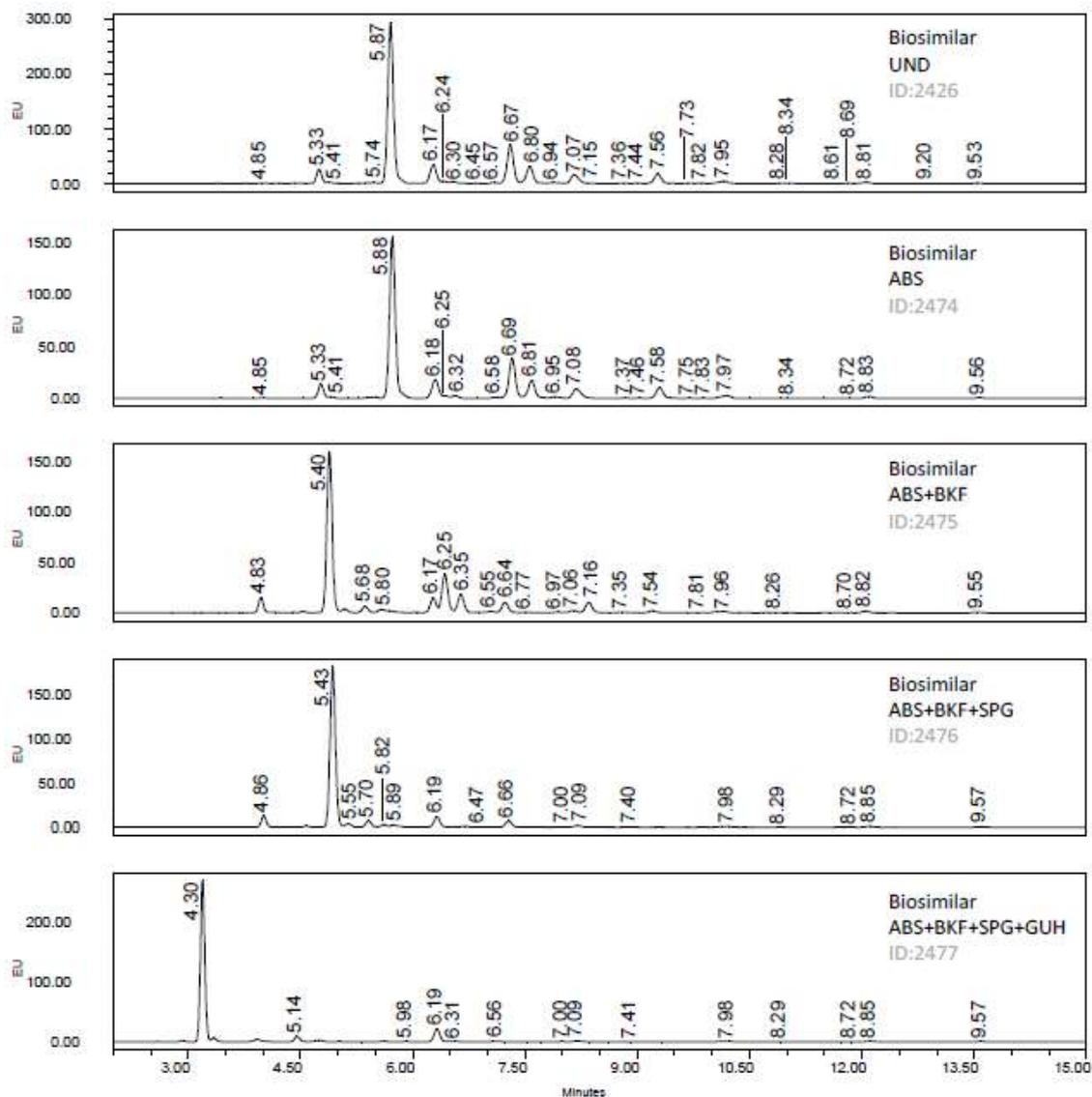


Figura 41. Cromatogramas de la técnica de separación por HILIC de la muestra de N-glicanos de la versión de omalizumab veOMA. El primer cromatograma corresponde a la muestra de N-glicanos sin digerir (UND) y luego (hacia abajo) los cromatogramas resultados de las digestiones con enzimas exoglicosidasas. ABS: *Athrobacter ureafaciens* sialidasa, BKF: α -fucosidasa de riñón bovino, SPG: β -Galacosidasa de *Streptococcus pneumonia*, GUH: Hexosaminidasa de *Streptococcus pneumonia*. En la **Figura 42** se muestran con más detalle los sitios específicos de corte de cada enzima usada.

b) Estructuras identificadas mediante digestión con exoglicosidasas**Tabla 58.** Tabla indicando las estructuras presentes en las digestiones en las muestras de Xolair®.

GU	UND	GU	ABS
4.85	A1*	5.85	F(6)A2*
5.33	F(6)A1*	6.16	M5* A3'
5.41	A2*	6.29	F(6)A1[3]G(4)1* y/o F(6)M4A1* A2G(4)1 M5
5.63	A1G(4)1 y/o M4A1	6.55	F(6)A3'*
5.74	A1G(4)1 y/o M4A1	6.66	F(6)A2[6]G(4)1* F(6)M5A1 y/o F(6)M4A1G(4)1
5.87	F(6)A2*	6.78	F(6)A2[3]G(4)1*
6.17	M5*	7.05	F(6)M5A1* y/o F(6)M4A1G(4)1* M6*
6.31	F(6)A1G(4)1* y/o F(6)M4A1* A2G(4)1≠	7.34	F(6)A3G(4)1*
6.57	F(6)A3'*	7.54	F(6)A2G(4)2* M5A1G(4)1
6.67	F(6)A2[6]G(4)1*	7.94	M7* F(6)M5A1G(4)1*
6.79	F(6)A2[3]G(4)1*	8.65	M8*
7.07	M6*	8.80	M8*
7.17	F(6)A1G(4)1S(3)1*	9.53	M9*
7.35	F(6)A3G(4)1*		
7.44	F(6)A2[6]G(4)1S(3)1*		
7.56	F(6)A2[3]G(4)1S(3)1* F(6)A2G(4)2*		
7.95	F(6)M4A1G(4)1S(3)1* F(6)M5A1G(4)1* M7*		
8.29	F(6)A2G(4)2S(3)1* M5A1G(4)1S(3)1≠		
8.66	M8* F(6)M5A1G(4)1S(3)1*		
8.81	M8*		
9.11	F(6)A2G(4)2S(3)2*		
9.54	M9*		

GU	ABS	GU	ABS + BKF
4.83	A1*	4.81	A1*
5.31	F(6)A1*	5.41	A2*
5.40	A2*	5.82	A1G(4)1 y/o M4A1 A3
5.73	A1G(4)1 y/o M4A1 A3	6.17	M5* A3'*
		6.24	A2[6]G(4)1* M5

GU	ABS + BKF
6.35	A2[3]G(4)1*
6.47	M5A1
6.65	M5A1* y/o M4A1G(4)1*
6.78	A3G(4)1
6.96	A3G(4)1
7.06	M6
7.15	A2G(4)2*
7.53	M5A1G(4)1*
7.94	M7*
8.64	M8*
8.79	M8*
9.53	M9

GU	ABS + BKF + SPG + GUH
4.29	M3*
5.27	M4
5.95	M5*
6.16	M5*
6.28	M5*
7.05	M6*
7.95	M7*
8.65	M8*
8.80	M8*
9.53	M9

GU	ABS + BKF + SPG
4.83	A1*
5.40	A1*
5.85	M4A1 A3
6.16	M5* A3*
6.27	M5
6.45	M5A1
6.63	M5A1*
7.05	M6*
7.94	M7*
8.64	M8*
8.80	M8*
9.53	M9

Todas las estructuras se asignaron en base a las digestiones con las enzimas exoglicosidasas y los cambios de valores de GU de los picos.

*Detectado mediante HILIC-FLD-MS para los cuatro lotes.

Tabla 59. Tabla indicando las estructuras presentes en las digestiones en la muestra de veOMA.

GU	UND	GU	UND
4.85	A1*	7.73	F(6)M4A1F(3)1G(4)1*
5.33	F(6)A1*	7.82	F(6)M5A1G(4)1*
5.41	A2*	7.95	F(6)M4A1G(4)1S(3)1* F(6)M5A1G(4)1* M7* A2F(3)1G(4)1S(3)1*#
5.63	A1G(4)1 y/o M4A1	8.28	F(6)A2G(4)2S(3)1* F(6)A2F(3)1G(4)2*
5.74	A1G(4)1 y/o M4A1	8.34	M4A1F(3)1G(4)1S(3)1*#
5.87	F(6)A2*	8.61	F(6)M5A1F(3)1G(4)1*
6.17	M5*	8.69	M8* F(6)M5A1G(4)1S(3)1* A2F(3)1G(4)2S(3)1*#
6.24	F(6)A1G(4)1* y/o F(6)M4A1*	8.81	M8*
6.30	F(6)A1G(4)1* y/o F(6)M4A1* F(6)A3*	9.19	F(6)A2G(4)2S(3)2* F(6)A2F(3)1G(4)2S(3)1* M5A1F(3)1G(4)1S(3)1*#
6.46	M5A1* y/o M4A1G(4)1*	9.54	M9* A2F(3)1G(4)2S(3)2*#
6.57	F(6)A3*		
6.67	F(6)A2[6]G(4)1* M5A1* y/o M4A1G(4)1*		
6.79	F(6)A2[3]G(4)1*		
6.94	F(6)M5A1* y/o F(6)M4A1G(4)1*		
	F(6)A3G(4)1*		
7.07	M6* F(6)M5A1* y/o F(6)M4A1G(4)1* F(6)A3G(4)1* F(6)A1G(4)1S(3)1*		
7.36	F(6)A3G(4)1*		
7.44	F(6)A2[6]G(4)1S(3)1* F(6)A3G(4)1* F(6)A2F(3)1G(4)1*		
7.56	F(6)A2[3]G(4)1S(3)1* F(6)A2G(4)2* M5A1G(4)1*		

GU	ABS
4.85	A1
5.33	F(6)A1*
5.41	A2
5.75	A1G(4)1 y/o M4A1
5.88	F(6)A2*
6.18	M5*
6.25	F(6)A1[3]G(4)1* y/o F(6)M4A1*
6.32	F(6)A1[3]G(4)1* y/o F(6)M4A1* F(6)A3*
6.58	F(6)A3*
6.69	F(6)A2[6]G(4)1* F(6)M5A1 y/o F(6)M4A1G(4)1

GU	ABS
6.81	F(6)A2[3]G(4)1*
6.95	F(6)M5A1* y/o F(6)M4A1G(4)1* F(6)A3G(4)1*
7.08	F(6)M5A1* y/o F(6)M4A1G(4)1* M6* F(6)A3G(4)1*
7.37	F(6)A3G(4)1*
7.46	F(6)A3G(4)1* F(6)A2F(3)1G(4)1*
7.58	F(6)A2G(4)2*
7.75	F(6)M4A1F(3)1G(4)1*
7.83	F(6)M5A1G(4)1*
7.97	M7* F(6)M5A1G(4)1*
8.34	F(6)A2F(3)1G(4)2*
8.72	M8* F(6)M5A1F(3)1G(4)1*
8.83	M8*
9.56	M9*

GU	ABS + BKF
4.83	A1*
5.40	A2*
5.68	A1G(4)1 y/o M4A1
5.80	A1G(4)1 y/o M4A1 A3
6.17	M5* A3*
6.25	A2[6]G(4)1*
6.35	A2[3]G(4)1*
6.55	M5A1* y/o M4A1G(4)1*

GU	ABS + BKF
6.64	M5A1* y/o M4A1G(4)1*
6.77	A3G(4)1*
6.97	A3G(4)1* A2F(3)1G(4)1*
7.06	M6*
7.16	A2G(4)2*
7.35	M5A1G(4)1* M4A1F(3)1G(4)1*
7.54	M5A1G(4)1*
7.81	A2F(3)1G(4)2*
7.96	M7*
8.26	M5A1F(3)1G(4)1*
8.70	M8*
8.82	M8*
9.55	M9

GU	ABS + BKF + SPG
4.86	A1*
5.43	A2*
5.70	M4A1
5.82	A3*
5.89	M4A1
6.19	M5* A3*
6.31	M5
6.47	M5A1*
6.66	M5A1*
7.00	A2F(3)1G(4)1* M6
7.09	M6*
7.40	M4A1F(3)1G(4)1*
7.98	M7*
8.29	M5A1F(3)1G(4)1*
8.72	M8*
8.85	M8*
9.57	M9*

GU	ABS + BKF + SPG + GUH
4.30	M3*
5.14	M4*
5.32	M4*
5.98	M5*
6.19	M5*
6.31	M5*
6.56	A1F(3)1G(4)1*
7.00	M6
7.09	M6*
7.41	M4A1F(3)1G(4)1*
7.98	M7*
8.29	M5A1F(3)1G(4)1*
8.72	M8*
8.85	M8*
9.57	M9

Todas las estructuras se asignaron en base a las digestiones con las enzimas exoglicosidasas y los cambios de valores de GU de los picos.

* Detectado mediante HILIC-FLD-MS para los cuatro lotes.

El producto no se podía detectar en la muestra digerida con ABS.

c) Especificidad de las enzimas exoglicosidasas

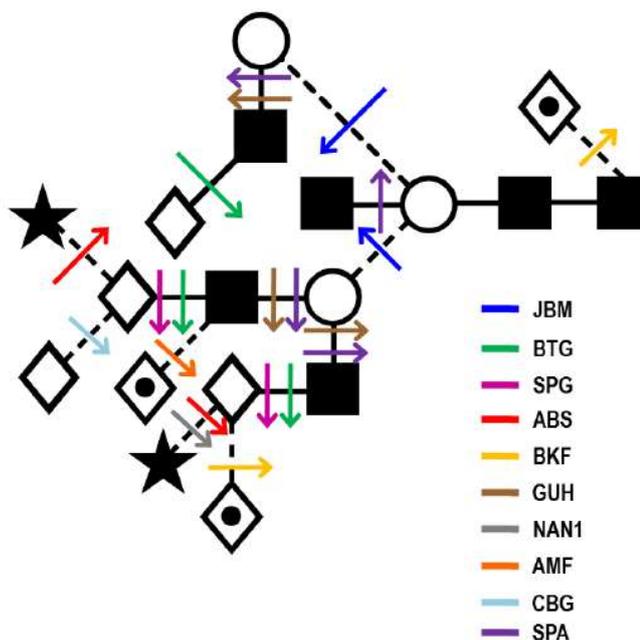


Figura 42. Sitio de corte específico de las enzimas glicosidasas.

Tabla 60. Tabla con el nombre y la actividad de las enzimas utilizadas en la caracterización del patrón de glicosilación.

Enzima	Nombre completo y actividad
JBM	Jack Bean Mannosidase Libera residuos de manosas con enlace $\alpha(1-2)$ y $\alpha(1-6)$ de forma más eficiente que $\alpha(1-3)$
BTG	Bovine testis β-Galactosidase Hidroliza enlaces terminales no-reducidos $\beta(1-3)$ y $\beta(1-4)$ de galactosas
SPG	Streptococcus pneumonia β-Galactosidase Hidroliza residuos de galactosa unidos mediante enlaces $\beta(1-4)$ terminales no reducidos
ABS	Athrobacter ureafaciens Sialidase Libera enlaces terminales no reducidos $\alpha(2-3,6)$ y $\alpha(2-8)$ de ácidos siálicos (NeuNAc y NeuNGc)
BKF	Bovine Kidney α-Fucosidase Libera enlaces terminales no reducidos $\alpha(1-2)$ y $\alpha(1-6)$ de residuos de fucosas de forma más eficiente que enlaces $\alpha(1-3)$ y $\alpha(1-4)$ de fucosas. Se usa para liberar residuos de fucosas del núcleo de los glicanos.
GUH	Streptococcus pneumonia Hexosaminidase Libera GlcNAc unidos mediante enlaces β pero no corta GlcNAc unidas a Man por enlace $\beta(1-4)$
NAN1	Recombinant Sialidase Libera ácidos siálicos (NeuNAc y NeuNGc) no reducidos terminales unidos mediante enlace $\alpha(2-3)$
AMF	Almond Meal α-Fucosidase Libera residuos de fucosa no reducidos terminales mediante enlace $\alpha(1-3)$ y $\alpha(1-4)$. Pero no libera fucosas del núcleo unidas mediante enlaces $\alpha(1-3)$ y $\alpha(1-6)$.
CBG	Coffee Bean α-Galactosidase Hidroliza residuos de galactosa terminales unidos mediante enlaces $\alpha(1-3)$ y $\alpha(1-4)$
SPA	Streptococcus pneumonia β-N-Acetylglucosaminidase S Hidroliza residuos terminales no reducidos de β -N-Acetilglucosamina de oligosacáridos incluyendo residuos GlcNAc unidos mediante enlace β y residuos biseccionados $\beta(1-4)$

8.1.3. Anexo 1.3. Estudio de unión de los ácidos siálicos

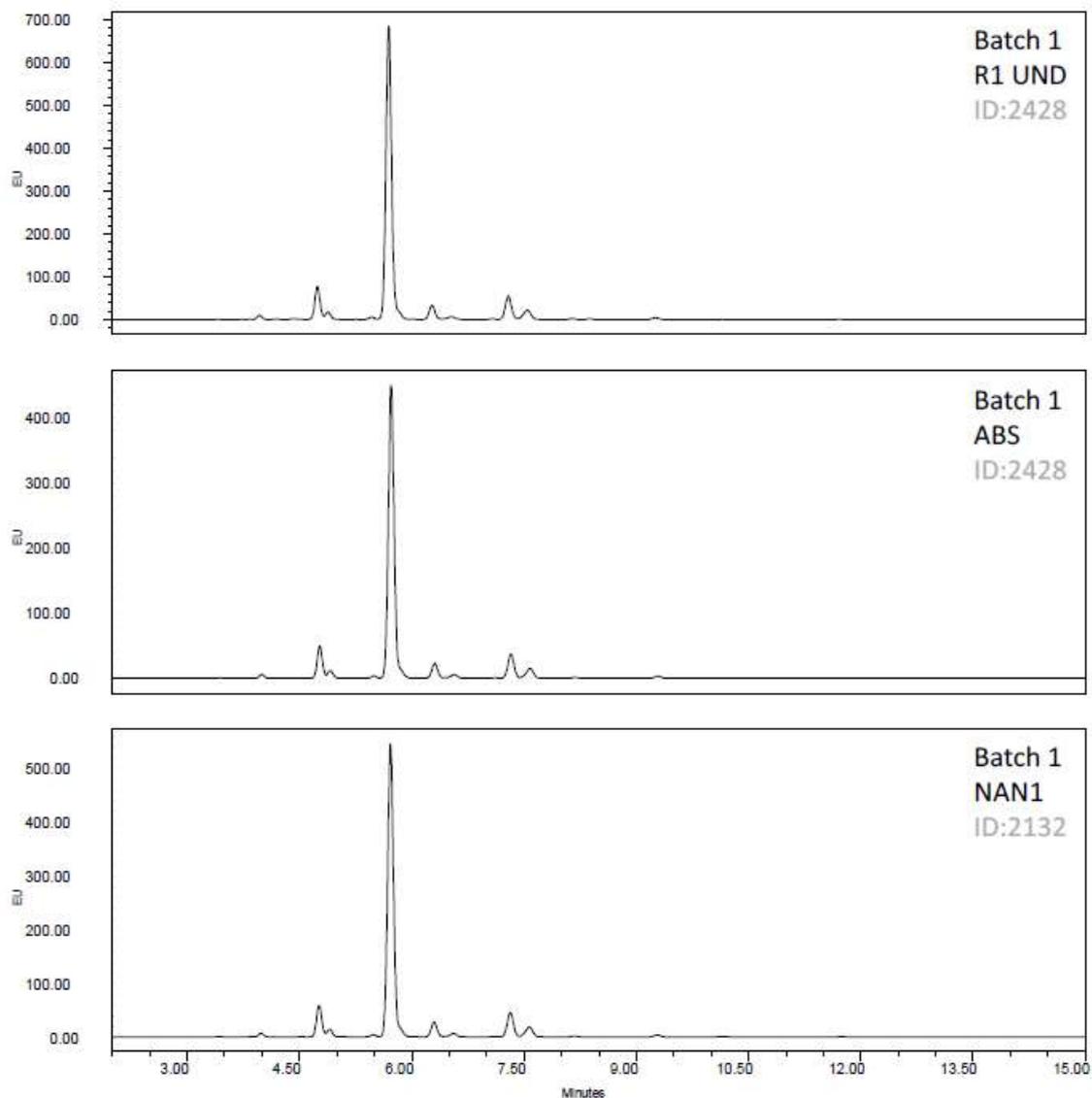


Figura 43. Cromatogramas obtenidos al separar por HILIC los N-glicanos no digeridos (UND) del lote 1 de Xolair® antes y después de ser digeridos con NAN1 y ABS. ABS: Sialidasa de *Athrobacter ureafaciens*, NAN1: Sialidasa recombinante NAN1.

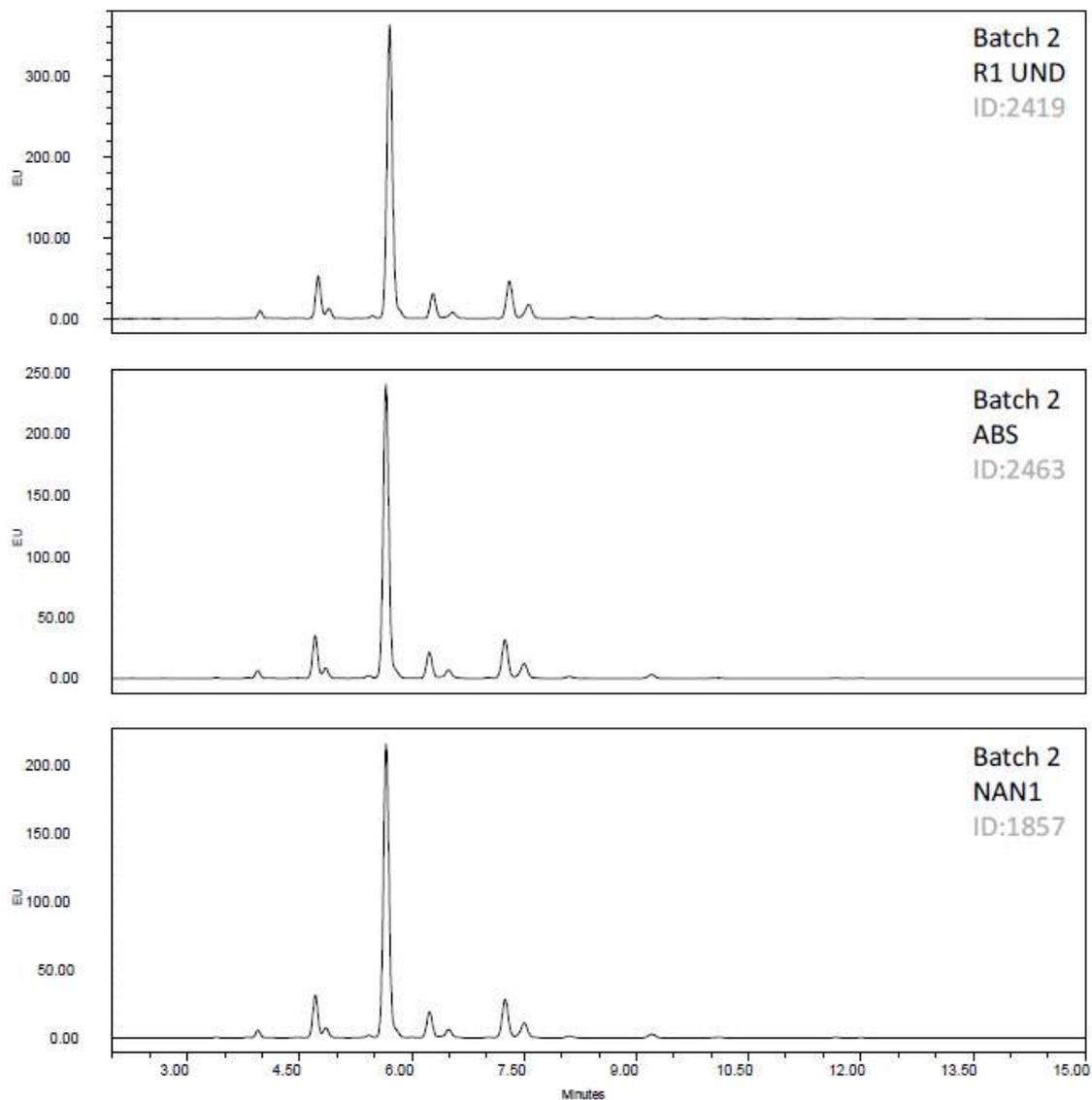


Figura 44. Cromatogramas obtenidos al separar por HILIC los N-glicanos no digeridos (UND) del lote 2 de Xolair® antes y después de ser digeridos con NAN₁ y ABS. ABS: Sialidasa de *Athrobacter ureafaciens*, NAN₁: Sialidasa recombinante NAN₁.

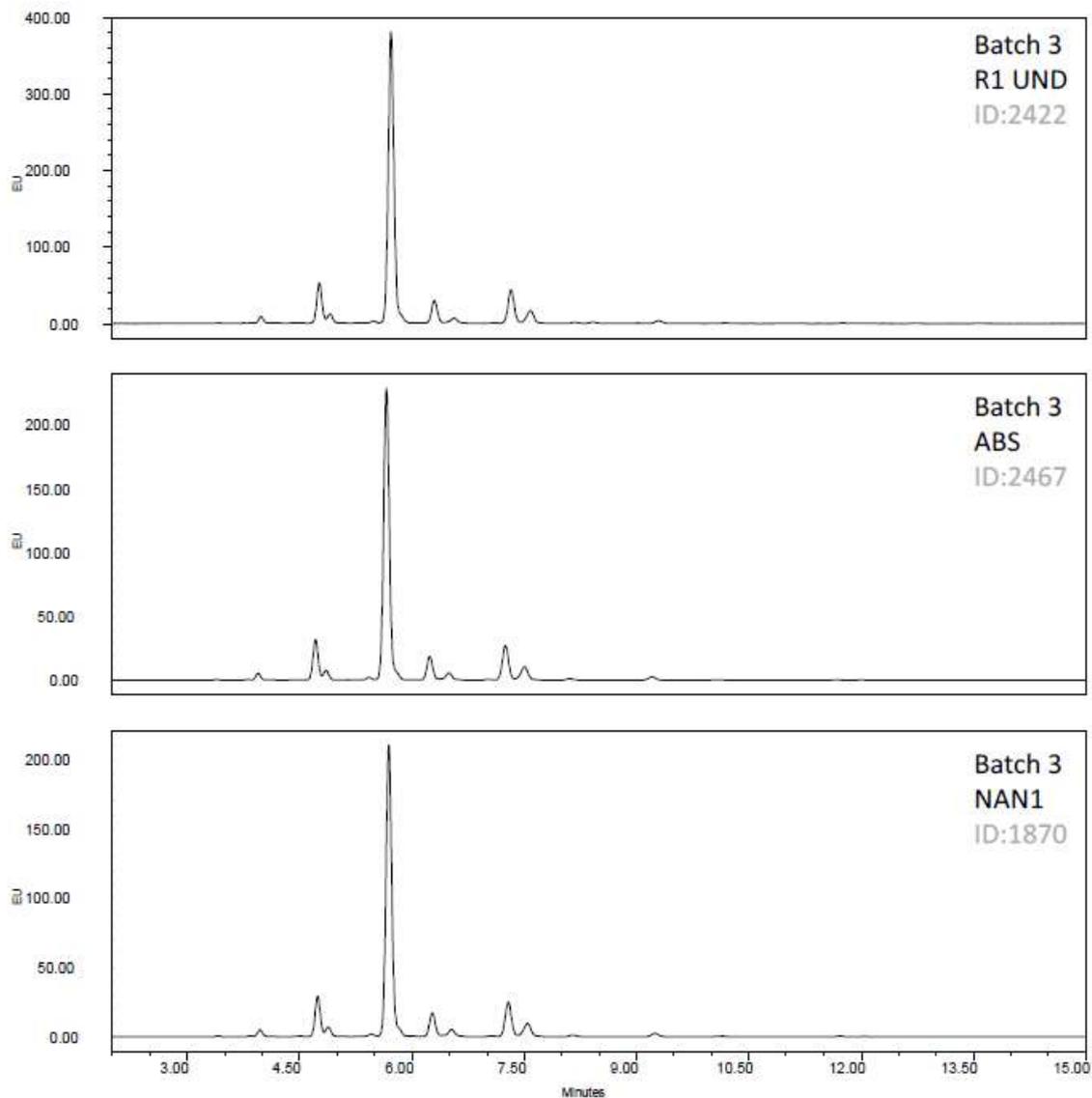


Figura 45. Cromatogramas obtenidos al separar por HILIC los N-glicanos no digeridos (UND) del lote 3 de Xolair® antes y después de ser digeridos con NAN1 y ABS. ABS: Sialidasa de *Athrobacter ureafaciens*, NAN1: Sialidasa recombinante NAN1.

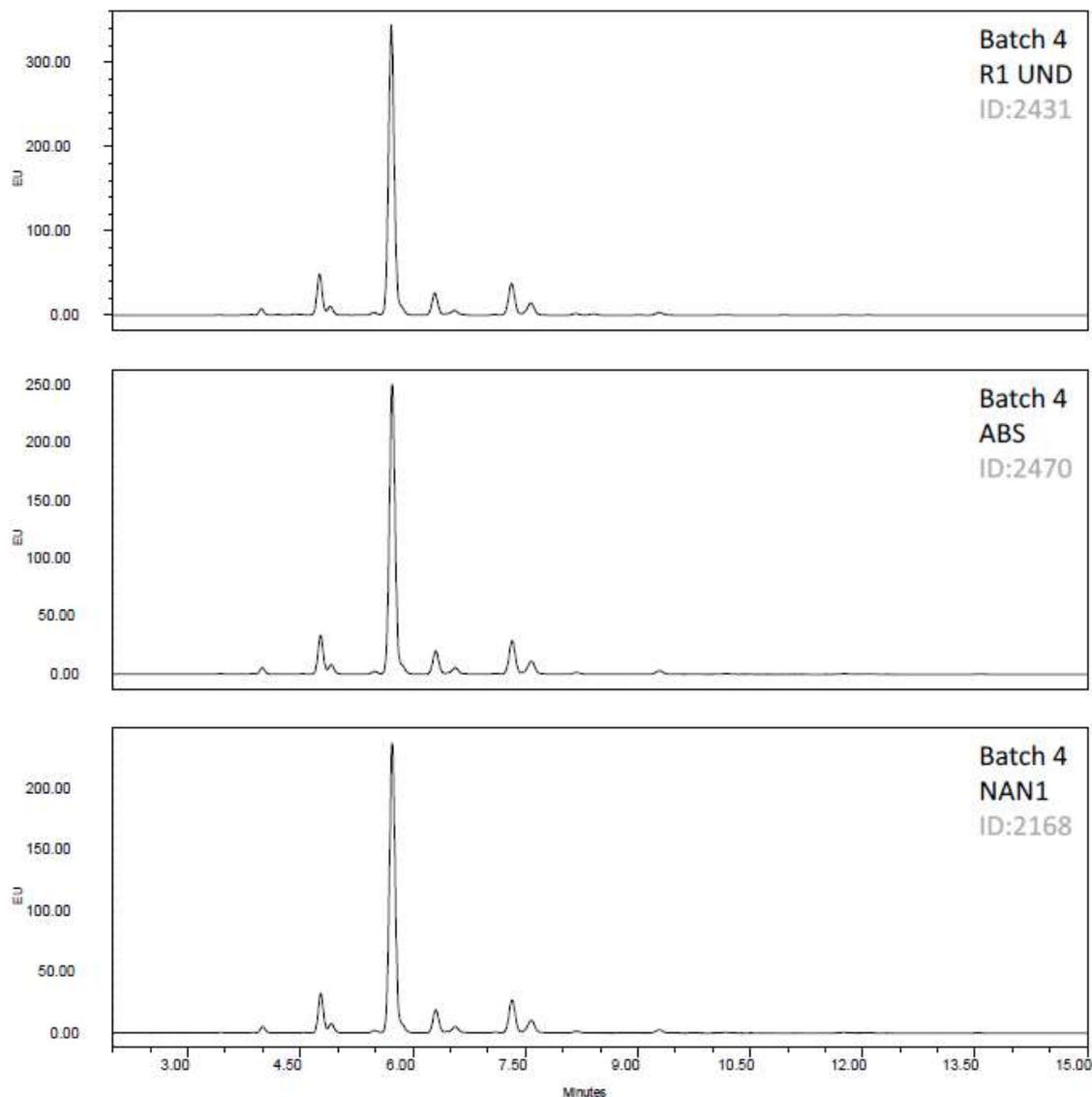


Figura 46. Cromatogramas obtenidos al separar por HILIC los N-glicanos no digeridos (UND) del lote 4 de Xolair® antes y después de ser digeridos con NAN1 y ABS. ABS: Sialidasa de *Athrobacter ureafaciens*, NAN1: Sialidasa recombinante NAN1.

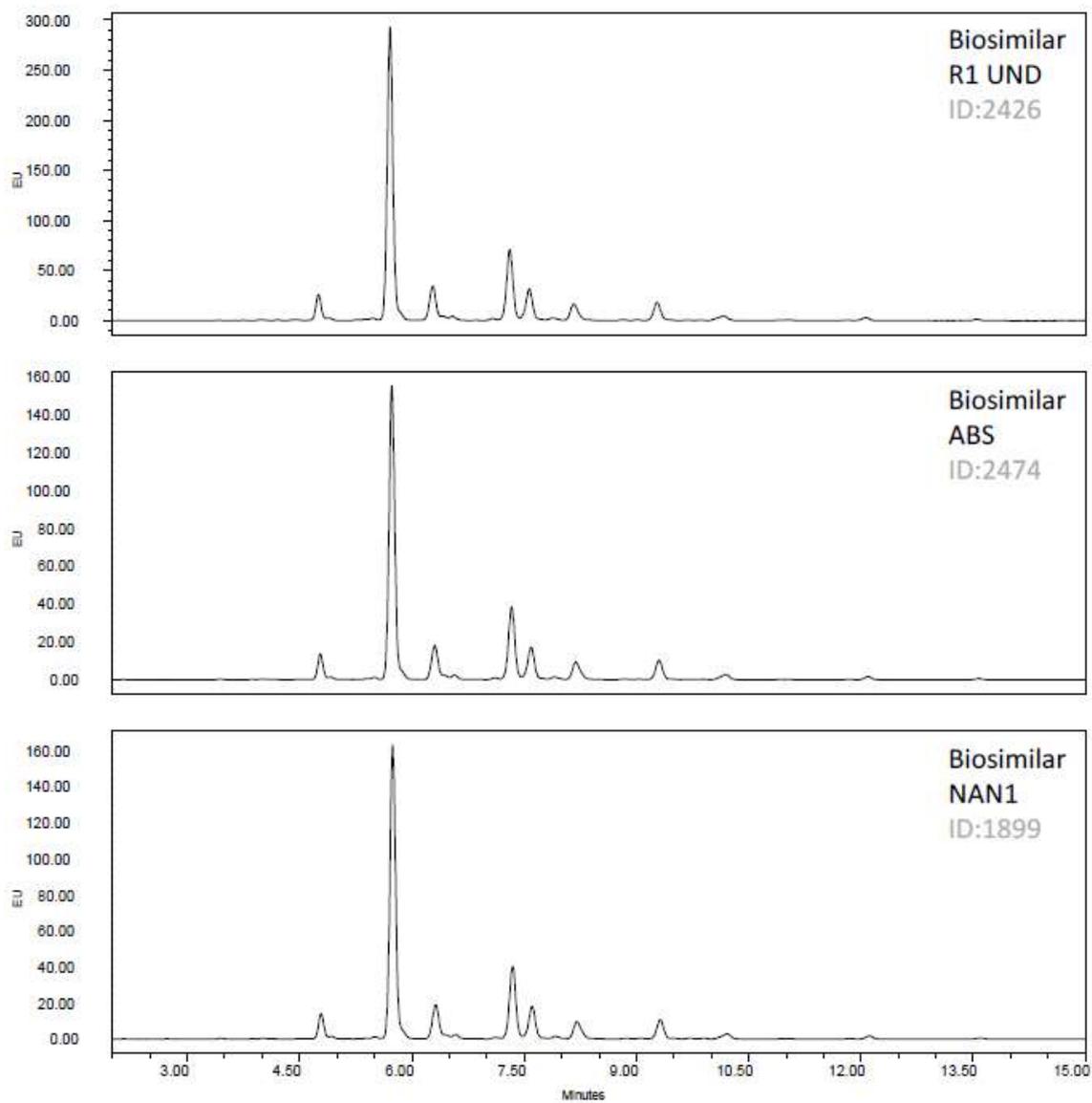


Figura 47. Cromatogramas obtenidos al separar por HILIC los N-glicanos no digeridos (UND) de la versión veOMA de omalizumab antes y después de ser digeridos con NAN1 y ABS. ABS: Sialidasa de *Athrobacter ureafaciens*, NAN1: Sialidasa recombinante NAN1.

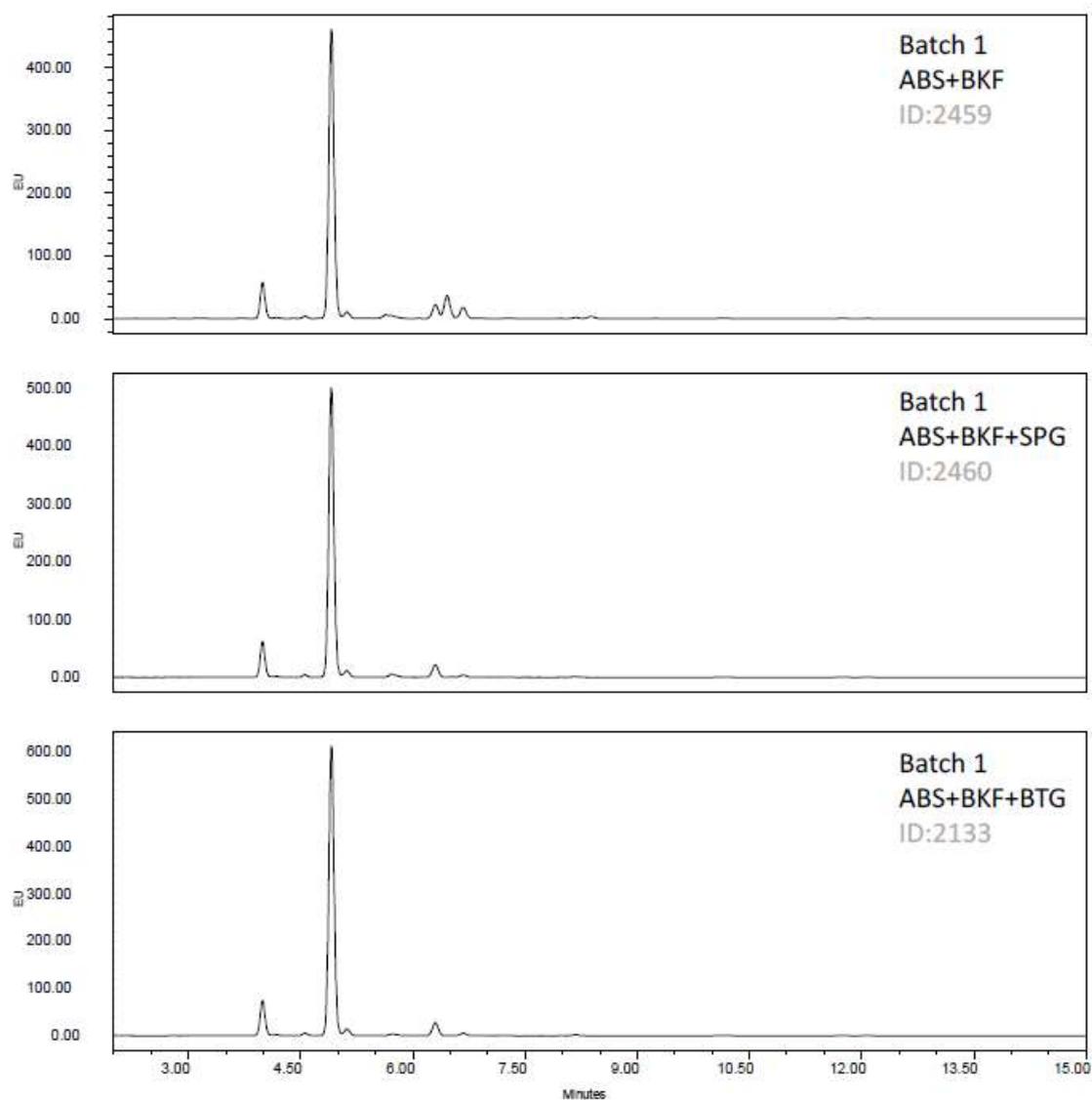
8.1.4. Anexo 1.4. Estudio de unión de la β -galactosa

Figura 48. Cromatogramas obtenidos al separar por HILIC los N-glicanos no digeridos (UND) del lote 1 de Xolair® antes y después de ser digeridos con ABS + BKF, ABS+BKF+SPG y ABS+BKF+BTG. ABS: Sialidasa de *Athrobacter ureafaciens*, BKF: α -Fucosidasa de riñón bovino, BTG: β -Galactosidasa de testículo bovino, SPG: β -Galactosidasa de *Streptococcus pneumoniae*.

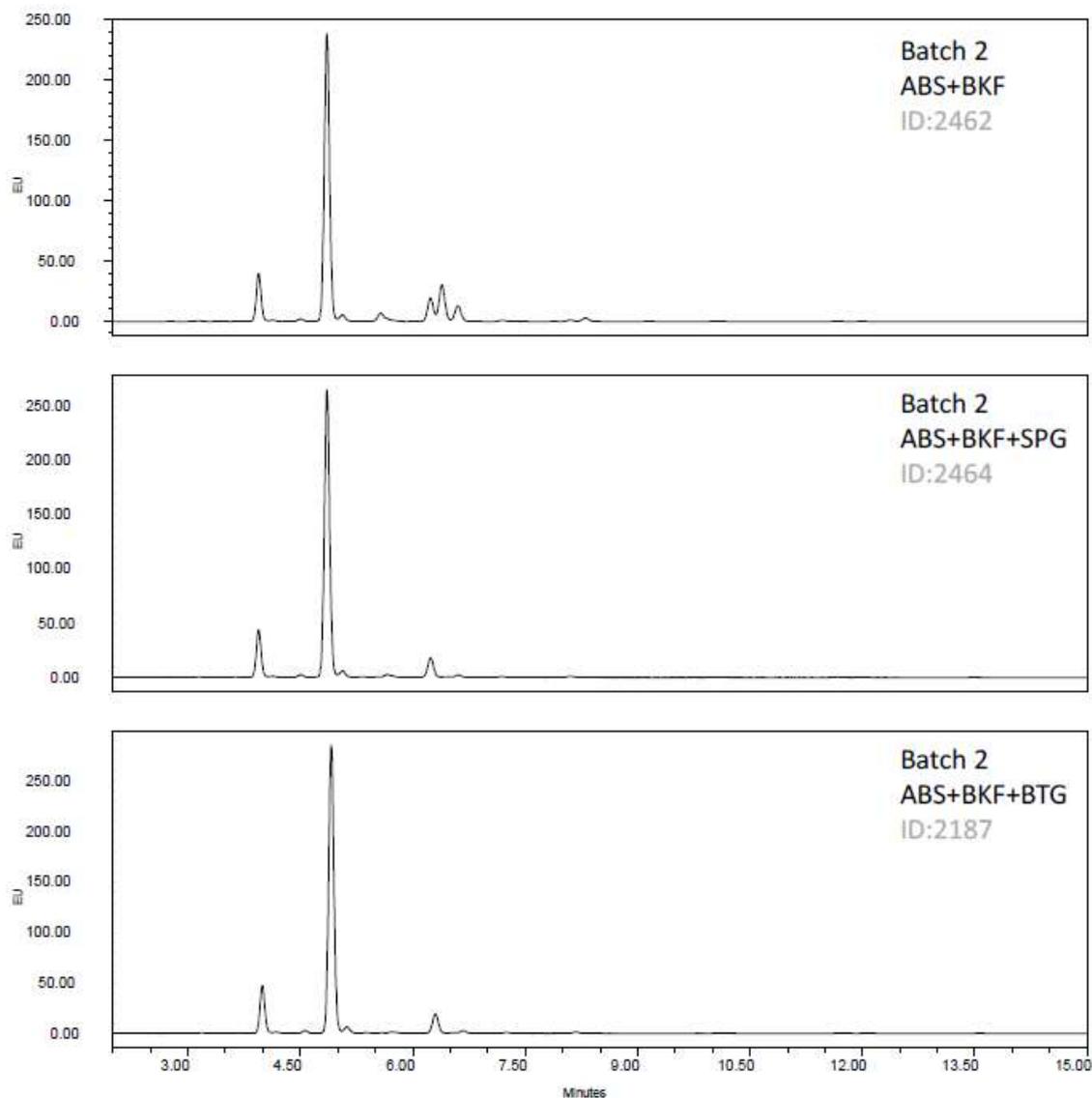


Figura 49. Cromatogramas obtenidos al separar por HILIC los N-glicanos no digeridos (UND) del lote 2 de Xolair® antes y después de ser digeridos con ABS + BKF, ABS+BKF+SPG y ABS+BKF+BTG. ABS: Sialidasa de *Athrobacter ureafaciens*, BKF: α -Fucosidasa de riñón bovino, BTG: β -Galactosidasa de testículo bovino, SPG: β -Galactosidasa de *Streptococcus pneumoniae*.

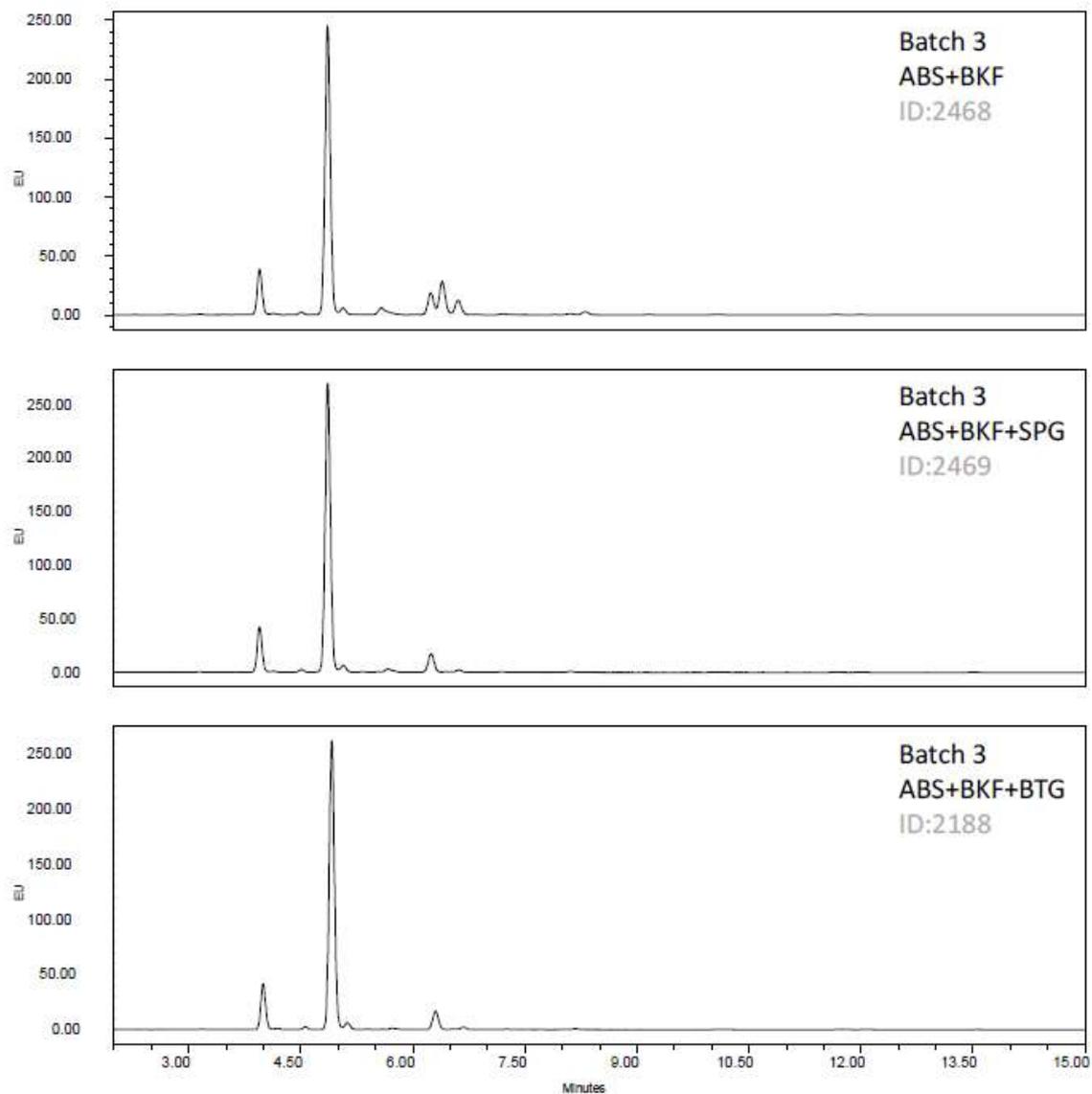


Figura 50. Cromatogramas obtenidos al separar por HILIC los N-glicanos no digeridos (UND) del lote 3 de Xolair® antes y después de ser digeridos con ABS + BKF, ABS+BKF+SPG y ABS+BKF+BTG. ABS: Sialidasa de *Athrobacter ureafaciens*, BKF: α -Fucosidasa de riñón bovino, BTG: β -Galactosidasa de testículo bovino, SPG: β -Galactosidasa de *Streptococcus pneumoniae*.

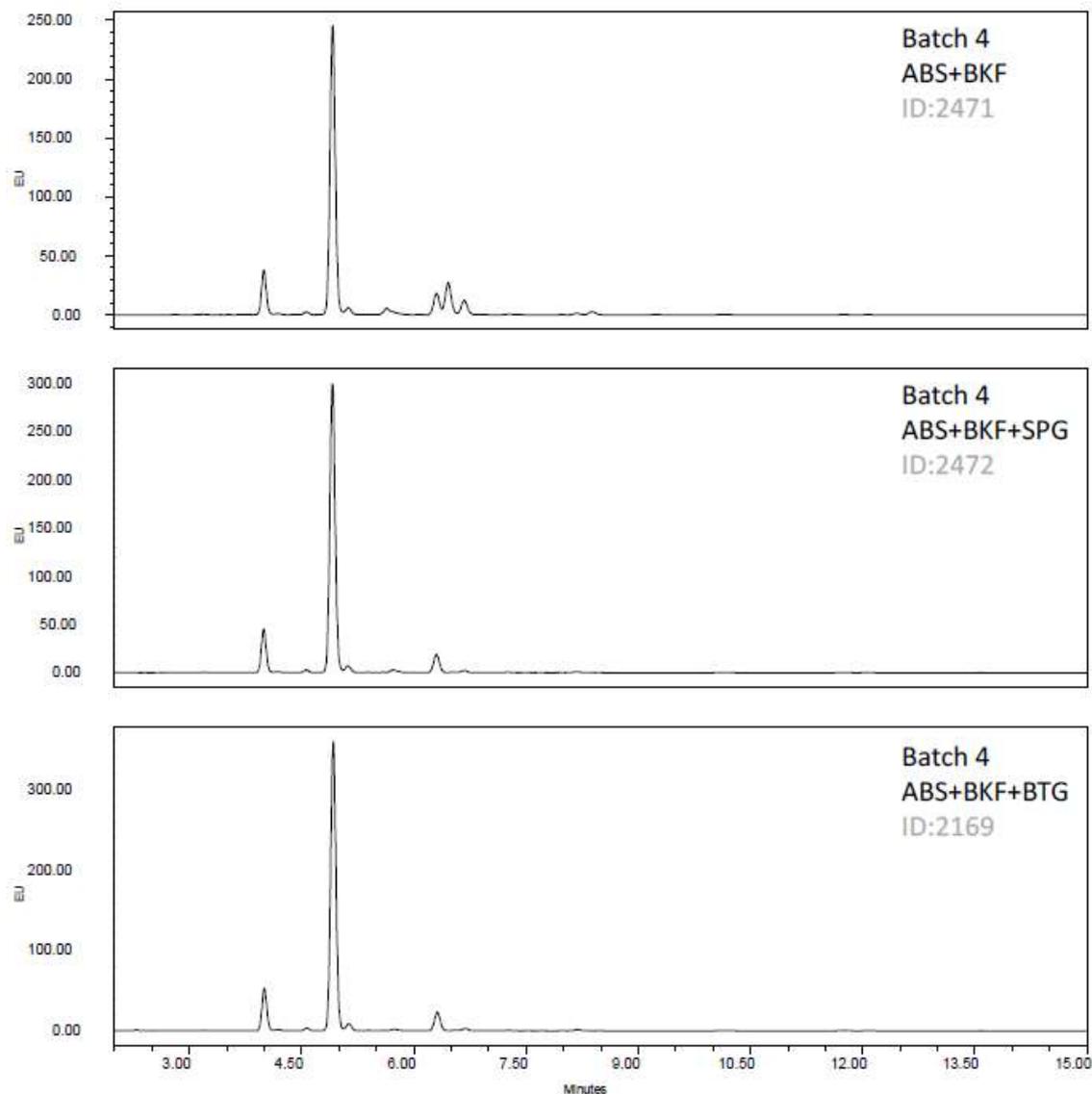


Figura 51. Cromatogramas obtenidos al separar por HILIC los N-glicanos no digeridos (UND) del lote 4 de Xolair® antes y después de ser digeridos con ABS + BKF, ABS+BKF+SPG y ABS+BKF+BTG. ABS: Sialidasa de *Athrobacter ureafaciens*, BKF: α -Fucosidasa de riñón bovino, BTG: β -Galactosidasa de testículo bovino, SPG: β -Galactosidasa de *Streptococcus pneumoniae*.

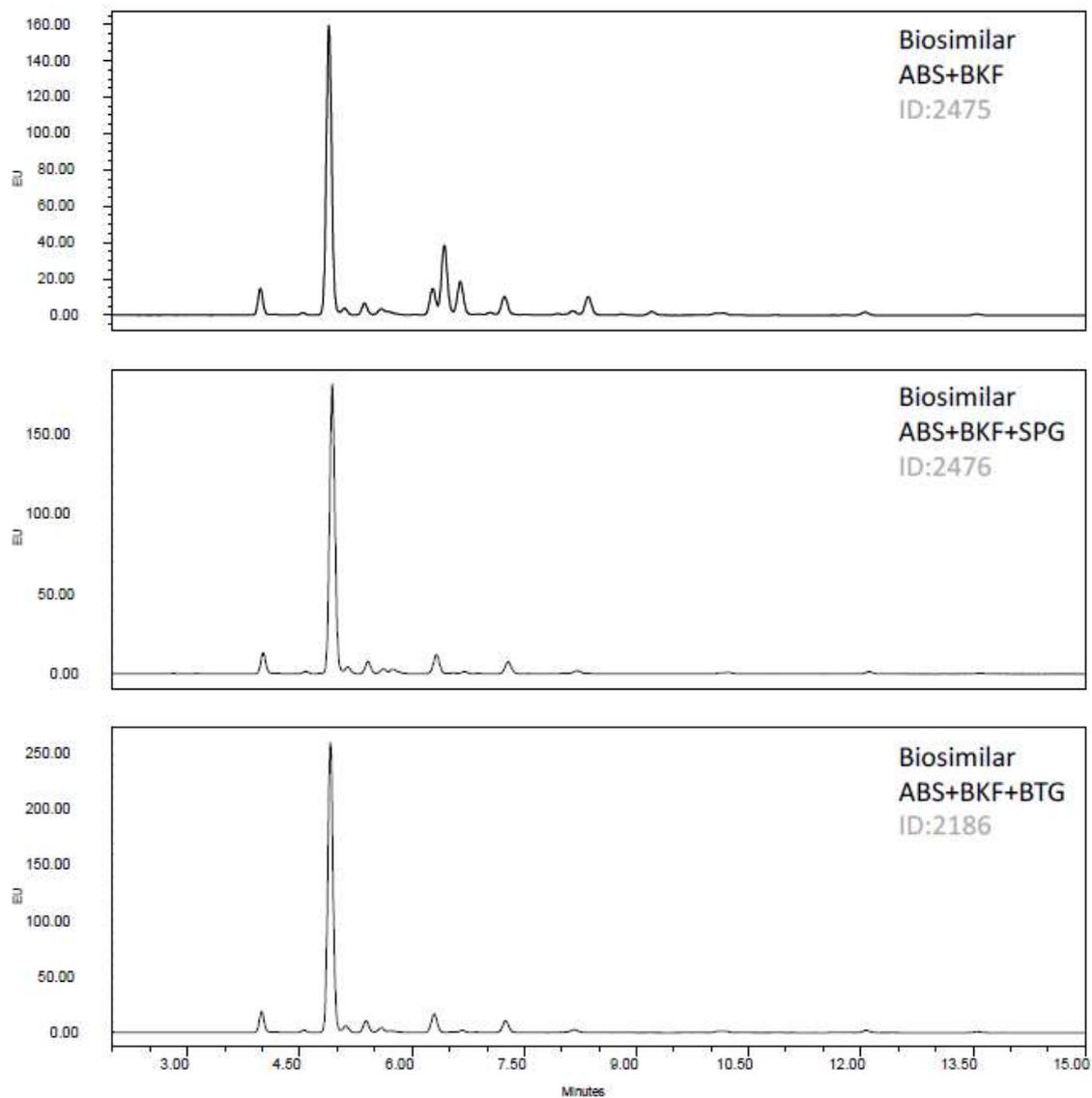


Figura 52. Cromatogramas obtenidos al separar por HILIC los N-glicanos no digeridos (UND) de la versión veOMA de omalizumab antes y después de ser digeridos con ABS + BKF, ABS+BKF+SPG y ABS+BKF+BTG. ABS: Sialidasa de *Athrobacter ureafaciens*, BKF: α -Fucosidasa de riñón bovino, BTG: β -Galactosidasa de testículo bovino, SPG: β -Galactosidasa de *Streptococcus pneumoniae*.

8.1.5. Anexo 1.5. Análisis de la fucosilación de los brazos exteriores

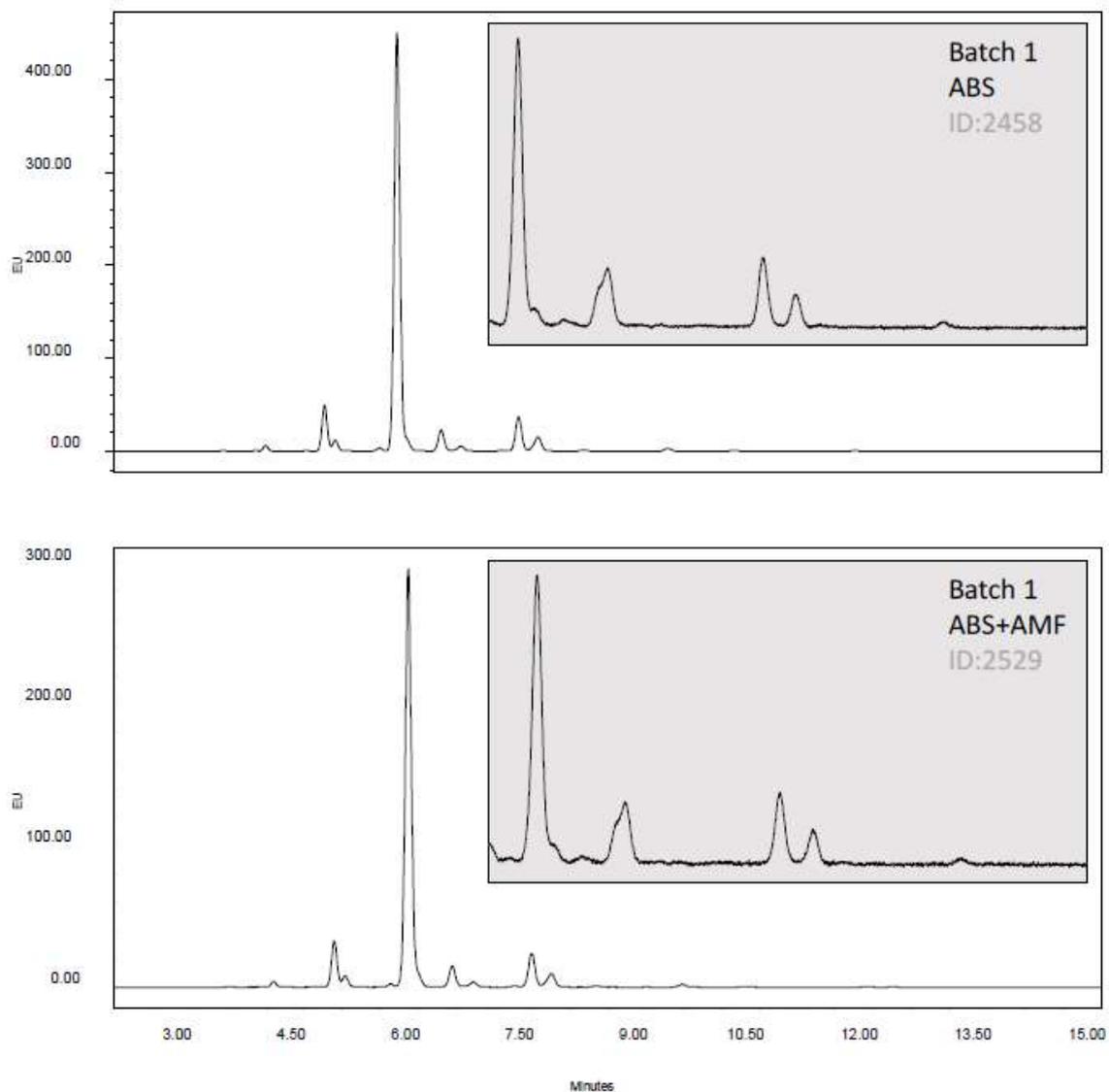


Figura 53. Cromatogramas HILIC de los N-glicanos del lote 1 de Xolair® antes y después de ser digeridos con ABS y ABS+AMF. Se añade una imagen ampliando del minuto 9 al 15. ABS (*Sialidasa de Athrobacter ureafaciens*), AMF (α -Fucosidasa de harina de almendra).

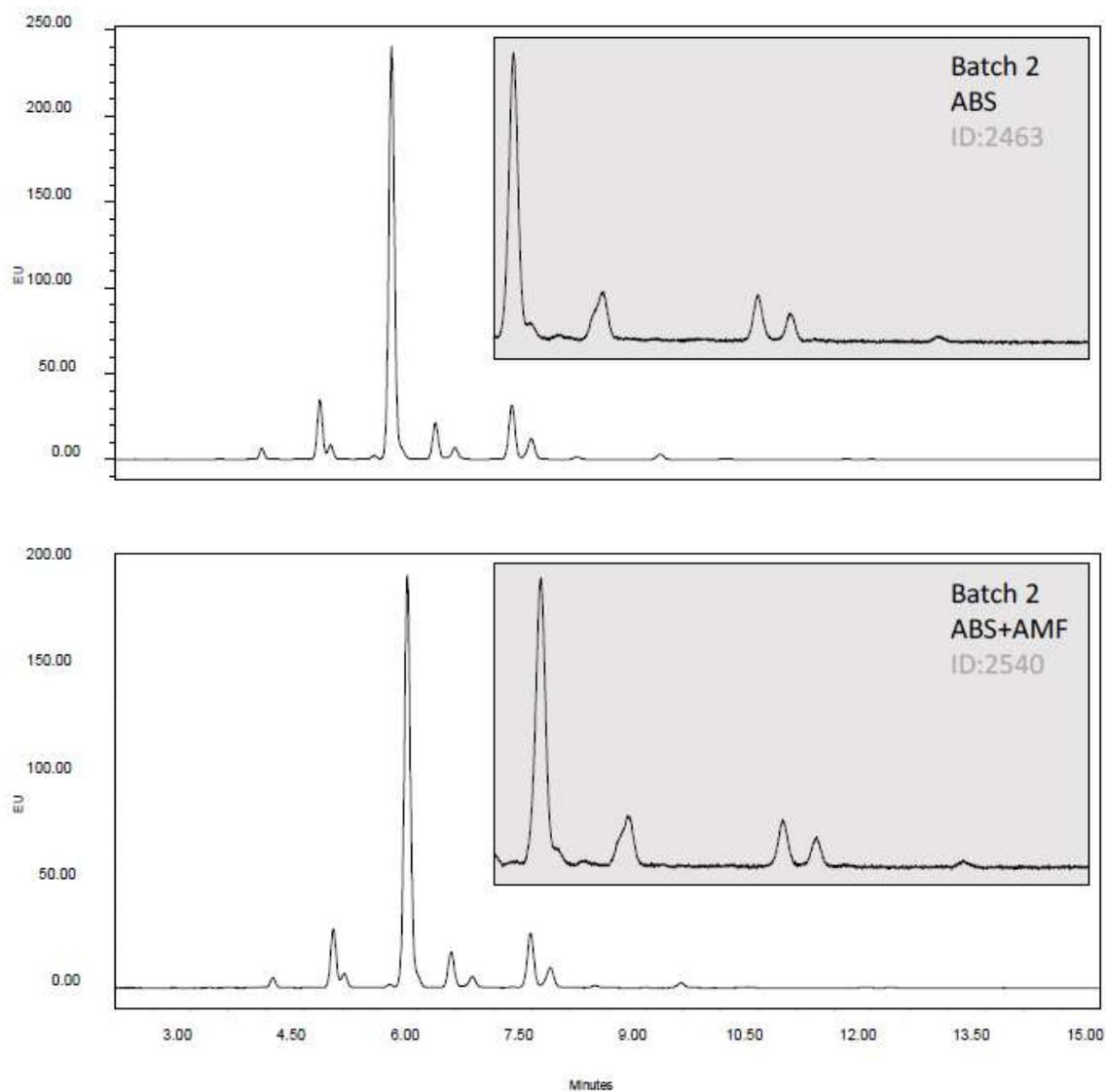


Figura 54. Cromatogramas HILIC de los N-glicanos del lote 2 de Xolair® antes y después de ser digeridos con ABS y ABS+AMF. Se añade una imagen ampliando del minuto 9 al 15. ABS (Sialidasa de *Athrobacter ureafaciens*), AMF (α -Fucosidasa de harina de almendra).

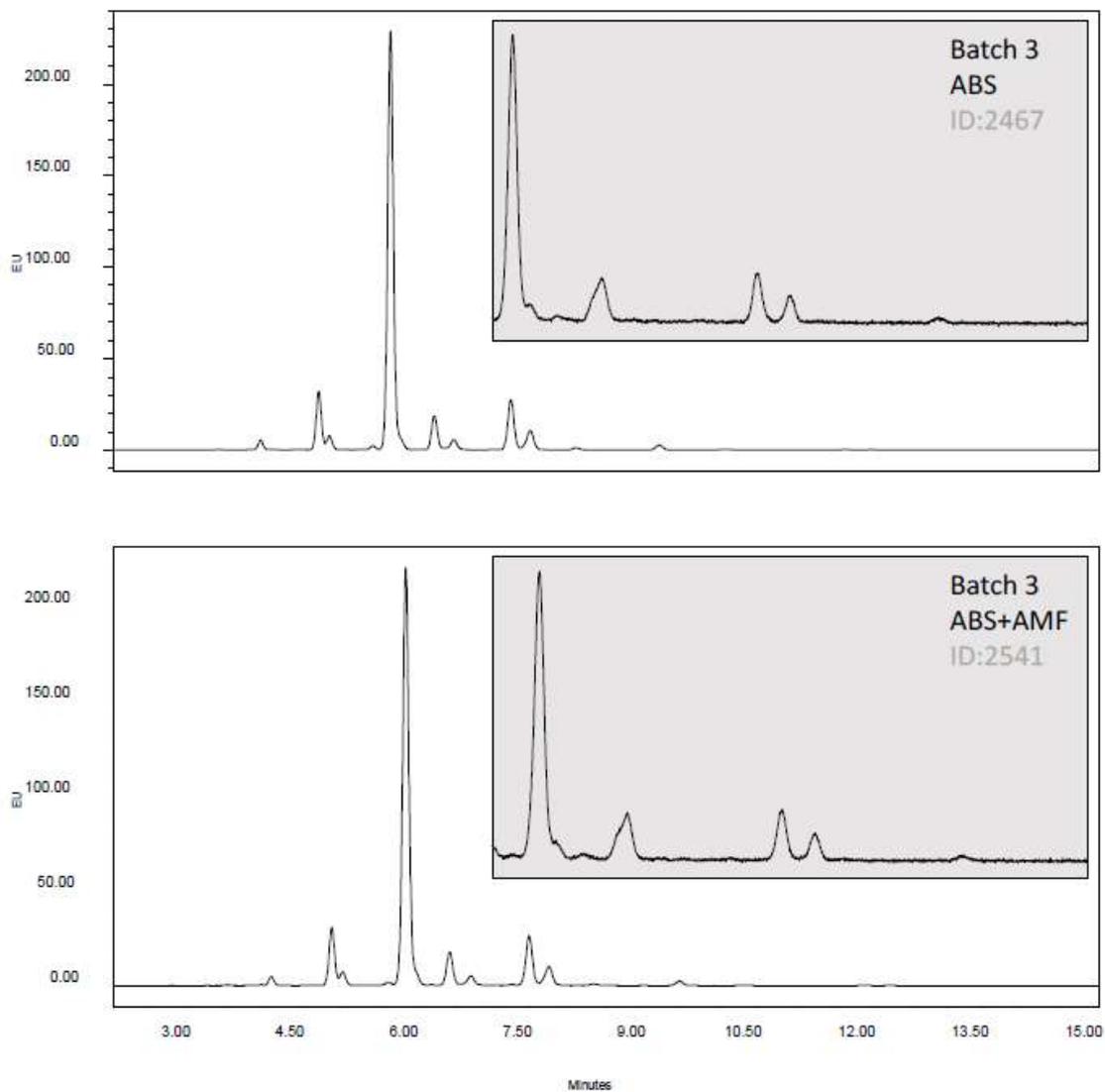


Figura 55. Cromatogramas HILIC de los N-glicanos del lote 3 de Xolair® antes y después de ser digeridos con ABS y ABS+AMF. Se añade una imagen ampliando del minuto 9 al 15. ABS (Sialidasa de *Athrobacter ureafaciens*), AMF (α -Fucosidasa de harina de almendra).

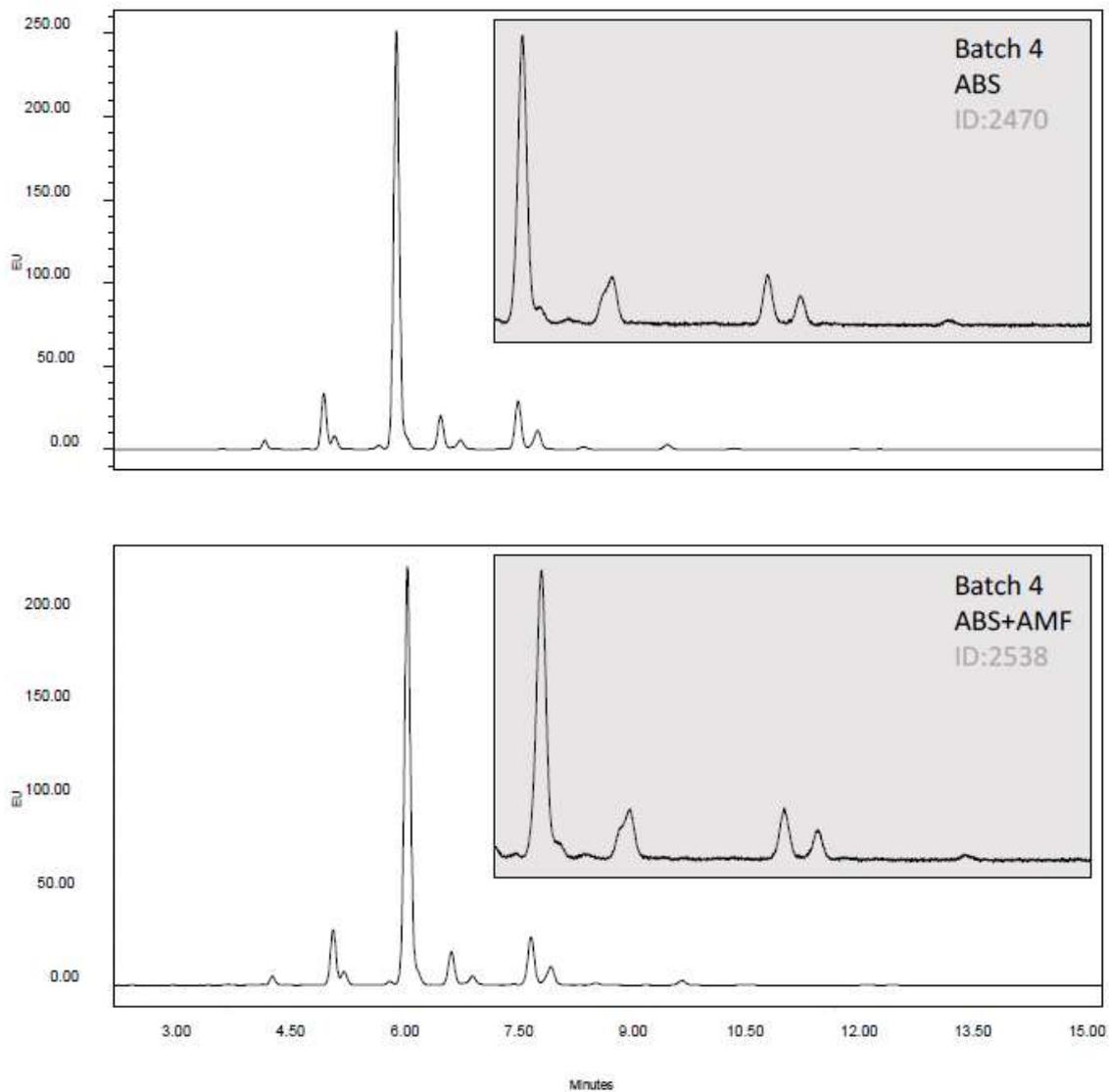


Figura 56. Cromatogramas HILIC de los N-glicanos del lote 4 de Xolair® antes y después de ser digeridos con ABS y ABS+AMF. Se añade una imagen ampliando del minuto 9 al 15. ABS (Sialidasa de *Athrobacter ureafaciens*), AMF (α -Fucosidasa de harina de almendra).

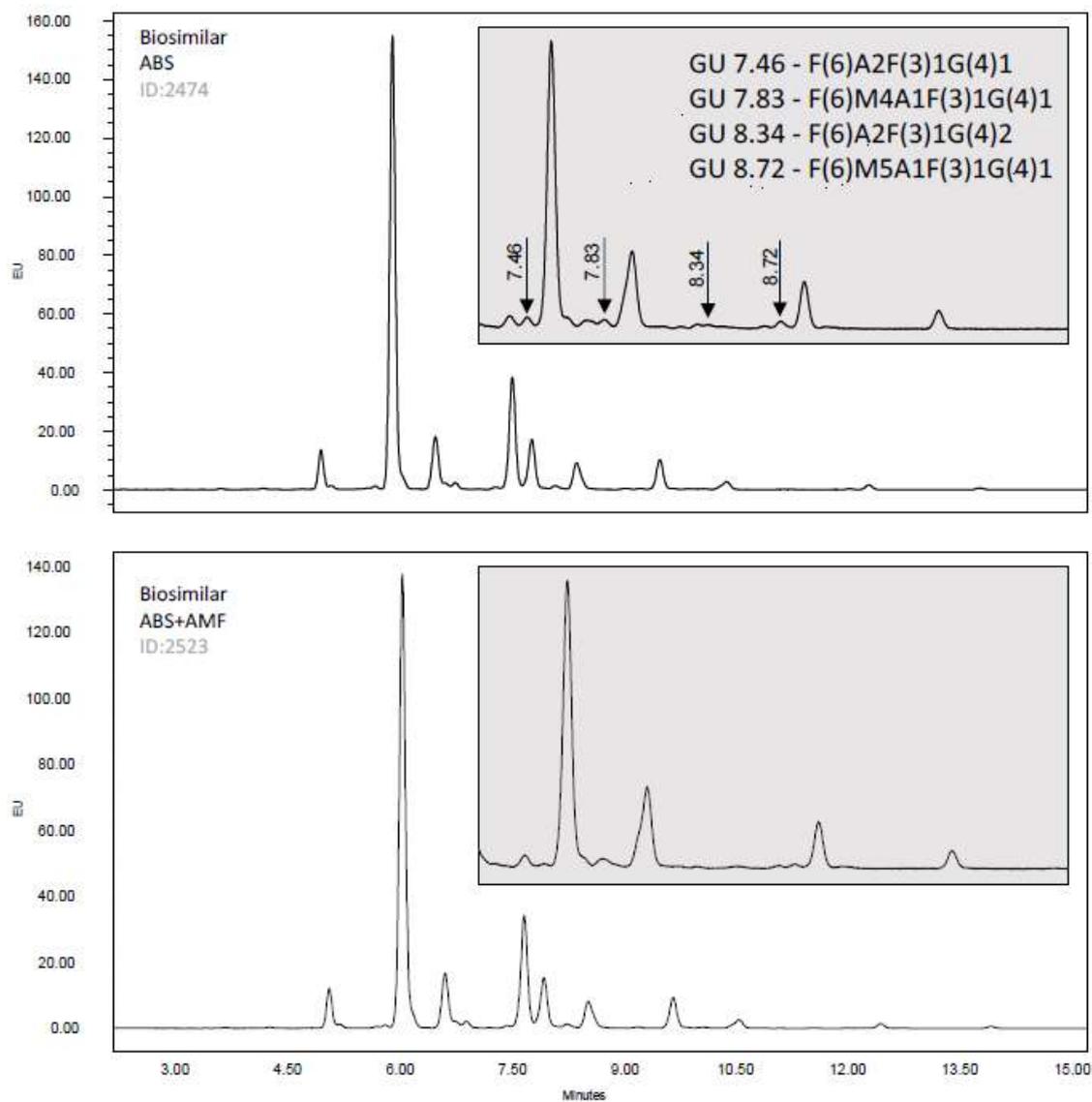


Figura 57. Cromatogramas HILIC de los N-glicanos de la versión veOMA de omalizumab antes y después de ser digeridos con ABS y ABS+AMF. Se añade una imagen ampliando del minuto 8.5 al 15. ABS (*Sialidasa de Athrobacter ureafaciens*), AMF (α -Fucosidasa de harina de almendra).

8.1.6. Anexo 1.6. Resultado del análisis por la técnica WAX

a) Resultado mediante WAX-HPLC

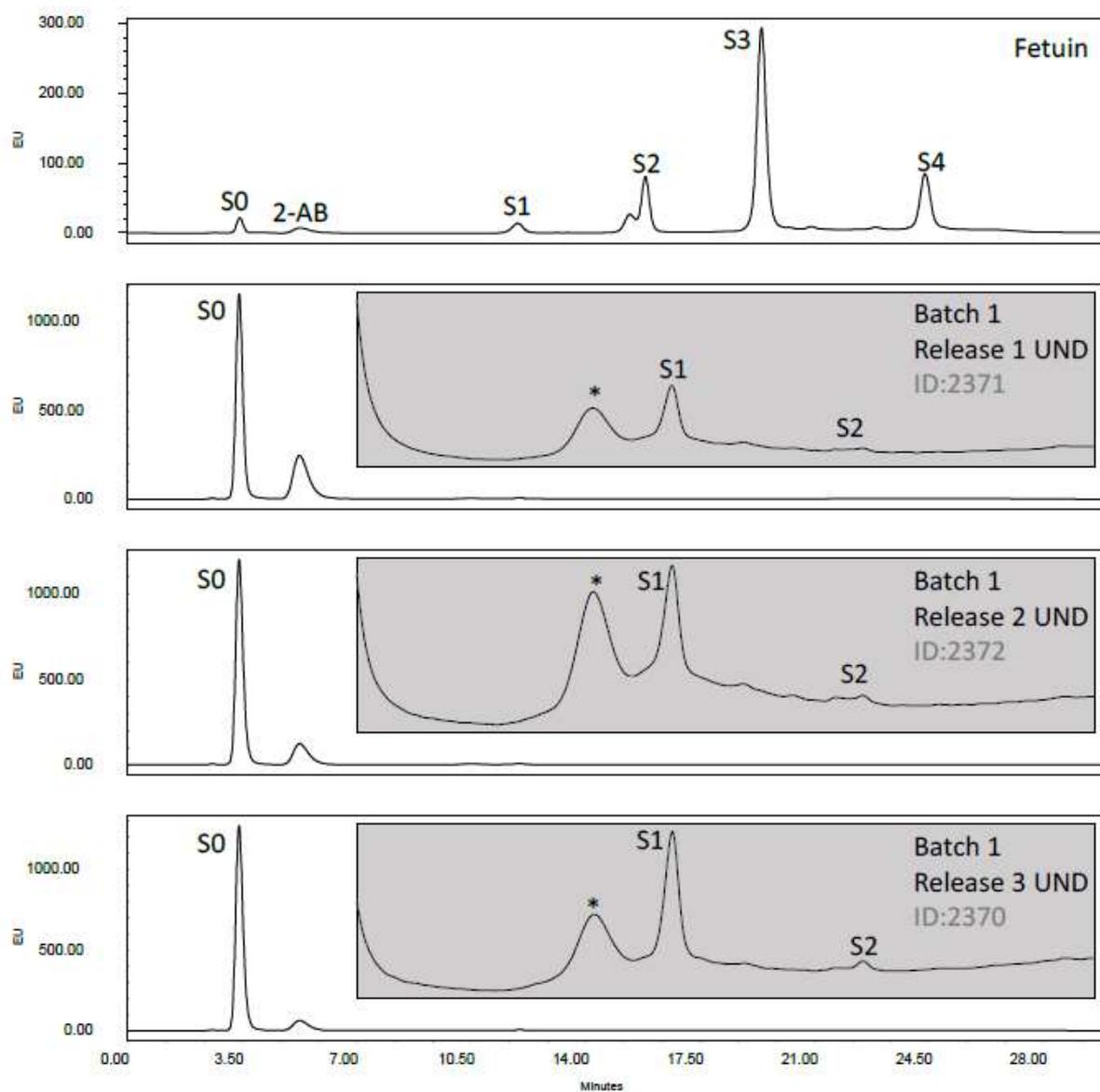


Figura 58. Resultado de las cromatografías WAX-HPLC de los N-glicanos de la fetuina (control), N-glicanos de la muestra no digeridos (UND) y digeridos con ABS del lote 1 de Xolair®. ABS (Sialidasa de *Athrobacter ureafaciens*).

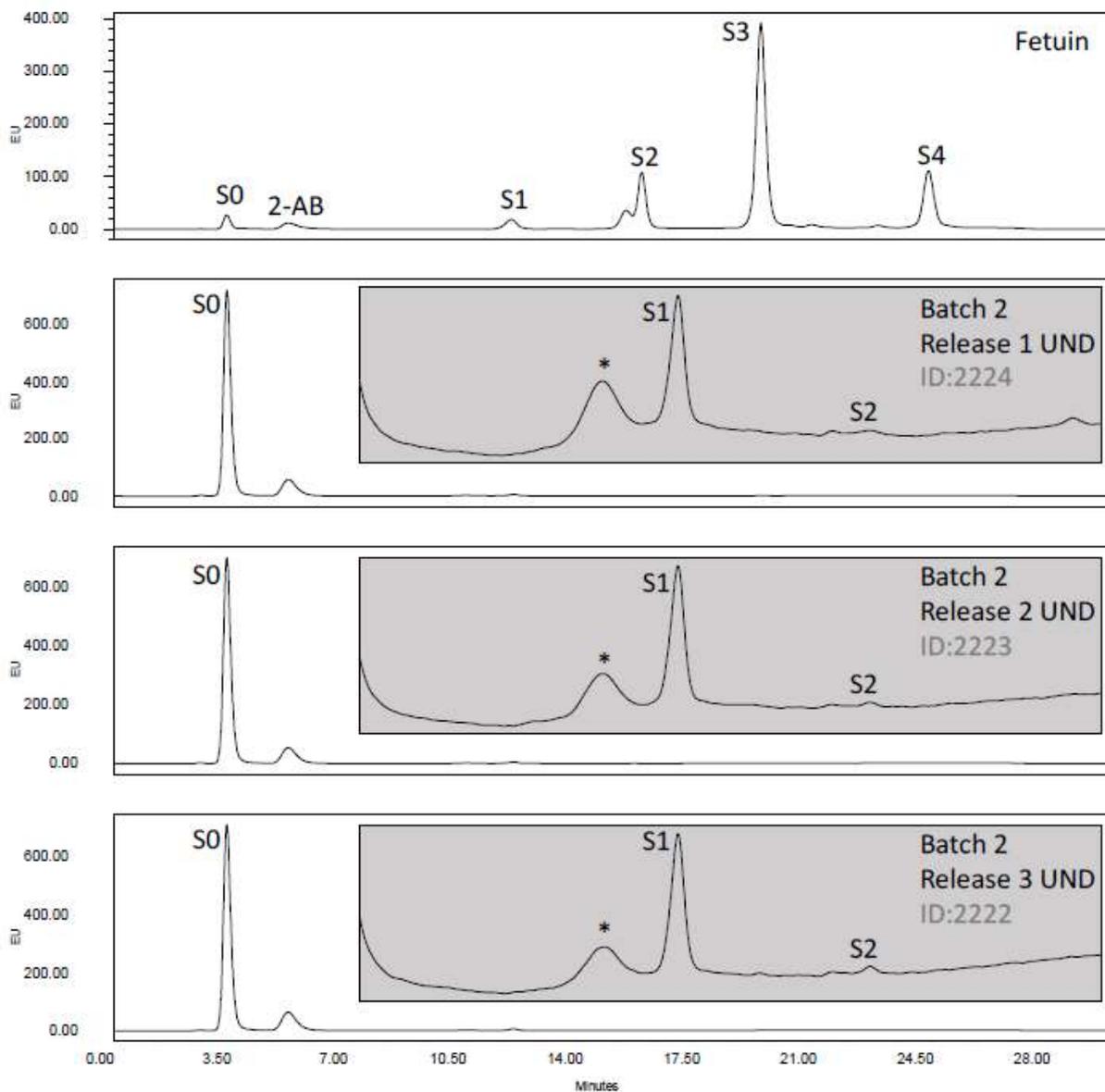


Figura 59. Resultado de las cromatografías WAX-HPLC de los N-glicanos de la fetuina (control), N-glicanos de la muestra no digeridos (UND) y digeridos con ABS del lote 2 de Xolair®. ABS (Sialidasa de *Athrobacter ureafaciens*).

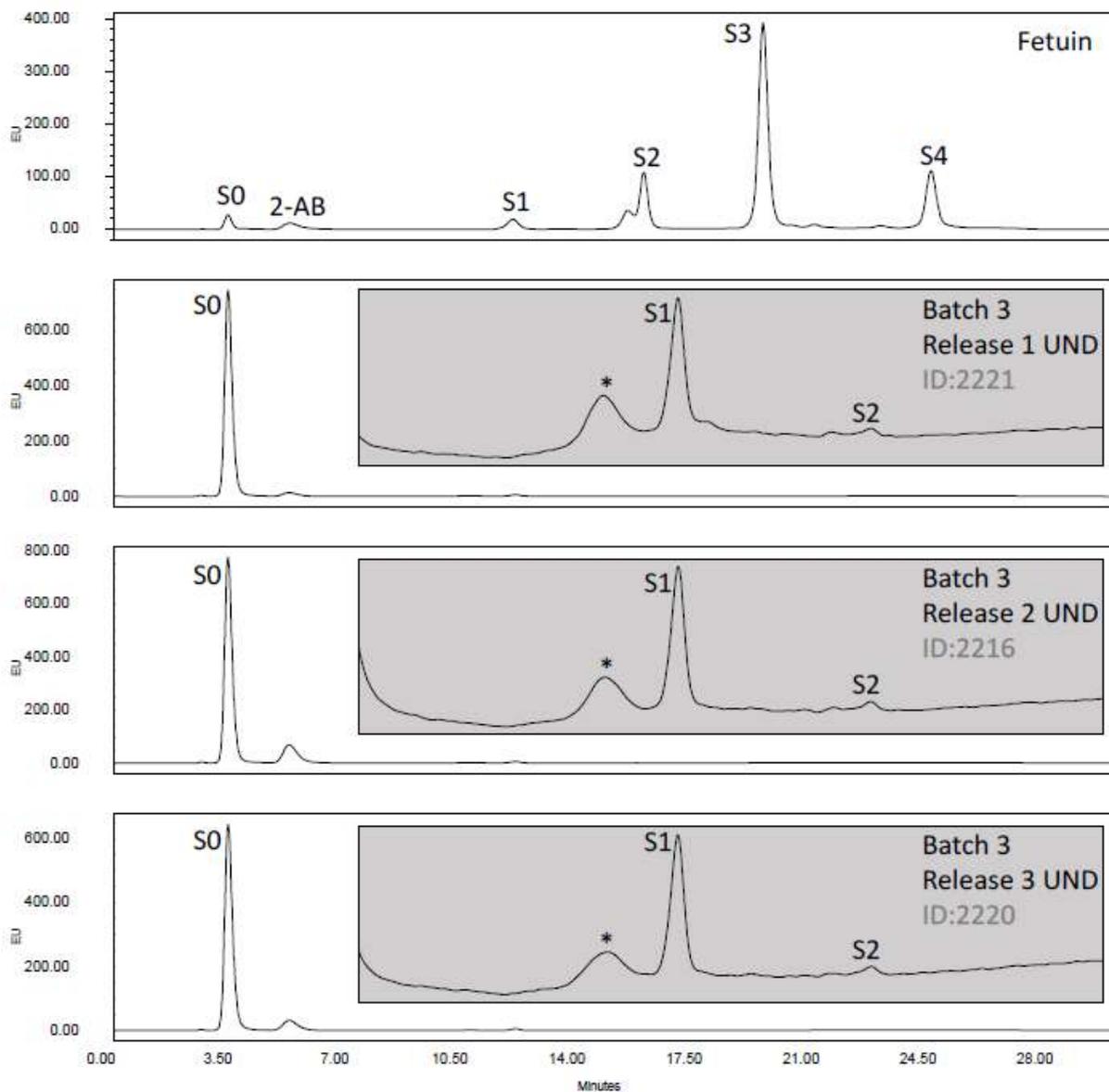


Figura 60. Resultado de las cromatografías WAX-HPLC de los *N*-glicanos de la fetuina (control), *N*-glicanos de la muestra no digeridos (UND) y digeridos con ABS del lote 3 de Xolair®. ABS (*Sialidasa de Athrobacter ureafaciens*).

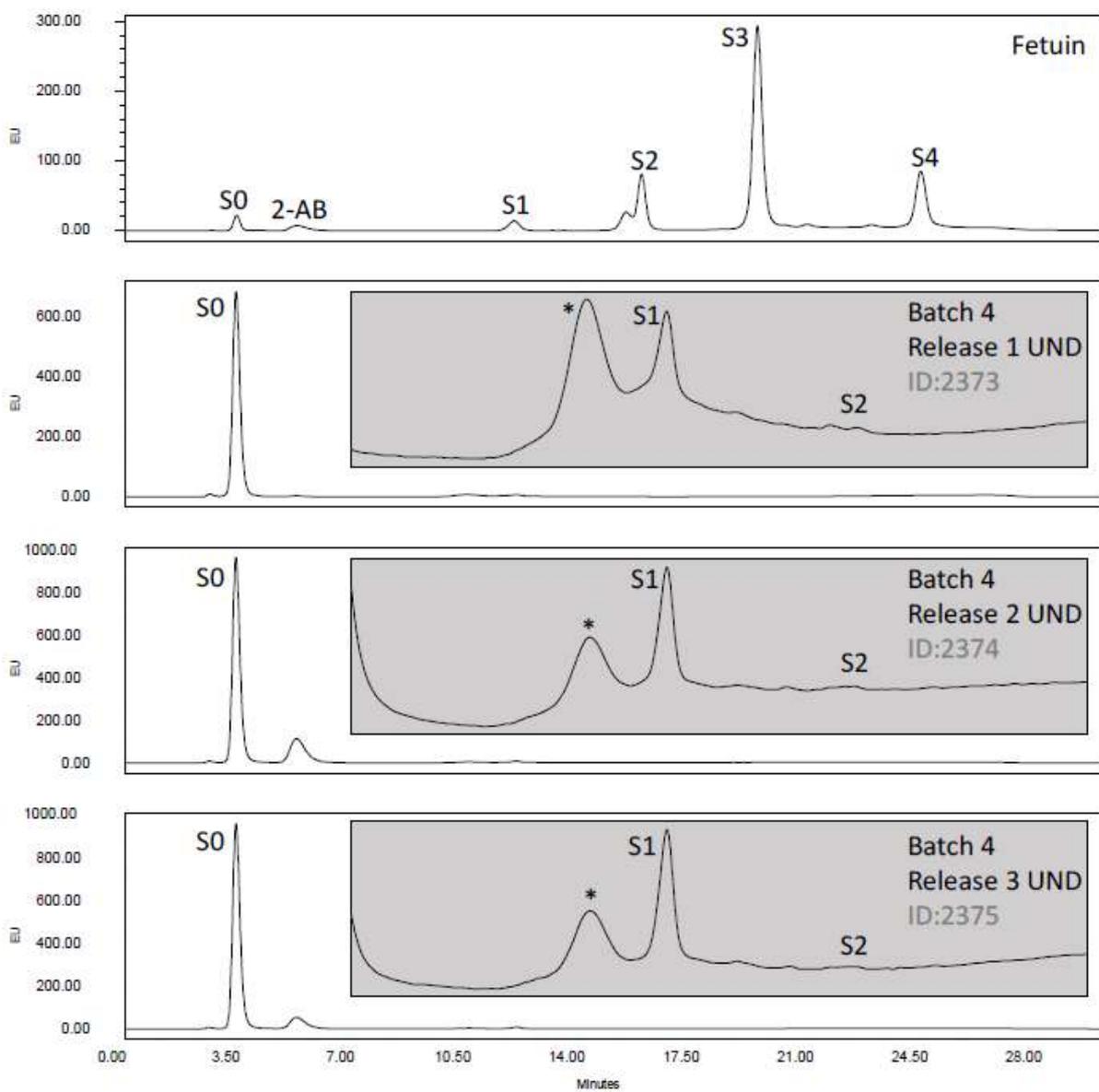


Figura 61. Resultado de las cromatografías WAX-HPLC de los N-glicanos de la fetuina (control), N-glicanos de la muestra no digeridos (UND) y digeridos con ABS del lote 4 de Xolair®. ABS (Sialidasa de *Athrobacter ureafaciens*).

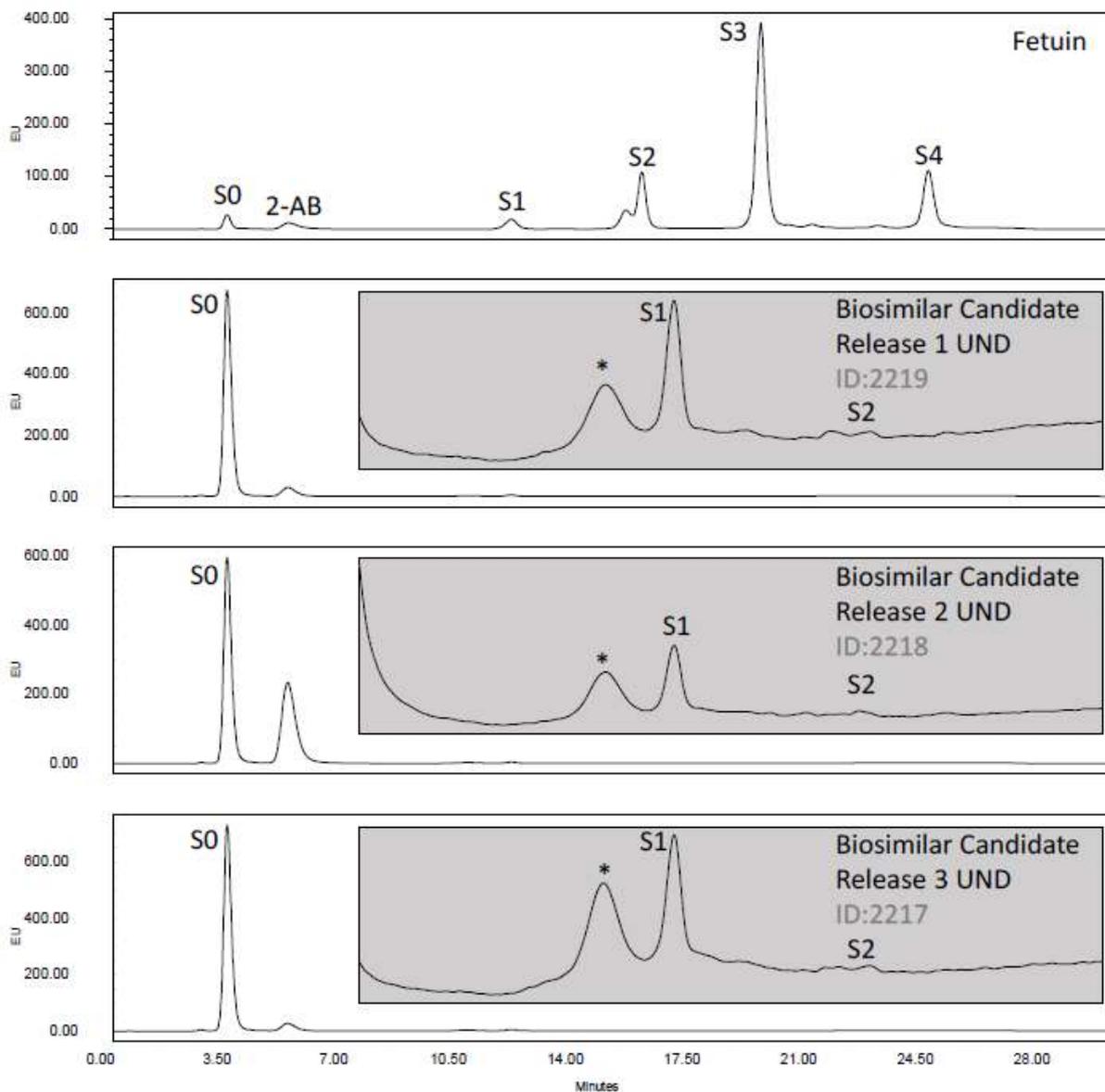


Figura 62. Resultado de las cromatografías WAX-HPLC de los N-glicanos de la fetuina (control), N-glicanos de la muestra no digeridos (UND) y digeridos con ABS de la versión veOMA de omalizumab. ABS (*Sialidasa de Athrobacter ureafaciens*).

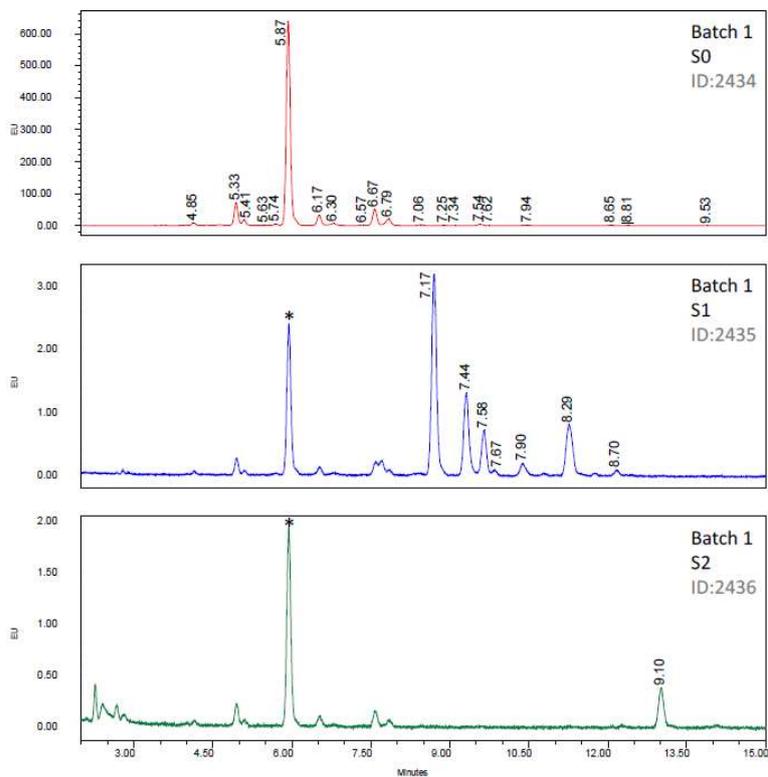
b) Resultado del análisis WAX-HILIC

Figura 63. Perfiles cromatográficos obtenidos al analizar usando la técnica HILIC cada fracción cargada de N-glicanos previamente separados mediante la técnica WAX del lote 1 de Xolair®.

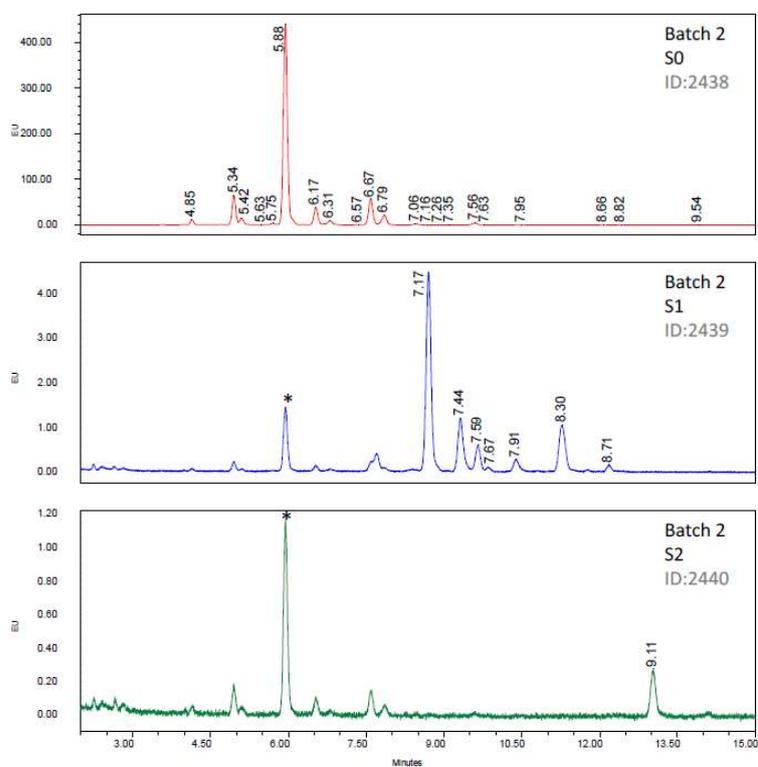


Figura 64. Perfiles cromatográficos obtenidos al analizar usando la técnica HILIC cada fracción cargada de N-glicanos previamente separados mediante la técnica WAX del lote 2 de Xolair®.

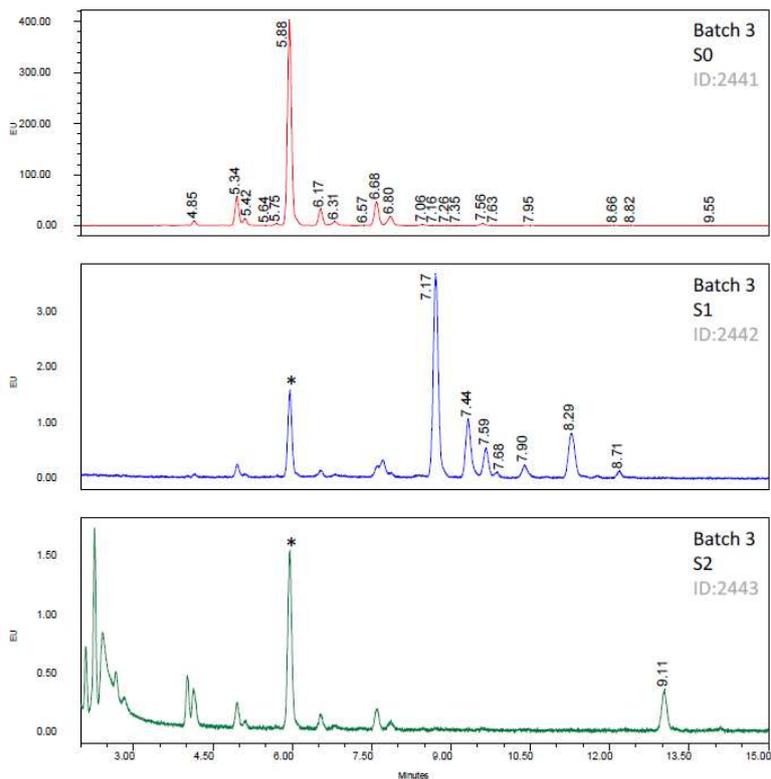


Figura 65. Perfiles cromatográficos obtenidos al analizar usando la técnica HILIC cada fracción cargada de N-glicanos previamente separados mediante la técnica WAX del lote 3 de Xolair®.

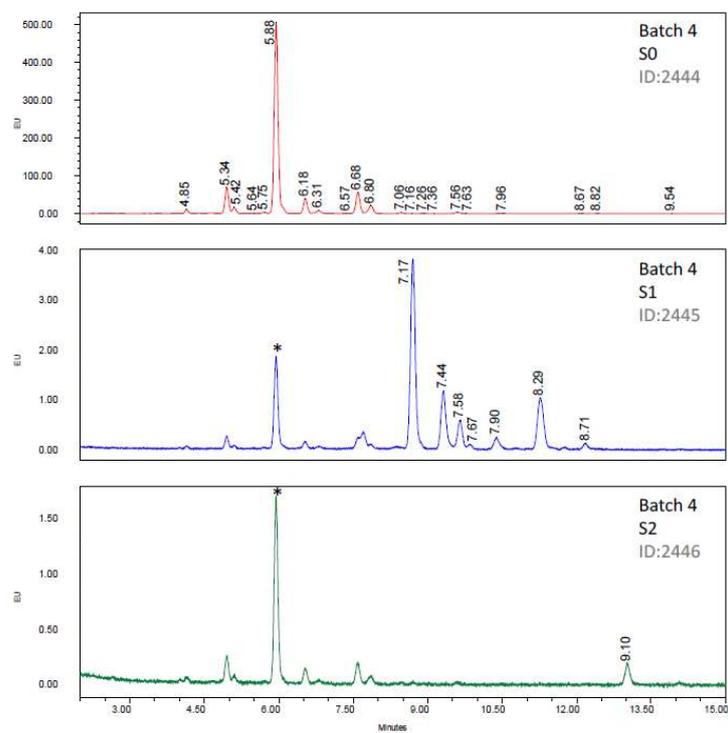


Figura 66. Perfiles cromatográficos obtenidos al analizar usando la técnica HILIC cada fracción cargada de N-glicanos previamente separados mediante la técnica WAX del lote 4 de Xolair®.

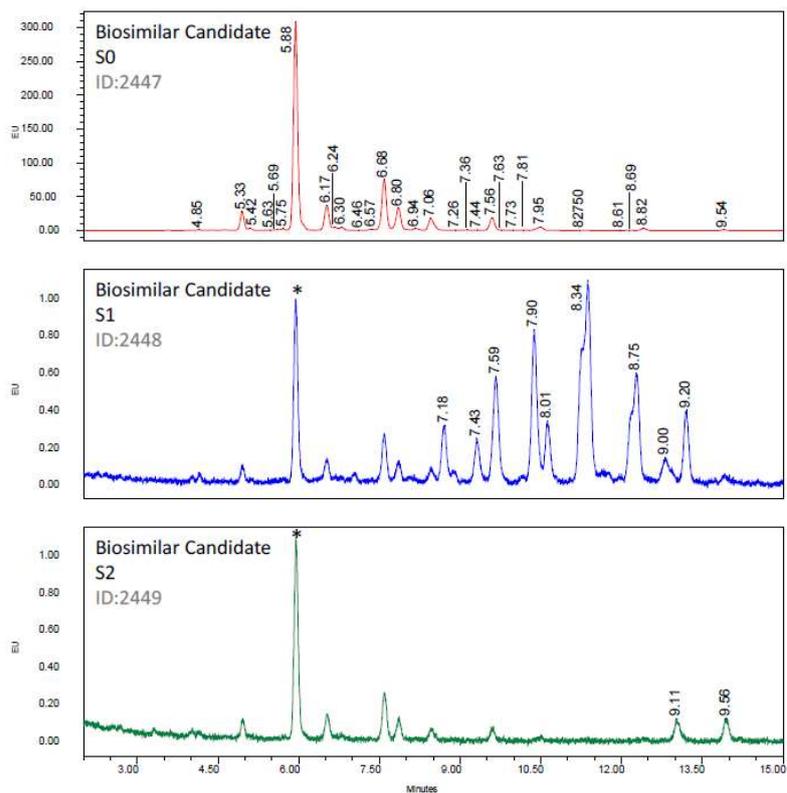


Figura 67. Perfiles cromatográficos obtenidos al analizar usando la técnica HILIC cada fracción cargada de N-glicanos previamente separados mediante la técnica WAX de la muestra de la versión veOMA.

8.1.7. Anexo 1.7. Resultados del análisis de espectrometría de masas

a) Resultados de los *N*-glicanos no digeridos por HILIC-FLD-MS

Las muestras se analizaron mediante HILIC-FLD con un detector espectrométrico de masas online asociado a un analizador de masas Q-Exactive Plus. La ionización se llevó a cabo con una fuente de electropulverización en modo negativo. Los iones generados se separaron, detectaron y midieron de acuerdo a su ratio *mass-to-charge* (m/z). Los glicanos se detectaron principalmente como iones $[M-H]^-$, $[M-2H]^{-2}$ y $[M-3H]^{-3}$.

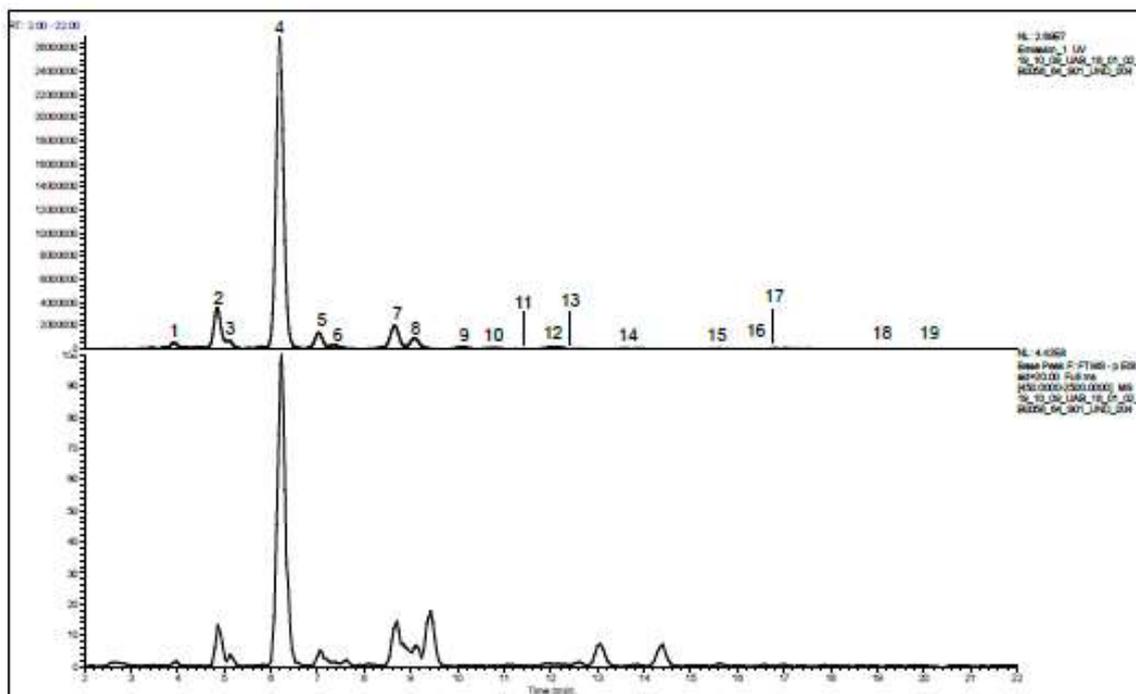


Figura 68. Cromatogramas y picos base para el Lote 1 de Xolair® (HILIC-FLD-MS).

Tabla 61. Estructuras de N-glicanos propuestas a partir del análisis de la muestra omalizumab. Masas experimentales para el Lote 1 de Xolair®.

T_R (min)	Pico_{UPLC}	Masa experimental (m/z)	Masa teórica (m/z)	Error (ppm)	Ión	Asignación	Masa Monoisotópica
3.92	1	1232.4656	1232.4686	2.43	[M-H] ⁻¹	A1	1233.4759
		615.7290	615.7307	2.76	[M-2H] ⁻²		
4.85	2	1378.5220	1378.5265	3.26	[M-H] ⁻¹	FA1	1379.5338
		688.7576	688.7596	2.90	[M-2H] ⁻²		
5.09	3	717.2689	717.2704	2.09	[M-H] ⁻¹	A2	1436.553
		1435.5439	1435.548	2.86	[M-2H] ⁻²		
6.19	4	1581.601	1581.6059	3.10	[M-H] ⁻¹	FA2	1582.6132
		790.2979	790.2993	1.77	[M-2H] ⁻²		
7.02	5	1353.4911	1353.4949	2.81	[M-H] ⁻¹	M5	1354.5022
		676.2426	676.2438	1.77	[M-2H] ⁻²		
7.35	6	769.7849	769.7860	1.43	[M-2H] ⁻²	FA1G1/ M4A1	1541.5866
		1540.5752	1540.5794	2.73	[M-H] ⁻¹		
		798.2955	798.2968	1.36	[M-2H] ⁻²		
8.65	7	891.8378	891.8390	1.35	[M-2H] ⁻²	FA3	1785.6926
		871.3241	871.3257	1.84	[M-2H] ⁻²		
		1743.6526	1743.6587	3.44	[M-H] ⁻¹		
9.09	8	871.3239	871.3257	2.07	[M-2H] ⁻²	FA2G1	1744.6660
		1743.6526	1743.6587	3.20	[M-H] ⁻¹		
10.10	9	757.2718	757.2702	2.11	[M-2H] ⁻²	M6	1516.555
10.75	10	915.3368	915.3337	3.39	[M-2H] ⁻²	FA1G1S1	1832.6820
11.34	11	972.8658	972.8654	0.62	[M-2H] ⁻²	FA3G1	1947.7454
12.10	12	1016.8726	1016.8734	1.87	[M-2H] ⁻²	FA2G1S1	2035.7614
		952.3515	952.3521	1.79	[M-2H] ⁻²		
		1905.7086	1905.7116	3.36	[M-H] ⁻¹		
12.54	13	1016.8731	1016.8734	1.18	[M-2H] ⁻²	FA2G1S1	2035.7614
13.75	14	838.2973	838.2966	0.72	[M-2H] ⁻²	M7	1678.6078
		931.8394	931.8389	0.64	[M-2H] ⁻²		
		996.3611	996.3602	0.90	[M-2H] ⁻²		
15.60	15	1097.8998	1097.8998	0.09	[M-2H] ⁻²	FA2G2S1	2197.8142
		1004.3580	1004.3576	0.0	[M-2H] ⁻²		
16.94	16	919.3230	919.3230	0.22	[M-2H] ⁻²	M8	1840.6606
17.40	17	919.3248	919.3230	2.07	[M-2H] ⁻²	M8	1840.6606
		1077.3884	1077.3866	1.30	[M-2H] ⁻²		
19.32	18	1243.4495	1243.4469	1.77	[M-2H] ⁻²	FA2G2S2	2488.9095
20.34	19	1000.3510	1000.3495	1.20	[M-2H] ⁻²	M9	2002.7135

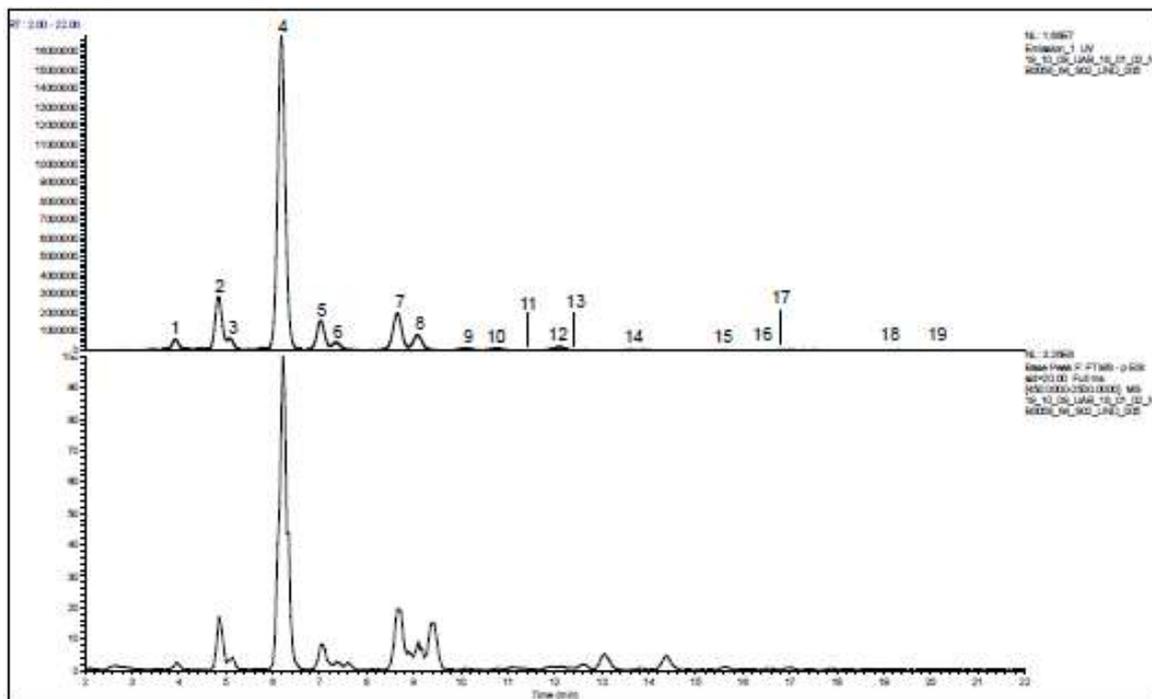


Figura 69. Cromatogramas y picos base para el Lote 2 de Xolair® (HILIC-FLD-MS).

Tabla 62. Estructuras de N-glicanos propuestas a partir del análisis de la muestra omalizumab. Masas experimentales para el Lote 2 de Xolair®.

T_R (min)	Pico_{UPLC}	Masa experimental (m/z)	Masa teórica (m/z)	Error (ppm)	Ión	Asignación	Masa Monoisotópica
3.92	1	1232.4650	1232.4686	2.92	[M-H] ⁻¹	A1	1233.4759
		615.7288	615.7307	3.09	[M-2H] ⁻²		
4.85	2	1378.5215	1378.5265	3.63	[M-H] ⁻¹	FA1	1379.5338
		688.7575	688.7596	3.05	[M-2H] ⁻²		
5.09	3	717.2686	717.2704	2.51	[M-H] ⁻¹	A2	1436.553
		1435.5432	1435.548	3.34	[M-2H] ⁻²		
6.19	4	1581.6007	1581.6059	3.29	[M-H] ⁻¹	FA2	1582.6132
		790.2975	790.2993	2.28	[M-2H] ⁻²		
7.02	5	1353.4903	1353.4949	3.40	[M-H] ⁻¹	M5	1354.5022
		676.2422	676.2438	2.37	[M-2H] ⁻²		
7.35	6	769.7844	769.7860	2.08	[M-2H] ⁻²	FA1G1/ M4A1	1541.5866
		1540.5739	1540.5794	3.57	[M-H] ⁻¹		
		798.2950	798.2968	2.25	[M-2H] ⁻²		
8.65	7	891.8380	891.8390	1.12	[M-2H] ⁻²	FA3	1785.6926
		871.3236	871.3257	2.38	[M-2H] ⁻²	FA2G1	1744.6660
		1743.6520	1743.6587	3.84	[M-H] ⁻¹		
9.09	8	871.3233	871.3257	2.75	[M-2H] ⁻²	FA2G1	1744.6660
		1743.6508	1743.6587	4.53	[M-H] ⁻¹		
10.10	9	757.2702	757.2702	0.00	[M-2H] ⁻²	M6	1516.555
10.75	10	915.3335	915.3337	0.22	[M-2H] ⁻²	FA1G1S1	1832.6820
11.34	11	972.8648	972.8654	0.62	[M-2H] ⁻²	FA3G1	1947.7454
12.10	12	1016.8715	1016.8734	1.87	[M-2H] ⁻²	FA2G1S1	2035.7614
		952.3504	952.3521	1.79	[M-2H] ⁻²	FA2G2	1906.7188
		1905.7052	1905.7116	3.36	[M-H] ⁻¹		
12.54	13	1016.8722	1016.8734	1.18	[M-2H] ⁻²	FA2G1S1	2035.7614
13.75	14	838.2972	838.2966	0.72	[M-2H] ⁻²	M7	1678.6078
		931.8395	931.8389	0.64	[M-2H] ⁻²	FM5A1G1	1865.6923
		996.3611	996.3602	0.90	[M-2H] ⁻²	FM4A1G1S1	1848.6770
15.60	15	1097.8997	1097.8998	0.09	[M-2H] ⁻²	FA2G2S1	2197.8142
		1004.3570	1004.3576	0.6	[M-2H] ⁻²	M5A1G1S1	2010.4298
16.94	16	919.3232	919.3230	0.22	[M-2H] ⁻²	M8	1840.6606
17.40	17	919.3249	919.3230	2.07	[M-2H] ⁻²	M8	1840.6606
		1077.3880	1077.3866	1.30	[M-2H] ⁻²	FM5A1G1S1	2156.7877
19.32	18	1243.4491	1243.4469	1.77	[M-2H] ⁻²	FA2G2S2	2488.9095
20.34	19	1000.3507	1000.3495	1.20	[M-2H] ⁻²	M9	2002.7135

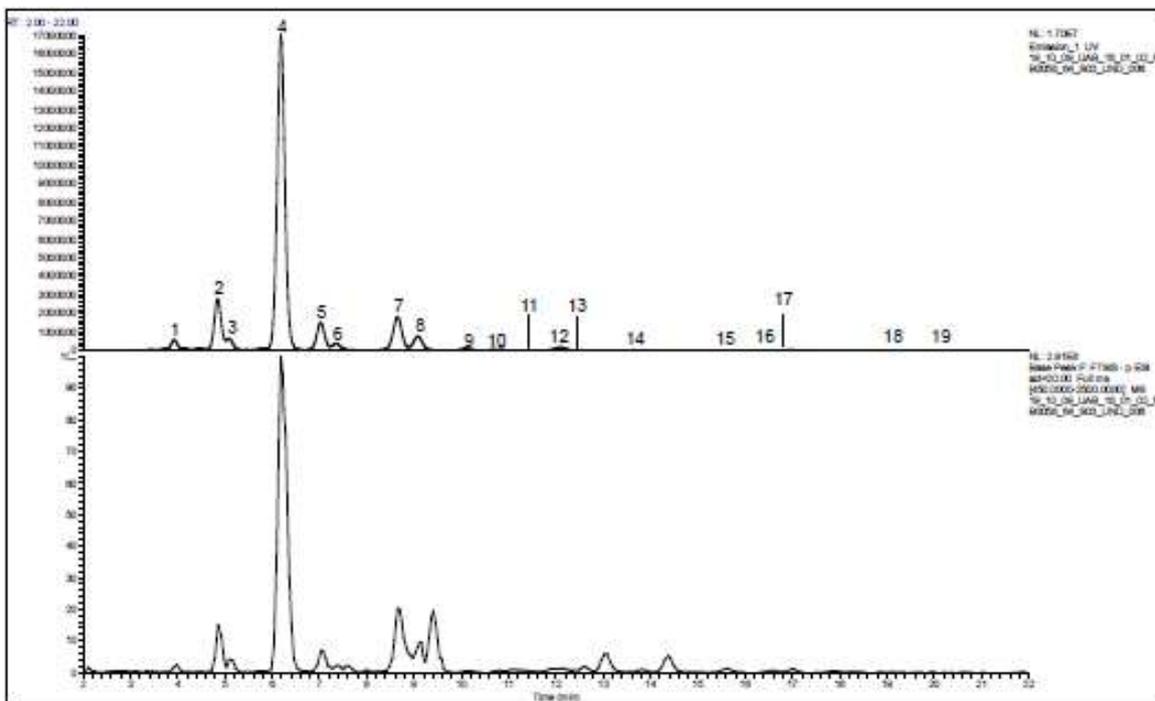


Figura 70. Cromatogramas y picos base para el Lote 3 de Xolair® (HILIC-FLD-MS).

Tabla 63. Estructuras de N-glicanos propuestas a partir del análisis de la muestra omalizumab. Masas experimentales para el Lote 3 de Xolair®.

T_R (min)	Pico_{UPLC}	Masa experimental (m/z)	Masa teórica (m/z)	Error (ppm)	Ión	Asignación	Masa Monoisotópica
3.92	1	1232.4672	1232.4686	1.14	[M-H] ⁻¹	A1	1233.4759
		615.7300	615.7307	1.14	[M-2H] ⁻²		
4.85	2	1378.5229	1378.5265	2.61	[M-H] ⁻¹	FA1	1379.5338
		688.7582	688.7596	2.03	[M-2H] ⁻²		
5.09	3	717.2696	717.2704	1.12	[M-H] ⁻¹	A2	1436.553
		1435.5455	1435.548	1.41	[M-2H] ⁻²		
6.19	4	1581.6013	1581.6059	0.91	[M-H] ⁻¹	FA2	1582.6132
		790.2979	790.2993	1.77	[M-2H] ⁻²		
7.02	5	1353.4925	1353.4949	1.77	[M-H] ⁻¹	M5	1354.5022
		676.2430	676.2438	1.18	[M-2H] ⁻²		
7.35	6	769.7855	769.7860	0.65	[M-2H] ⁻²	FA1G1/ M4A1	1541.5866
		1540.5767	1540.5794	1.85	[M-H] ⁻¹		
		798.2962	798.2968	0.75	[M-2H] ⁻²		
8.65	7	891.8385	891.8390	0.56	[M-2H] ⁻²	FA3	1785.6926
		871.3244	871.3257	1.49	[M-2H] ⁻²		
		1743.6536	1743.6587	2.92	[M-H] ⁻¹		
9.09	8	871.3244	871.3257	1.49	[M-2H] ⁻²	FA2G1	1744.6660
		1743.6534	1743.6587	3.04	[M-H] ⁻¹		
10.10	9	757.2723	757.2702	2.77	[M-2H] ⁻²	M6	1516.555
10.75	10	915.3365	915.3337	3.06	[M-2H] ⁻²	FA1G1S1	1832.6820
11.34	11	972.8662	972.8654	0.82	[M-2H] ⁻²	FA3G1	1947.7454
12.10	12	1016.8726	1016.8734	0.79	[M-2H] ⁻²	FA2G1S1	2035.7614
		952.3516	952.3521	0.53	[M-2H] ⁻²		
		1905.7076	1905.7116	2.10	[M-H] ⁻¹		
12.54	13	1016.8730	1016.8734	0.39	[M-2H] ⁻²	FA2G1S1	2035.7614
13.75	14	838.2983	838.2966	2.03	[M-2H] ⁻²	M7	1678.6078
		931.8408	931.8389	2.04	[M-2H] ⁻²		
		996.3625	996.3602	2.31	[M-2H] ⁻²		
15.60	15	1097.9000	1097.8998	0.18	[M-2H] ⁻²	FA2G2S1	2197.8142
		1004.3577	1004.3576	0.10	[M-2H] ⁻²		
16.94	16	919.3231	919.3230	0.11	[M-2H] ⁻²	M8	1840.6606
17.40	17	919.3253	919.3230	2.50	[M-2H] ⁻²	M8	1840.6606
		1077.3893	1077.3866	2.51	[M-2H] ⁻²		
19.32	18	1243.4497	1243.4469	2.25	[M-2H] ⁻²	FA2G2S2	2488.9095
20.34	19	1000.3511	1000.3495	1.60	[M-2H] ⁻²	M9	2002.7135

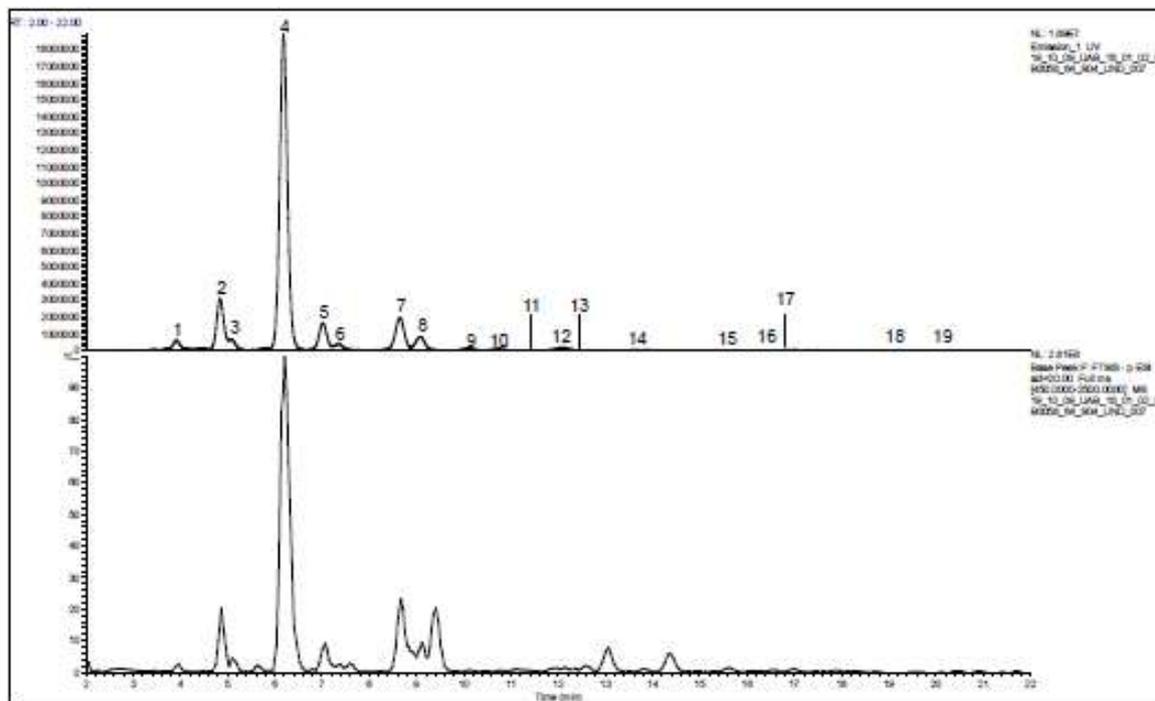


Figura 71. Cromatogramas y picos base para el Lote 4 de Xolair® (HILIC-FLD-MS).

Tabla 64. Estructuras de N-glicanos propuestas a partir del análisis de la muestra omalizumab. Masas experimentales para el Lote 4 de Xolair®.

T_R (min)	Pico_{UPLC}	Masa experimental (m/z)	Masa teórica (m/z)	Error (ppm)	Ión	Asignación	Masa Monoisotópica
3.92	1	1232.4661	1232.4686	2.03	[M-H] ⁻¹	A1	1233.4759
		615.7296	615.7307	1.79	[M-2H] ⁻²		
4.85	2	1378.5223	1378.5265	3.05	[M-H] ⁻¹	FA1	1379.5338
		688.7581	688.7596	2.18	[M-2H] ⁻²		
5.09	3	717.2695	717.2704	1.25	[M-H] ⁻¹	A2	1436.553
		1435.5445	1435.548	2.44	[M-2H] ⁻²		
6.19	4	1581.6011	1581.6059	3.03	[M-H] ⁻¹	FA2	1582.6132
		790.2977	790.2993	2.02	[M-2H] ⁻²		
7.02	5	1353.4915	1353.4949	2.51	[M-H] ⁻¹	M5	1354.5022
		676.2426	676.2438	1.77	[M-2H] ⁻²		
7.35	6	769.7855	769.7860	0.65	[M-2H] ⁻²	FA1G1/M4A1	1541.5866
		1540.5756	1540.5794	2.47	[M-H] ⁻¹		
		798.2957	798.2968	1.38	[M-2H] ⁻²		
8.65	7	891.8386	891.8390	0.45	[M-2H] ⁻²	FA3	1785.6926
		871.3241	871.3257	1.84	[M-2H] ⁻²		
		1743.6532	1743.6587	3.15	[M-H] ⁻¹		
9.09	8	871.3542	871.3257	1.72	[M-2H] ⁻²	FA2G1	1744.6660
		1743.6526	1743.6587	3.50	[M-H] ⁻¹		
10.10	9	757.2723	757.2702	2.77	[M-2H] ⁻²	M6	1516.555
10.75	10	915.3371	915.3337	3.71	[M-2H] ⁻²	FA1G1S1	1832.6820
11.34	11	972.8665	972.8654	1.13	[M-2H] ⁻²	FA3G1	1947.7454
12.10	12	1016.8728	1016.8734	0.59	[M-2H] ⁻²	FA2G1S1	2035.7614
		952.3519	952.3521	0.21	[M-2H] ⁻²		
		1905.7084	1905.7116	1.68	[M-H] ⁻¹		
12.54	13	1016.8730	1016.8734	0.39	[M-2H] ⁻²	FA2G1S1	2035.7614
13.75	14	838.2983	838.2966	2.03	[M-2H] ⁻²	M7	1678.6078
		931.8406	931.8389	1.82	[M-2H] ⁻²		
		996.3626	996.3602	2.41	[M-2H] ⁻²		
15.60	15	1097.8999	1097.8998	0.09	[M-2H] ⁻²	FA2G2S1	2197.8142
		1004.3580	1004.3576	0.40	[M-2H] ⁻²		
16.94	16	919.3233	919.3230	0.33	[M-2H] ⁻²	M8	1840.6606
17.40	17	919.3259	919.3230	3.15	[M-2H] ⁻²	M8	1840.6606
		1077.3895	1077.3866	2.69	[M-2H] ⁻²		
19.32	18	1243.4502	1243.4469	2.65	[M-2H] ⁻²	FA2G2S2	2488.9095
20.34	19	1000.3510	1000.3495	1.50	[M-2H] ⁻²	M9	2002.7135

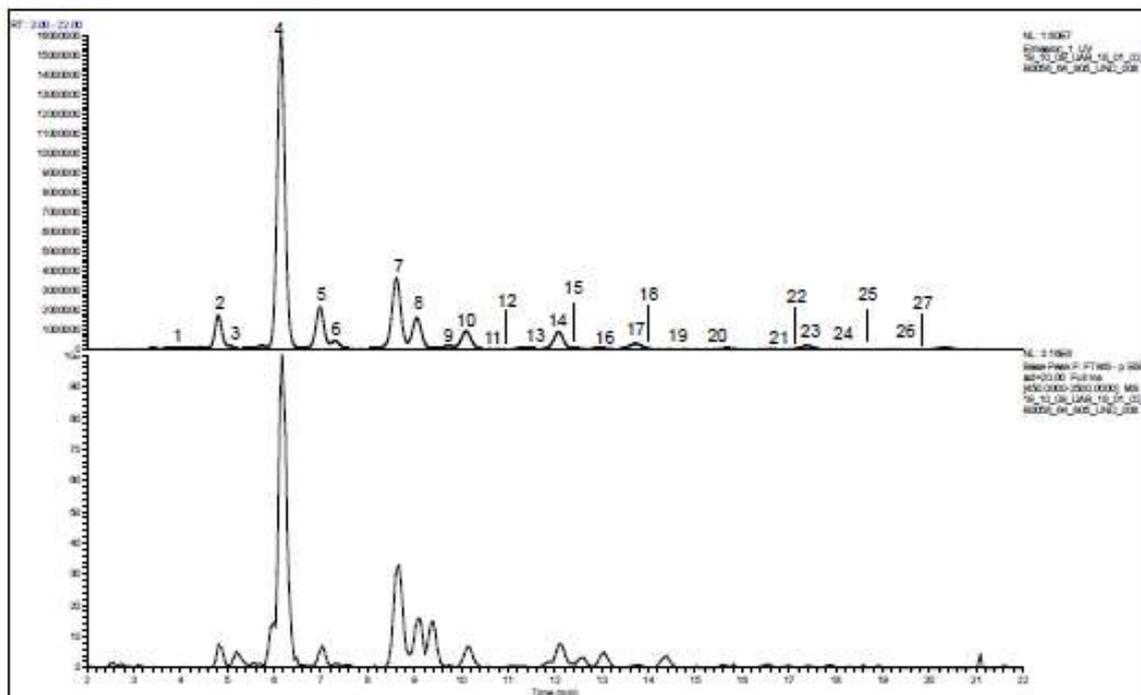


Figura 72. Cromatogramas y picos base para la versión veOMA (HILIC-FLD-MS).

Tabla 65. Estructuras de N-glicanos propuestas a partir del análisis de la muestra omalizumab. Masas experimentales para la versión veOMA.

T_R (min)	Pico _{UPLC}	Masa experimental (m/z)	Masa teórica (m/z)	Error (ppm)	Ión	Asignación	Masa Monoisotópica
3.88	1	1232.4673	1232.4686	1.05	$[M-H]^{-1}$	A1	1233.4759
		615.7300	615.7307	1.14	$[M-2H]^{-2}$		
4.80	2	1378.5232	1378.5265	2.39	$[M-H]^{-1}$	FA1	1379.5338
		688.7585	688.7596	1.60	$[M-2H]^{-2}$		
5.09	3	717.2698	717.2704	0.84	$[M-2H]^{-2}$	A2	1436.553
		1435.5480	1435.548	1.81	$[M-H]^{-1}$		
6.15	4	1581.6059	1581.6059	3.29	$[M-H]^{-1}$	FA2	1582.6132
		790.2993	790.2993	2.02	$[M-2H]^{-2}$		
6.98	5	1353.4949	1353.4949	1.26	$[M-H]^{-1}$	M5	1354.5022
		676.2438	676.2438	1.04	$[M-2H]^{-2}$		
		769.7855	769.7860	0.65	$[M-2H]^{-2}$	FA1G1/FM4A1	1541.5866
		1540.5744	1540.5794	3.25	$[M-H]^{-1}$		
7.30	6	769.7864	769.7860	0.52	$[M-2H]^{-2}$	FA1G1/FM4A1	1541.5866
		1540.5784	1540.5794	0.65	$[M-H]^{-1}$		
		891.8390	891.8390	0.00	$[M-2H]^{-2}$	FA3	1785.6926
		1784.6855	1784.6853	0.11	$[M-H]^{-1}$		
7.97		777.7860	777.7835	3.21	$[M-2H]^{-2}$	M4A1G1/M5A1	1557.5815

8.65	7	891.8395	891.8390	0.56	[M-2H] ⁻²	FA3	1785.6926
		871.3247	871.3257	1.15	[M-2H] ⁻²	FA2G1	1744.6660
		1743.6533	1743.6587	3.10	[M-H] ⁻¹		
		777.7822	777.7835	1.67	[M-2H] ⁻²	M4A1G1/M5A1	1557.5815
		1556.5696	1556.5743	3.02	[M-H] ⁻¹		
9.05	8	871.3550	871.3257	0.80	[M-2H] ⁻²	FA2G1	1744.6660
		1743.6563	1743.6587	1.38	[M-H] ⁻¹		
9.72	9	850.8131	850.8125	0.71	[M-2H] ⁻²	FM4A1G1/FM5A1	1703.6395
		972.8694	972.8654	4.11	[M-2H] ⁻²	FA3G1	1947.7454
10.10	10	850.8131	850.8125	0.71	[M-2H] ⁻²	FM4A1G1/FM5A1	1703.6395
		757.2706	757.2702	0.53	[M-2H] ⁻²	M6	1516.555
		972.8650	972.8654	0.41	[M-2H] ⁻²	FA3G1	1947.7454
10.68	11	972.8696	972.8654	4.32	[M-2H] ⁻²	FA3G1	1947.7454
10.74	12	915.3371	915.3337	4.37	[M-2H] ⁻²	FA1G1S1	1832.6820
11.37	13	972.8663	972.8654	0.93	[M-2H] ⁻²	FA3G1	1947.7454
		944.3561	1016.8734	1.48	[M-2H] ⁻²	FA2G1S1	2035.7614
12.08	14	1016.8711	1016.8734	2.23	[M-2H] ⁻²	FA2G1S1	2035.7614
		952.3513	952.3521	0.84	[M-2H] ⁻²	FA2G2	1906.7188
		1905.7058	1905.7116	3.04	[M-H] ⁻¹		
		858.8082	858.8099	1.98	[M-2H] ⁻²	M5A1G1	1719.6344
12.61	15	1016.8721	1016.8734	1.28	[M-2H] ⁻²	FA2G1S1	2035.7614
12.95	16	923.8411	923.8414	0.32	[M-2H] ⁻²	FM4A1G1F1	1849.6974
		931.8384	931.8389	0.54	[M-2H] ⁻²	FM5A1G1	1865.6923
13.73	17	838.2977	838.2966	1.31	[M-2H] ⁻²	M7	1678.6078
		931.8401	931.8389	1.29	[M-2H] ⁻²	FM5A1G1	1865.6923
		996.3616	996.3602	1.41	[M-2H] ⁻²	FM4A1G1S1	1848.6770
14.33	18	1016.8733	1016.8734	0.10	[M-2H] ⁻²	FA2G1S1	2035.7614
14.88	19	1025.3845	1025.3811	3.32	[M-2H] ⁻²	FAG2F1	2052.7767
15.70	20	1097.9010	1097.8998	1.09	[M-2H] ⁻²	FA2G2S1	2197.8142
		996.3610	996.3602	0.80	[M-2H] ⁻²	FM4A1G1S1	1848.6770
16.63	21	1004.8693	1004.8678	1.49	[M-2H] ⁻²	FM5A1G1F1	2011.7502
16.94	22	919.3238	919.3230	0.87	[M-2H] ⁻²	M8	1840.6606
17.40	23	919.3242	919.3230	1.31	[M-2H] ⁻²	M8	1840.6606
		1077.3880	1077.3866	1.30	[M-2H] ⁻²	FM5A1G1S1	2156.7877
		1097.9014	1097.8998	1.46	[M-2H] ⁻²	FA2G2S1	2197.8142
18.18	24	1170.9315	1170.9288	2.31	[M-2H] ⁻²	FA2G2F1S1	2343.8722
19.22	25	1077.3884	1077.3866	1.67	[M-2H] ⁻²	FM5A1G1S1	2156.7877
		1243.4506	1243.4469	2.98	[M-2H] ⁻²	FA2G2S2	2488.9095
20.37	26	1000.3510	1000.3495	1.50	[M-2H] ⁻²	M9	2002.7135
20.88	27	1243.4499	1243.4469	2.41	[M-2H] ⁻²	FA2G2S2	2488.9095

b) Resultado de la mezcla de *N*-glicanos digeridos por HILIC-FLD-MS**Para el conjunto de lotes de Xolair®**

Se realizaron digestiones con exoglicosidasas en una muestra que contenía los cuatro lotes de Xolair® y luego se analizaron mediante HILIC-FLD-MS. Los perfiles de fluorescencia de las digestiones se muestran en las figuras (Figura 73, Figura 74, Figura 75 y Figura 76). Las estructuras identificadas en el espectro MS tras la digestión se presentan en las tablas (Tabla 66, Tabla 67, Tabla 68 y Tabla 69).

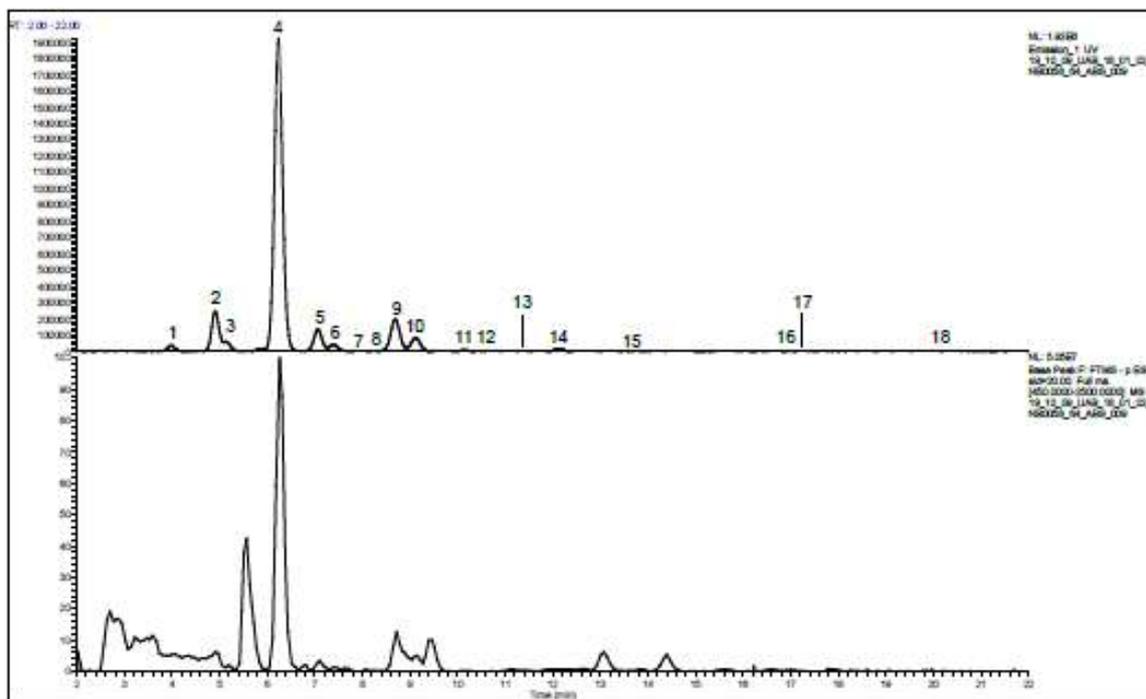


Figura 73. Cromatogramas y picos base para una muestra conjunta con los cuatro lotes de Xolair® digerida con ABS (HILIC-FLD-MS). ABS (Sialidasa de la *Athrobacter ureafaciens*).

Tabla 66. Estructuras de N-glicanos propuestas a partir del análisis de la muestra conjunta con los cuatro lotes de Xolair® digerida con ABS (HILIC-FLD-MS). ABS (Sialidasa de la *Athrobacter ureafaciens*).

T_R (min)	Pico_{UPLC}	Masa experimental (m/z)	Masa teórica (m/z)	Error (ppm)	Ión	Asignación	Masa Monoisotópica
3.99	1	1232.4663	1232.4686	1.87	[M-H] ⁻¹	A1	1233.4759
		615.7296	615.7307	1.79	[M-2H] ⁻²		
4.90	2	1378.5225	1378.5265	2.90	[M-H] ⁻¹	FA1	1379.5338
		688.7581	688.7596	2.18	[M-2H] ⁻²		
5.14	3	717.2696	717.2704	1.12	[M-H] ⁻¹	A2	1436.553
		1435.5469	1435.548	0.77	[M-2H] ⁻²		
6.24	4	1581.5994	1581.6059	4.11	[M-H] ⁻¹	FA2	1582.6132
		790.2974	790.2993	2.40	[M-2H] ⁻²		
7.07	5	1353.4936	1353.4949	0.96	[M-H] ⁻¹	M5	1354.5022
		676.2438	676.2438	0.00	[M-2H] ⁻²		
7.39	6	769.7864	769.7860	0.52	[M-2H] ⁻²	FA1G1/FM4A1	1541.5866
		798.2971	798.2968	0.38	[M-2H] ⁻²	A2G1	1598.6081
7.87	7	798.2977	798.2968	1.13	[M-2H] ⁻²	A2G1	1598.6081
8.42	8	891.8411	891.8390	2.35	[M-2H] ⁻²	FA3	1785.9626
8.69	9	871.3243	871.3257	1.61	[M-2H] ⁻²	FA2G1	1744.6660
		1743.6520	1743.6587	3.84	[M-H] ⁻¹		
		777.7822	777.7835	1.67	[M-2H] ⁻²	M5A1	1557.5815
9.12	10	871.3244	871.3257	1.49	[M-2H] ⁻²	FA2G1	1744.6660
		1743.6530	1743.6587	3.27	[M-H] ⁻¹		
10.15	11	850.8144	850.8125	2.23	[M-2H] ⁻²	FM4A1G1/FM5A1	1703.6395
		757.2719	757.2702	2.24	[M-2H] ⁻²	M6	1516.550
10.55	12	879.3249	879.3232	1.93	[M-2H] ⁻²	A2G2	1760.6609
11.40	13	972.8674	972.8654	2.06	[M-2H] ⁻²	FA3G1	1947.7454
12.14	14	952.3510	952.3521	1.16	[M-2H] ⁻²	FA2G2	1906.7188
13.74	15	838.2976	838.2966	1.19	[M-2H] ⁻²	M7	1678.6078
		931.8401	931.8389	1.29	[M-2H] ⁻²	FM5A1G1	1865.6923
16.94	16	919.3233	919.3230	0.33	[M-2H] ⁻²	M8	1840.6606
17.49	17	919.3239	919.3230	0.98	[M-2H] ⁻²	M8	1840.6606
20.44	19	1000.3505	1000.3495	1.00	[M-2H] ⁻²	M9	2002.7135

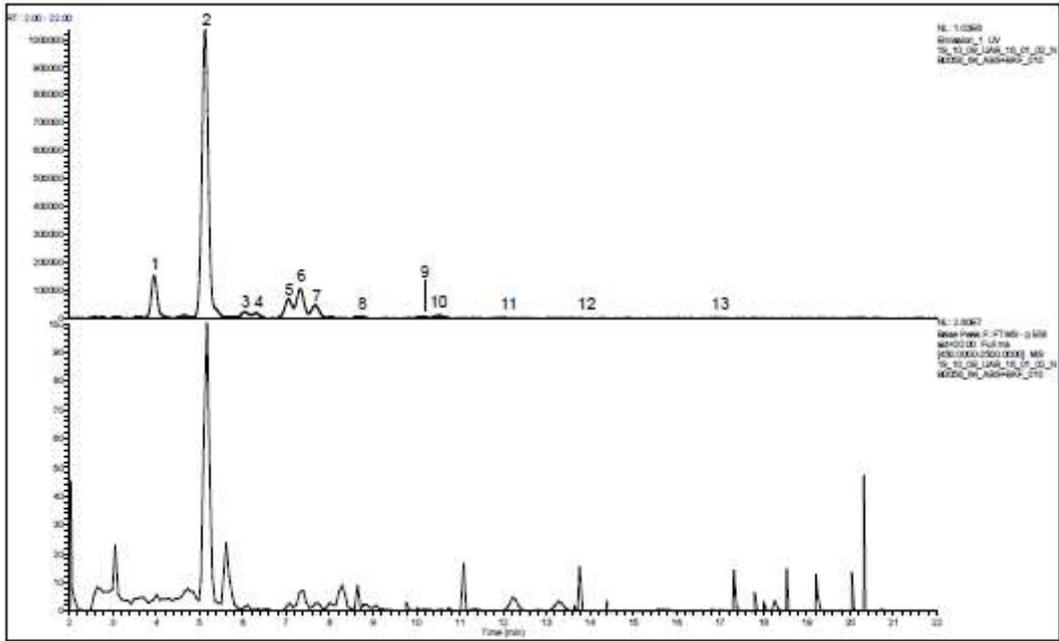


Figura 74. Cromatogramas y picos base para una muestra conjunta con los cuatro lotes de Xolair® digerida con ABS+BKF (HILIC-FLD-MS). ABS (Sialidasa de la *Athrobacter ureafaciens*), BKF (Fucosidasa bovina de riñón).

Tabla 67. Estructuras de N-glicanos propuestas a partir del análisis de la muestra conjunta con los cuatro lotes de Xolair® digerida con ABS+BKF (HILIC-FLD-MS). ABS (Sialidasa de la *Athrobacter ureafaciens*), BKF (Fucosidasa bovina de riñón).

T_R (min)	Pico _{UPLC}	Masa experimental (m/z)	Masa teórica (m/z)	Error (ppm)	Ión	Asignación	Masa Monoisotópica
3.95	1	1232.4658	1232.4686	2.27	[M-H] ⁻¹	A1	1233.4759
		615.7294	615.7307	2.11	[M-2H] ⁻²		
5.14	2	717.2682	717.2704	3.07	[M-H] ⁻¹	A2	1436.5553
		1435.5417	1435.548	4.39	[M-2H] ⁻²		
6.05	3	696.7571	696.7571	0.00	[M-2H] ⁻²	A1G1/M4A1	1395.5287
6.30	4	-	-	-	-	No asignado	-
7.05	5	1353.4941	1353.4949	0.59	[M-H] ⁻¹	M5	1354.5022
		676.2435	676.2438	0.44	[M-2H] ⁻²		
		818.8095	818.8100	0.61	[M-2H] ⁻²		
7.32	6	798.2964	798.2968	0.50	[M-2H] ⁻²	A2G1	1598.6081
		1597.5981	1597.6008	1.69	[M-H] ⁻¹		
7.67	7	798.2970	798.2968	0.25	[M-2H] ⁻²	A2G1	1598.6081
		1597.5992	1597.6008	1.00	[M-H] ⁻¹		
8.75	8	777.7808	777.7835	3.47	[M-2H] ⁻²	M5A1	1785.9626
10.12	9	757.2703	757.2702	0.13	[M-2H] ⁻²	M6	1516.550
10.52	10	879.3241	879.3232	1.02	[M-2H] ⁻²	A2G2	1760.6609
		1759.6607	1759.6536	4.03	[M-H] ⁻¹		
12.02	11	858.8092	858.8099	0.82	[M-2H] ⁻²	M5A1G1	1719.6344
13.74	12	838.2953	838.2966	1.55	[M-2H] ⁻²	M7	1678.6078
16.94	13	919.3230	919.3230	0.00	[M-2H] ⁻²	M8	1840.6606

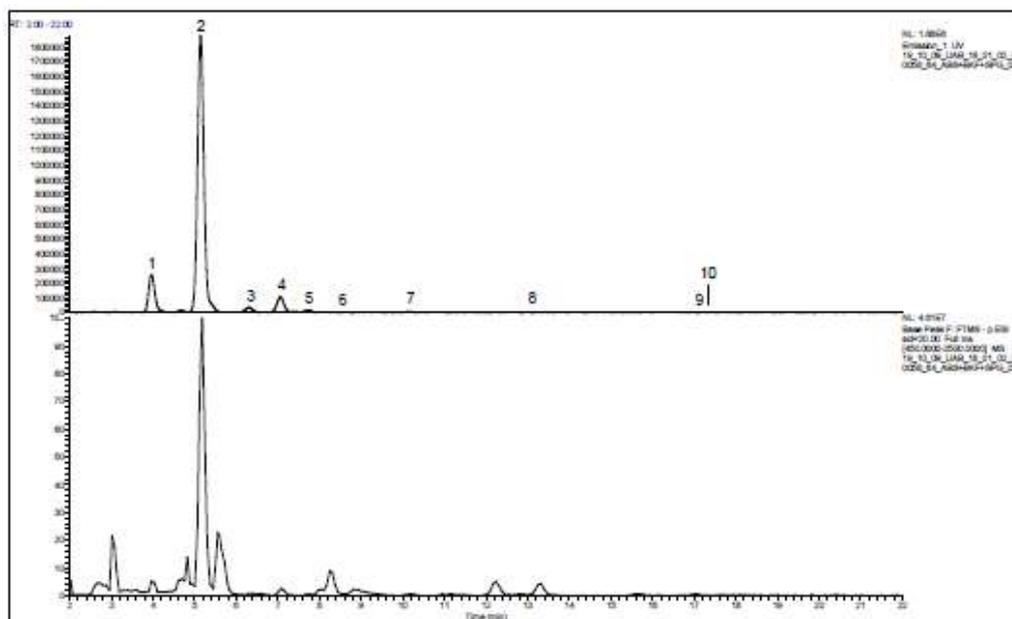


Figura 75. Cromatogramas y picos base para una muestra conjunta con los cuatro lotes de Xolair® digerida con ABS+BKF+SPG (HILIC-FLD-MS). ABS (Sialidasa de la *Athrobacter ureafaciens*), BKF (Fucosidasa bovina de riñón), SPG (Galactosidasa de *Streptococcus pneumonia*).

Tabla 68. Estructuras de N-glicanos propuestas a partir del análisis de la muestra conjunta con los cuatro lotes de Xolair® digerida con ABS+BKF+SPG (HILIC-FLD-MS). ABS (Sialidasa de la *Athrobacter ureafaciens*), BKF (Fucosidasa bovina de riñón), SPG (Galactosidasa de *Streptococcus pneumonia*).

T_R (min)	Pico _{UPLC}	Masa experimental (m/z)	Masa teórica (m/z)	Error (ppm)	Ión	Asignación	Masa Monoisotópica
3.95	1	1232.4650	1232.4686	2.92	$[M-H]^{-1}$	A1	1233.4759
		615.7290	615.7307	2.76	$[M-2H]^{-2}$		
5.14	2	717.2681	717.2704	3.21	$[M-H]^{-1}$	A2	1436.5553
		1435.5415	1435.548	4.53	$[M-2H]^{-2}$		
6.30	3	-	-	-	-	No asignado	-
7.05	4	1353.4937	1353.4949	0.89	$[M-H]^{-1}$	M5	1354.5022
		676.2436	676.2438	0.30	$[M-2H]^{-2}$		
		818.8101	818.8100	0.12	$[M-2H]^{-2}$	A3	1639.6346
		1638.6274	1638.6274	0.00	$[M-H]^{-1}$		
7.74	5	798.2979	798.2968	1.38	$[M-2H]^{-2}$	A2G1	1598.6081
		1597.6047	1597.6008	2.44	$[M-H]^{-1}$		
8.65	6	777.7831	777.7835	0.51	$[M-2H]^{-2}$	M5A1	1785.9626
10.14	7	757.2706	757.2702	0.53	$[M-2H]^{-2}$	M6	1516.550
13.72	8	838.2971	838.2966	0.60	$[M-2H]^{-2}$	M7	1678.6078
17.00	9	919.3226	919.3230	0.76	$[M-2H]^{-2}$	M8	1840.6606
17.42	10	919.3226	919.3230	0.44	$[M-2H]^{-2}$	M8	1840.6606

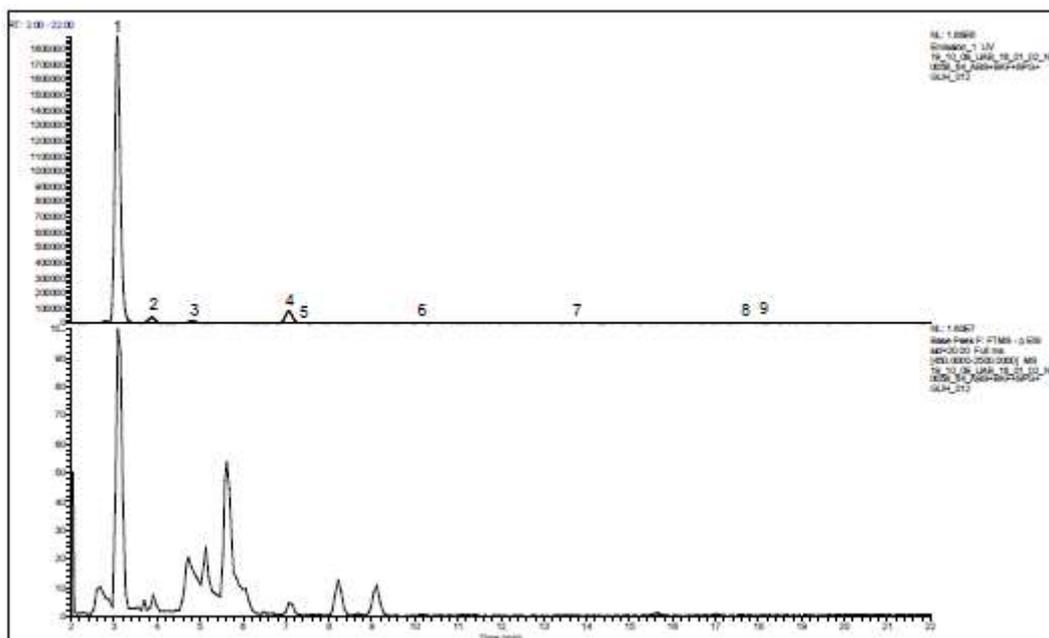


Figura 76. Cromatogramas y picos base para una muestra conjunta con los cuatro lotes de Xolair® digerida con ABS+BKF+SPG+GUH (HILIC-FLD-MS). ABS (Sialidasa de la *Athrobacter ureafaciens*), BKF (Fucosidasa bovina de riñón), GUH (Hexosaminidasa de *Streptococcus pneumonia*), SPG (Galactosidasa de *Streptococcus pneumonia*).

Tabla 69. Estructuras de N-glicanos propuestas a partir del análisis de la muestra conjunta con los cuatro lotes de Xolair® digerida con ABS+BKF+SPG+GUH (HILIC-FLD-MS). ABS (Sialidasa de la *Athrobacter ureafaciens*), BKF (Fucosidasa bovina de riñón), GUH (Hexosaminidasa de *Streptococcus pneumonia*), SPG (Galactosidasa de *Streptococcus pneumonia*).

T_R (min)	Pico _{UPLC}	Masa experimental (m/z)	Masa teórica (m/z)	Error (ppm)	Ión	Asignación	Masa Monoisotópica
3.07	1	1029.3860	1029.3893	3.21	$[M-H]^{-1}$	M3	1030.3965
3.88	2	-	-	-	-	No asignado	-
4.82	3	1191.4388	1191.4421	2.77	$[M-H]^{-1}$	M4	1192.4494
7.07	4	1353.4932	1353.4949	1.26	$[M-H]^{-1}$	M5	1354.5022
		676.2432	676.2438	0.89	$[M-2H]^{-2}$		
7.42	5	676.2443	676.2438	0.74	$[M-2H]^{-2}$	M5	1354.5022
10.15	6	757.2705	757.2702	0.40	$[M-2H]^{-2}$	M6	1516.550
13.83	7	838.2966	838.2966	0.00	$[M-2H]^{-2}$	M7	1678.6078
16.97	8	919.3226	919.3230	0.44	$[M-2H]^{-2}$	M8	1840.6606
17.48	9	919.3227	919.3230	0.33	$[M-2H]^{-2}$	M8	1840.6606

- **Para la versión veOMA**

Se realizaron digestiones con exoglicosidasas en la muestra de la versión de omalizumab veOMA y luego se analizaron mediante HILIC-FLD-MS. Los perfiles de fluorescencia de las digestiones se muestran en las figuras (**Figura 77, Figura 78, Figura 79 y Figura 80**). Las estructuras identificadas en el espectro MS tras la digestión se presentan en las tablas (**Tabla 70, Tabla 71, Tabla 72 y Tabla 73**).

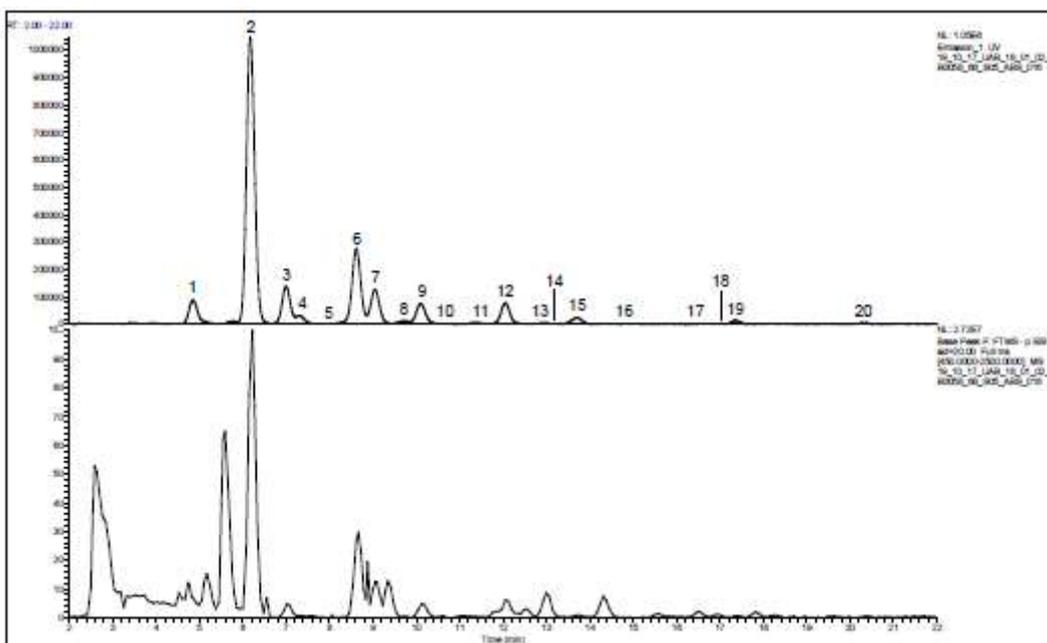


Figura 77. Cromatogramas y picos base para la versión veOMA digerida con ABS (HILIC-FLD-MS). ABS (Sialidasa de la *Athrobacter ureafaciens*).

Tabla 70. Estructuras de N-glicanos propuestas a partir del análisis de la versión veOMA digerida con ABS (HILIC-FLD-MS). ABS (Sialidasa de la *Athrobacter ureafaciens*).

T_R (min)	PiCOUPLC	Masa experimental (m/z)	Masa teórica (m/z)	Error (ppm)	Ión	Asignación	Masa Monoisotópica
4.85	1	1378.5243	1378.5265	1.60	[M-H] ⁻¹	FA1	1379.5338
		688.7590	688.7596	0.87	[M-2H] ⁻²		
6.17	2	1581.6029	1581.6059	1.90	[M-H] ⁻¹	FA2	1582.6132
		790.2982	790.2993	1.39	[M-2H] ⁻²		
7.00	3	1353.4965	1353.4949	1.18	[M-H] ⁻¹	M5	1354.5022
		676.2447	676.2438	1.33	[M-2H] ⁻²		
		769.7873	769.7860	1.69	[M-2H] ⁻²	FA1G1/FM4A1	1541.5866
		1540.5821	1540.5794	1.75	[M-H] ⁻¹		
7.30	4	769.7884	769.7860	3.12	[M-2H] ⁻²	FA1G1/M4A1	1541.5866
		1540.5721	1540.5794	1.75	[M-H] ⁻¹		
		891.8415	891.8390	2.80	[M-2H] ⁻²		
8.40	5	891.8414	891.8390	2.69	[M-2H] ⁻²	FA3	1785.6926
8.62	6	871.3254	871.3257	0.34	[M-2H] ⁻²	FA2G1	1744.6660
		1743.6560	1743.6587	1.55	[M-H] ⁻¹		
		777.7829	777.7835	0.77	[M-2H] ⁻²	M5A1	1557.5815
9.05	7	871.3558	871.3257	0.11	[M-2H] ⁻²	FA2G1	1744.6660
		1743.6570	1743.6587	0.97	[M-H] ⁻¹		
9.72	8	850.8144	850.8125	2.23	[M-2H] ⁻²	FM4A1G1/FM5A	1703.6395
		972.8689	972.8654	3.60	[M-2H] ⁻²	FA3G1	1947.7454
10.10	9	850.8140	850.8125	1.76	[M-2H] ⁻²	FM4A1G1/FM5A	1703.6395
		757.2716	757.2702	1.85	[M-2H] ⁻²	M6	1516.555
		972.8671	972.8654	1.75	[M-2H] ⁻²	FA3G1	1947.7454
10.79	10	972.8689	972.8654	3.60	[M-2H] ⁻²	FA3G1	1947.7454
11.37	11	972.8675	972.8654	2.16	[M-2H] ⁻²	FA3G1	1947.7454
		944.3577	1016.8734	3.18	[M-2H] ⁻²	FA2G1S1	2035.7614
12.05	12	952.3525	952.3521	0.42	[M-2H] ⁻²	FA2G2	1906.7188
		1905.7104	1905.7116	0.63	[M-H] ⁻¹		
12.92	13	923.8420	923.8414	0.65	[M-2H] ⁻²	FM4A1G1F1	1849.6974
13.09	14	931.8399	931.8389	1.07	[M-2H] ⁻²	FM5A1G1	1865.6923
13.70	15	838.2985	838.2966	2.27	[M-2H] ⁻²	M7	1678.6078
		931.8408	931.8389	2.04	[M-2H] ⁻²	FM5A1G1	1865.6923
14.82	16	1025.3848	1025.3811	3.61	[M-2H] ⁻²	FAG2F1	2052.7767
16.57	17	1004.8705	1004.8678	2.69	[M-2H] ⁻²	FM5A1G1F1	2011.7502
16.94	18	919.3252	919.3230	2.39	[M-2H] ⁻²	M8	1840.6606
17.35	19	919.3258	919.3230	3.05	[M-2H] ⁻²	M8	1840.6606
20.32	20	1000.3525	1000.3495	3.00	[M-2H] ⁻²	M9	2002.7135

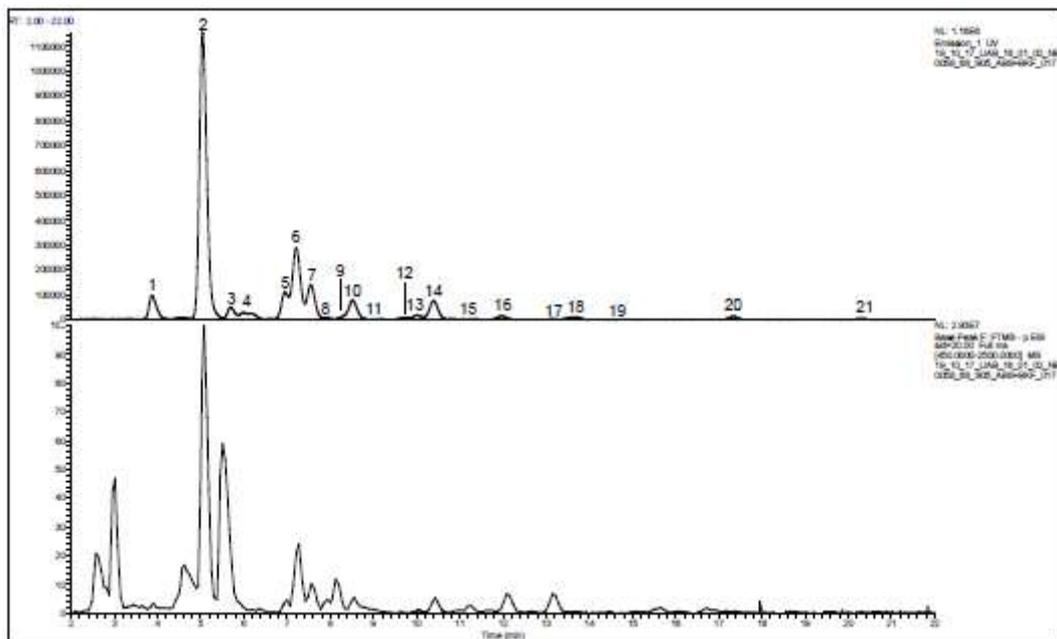


Figura 78. Cromatogramas y picos base para la versión veOMA digerida con ABS+BKF (HILIC-FLD-MS). ABS (Sialidasa de la *Athrobacter ureafaciens*), BKF (Fucosidasa bovina de riñón).

Tabla 71. Estructuras de N-glicanos propuestas a partir del análisis de la versión veOMA digerida con ABS+BKF (HILIC-FLD-MS). ABS (*Sialidasa de la Athrobacter ureafaciens*), BKF (*Fucosidasa bovina de riñón*).

T_R (min)	Pico _{UPLC}	Masa experimental (m/z)	Masa teórica (m/z)	Error (ppm)	Ión	Asignación	Masa Monoisotópica
3.87	1	1232.4688	1232.4686	0.16	[M-H] ⁻¹	A1	1233.4759
		615.7305	615.7307	0.32	[M-2H] ⁻²		
5.04	2	717.2691	717.2704	1.81	[M-H] ⁻¹	A2	1436.5553
		1435.5448	1435.548	2.23	[M-2H] ⁻²		
5.69	3	-	-	-	-	No asignado	-
6.00	4	818.8108	818.8100	0.98	[M-2H] ⁻²	A3	1639.6346
6.95	5	1353.4967	1353.4949	1.33	[M-H] ⁻¹	M5	1354.5022
		676.2446	676.2438	1.18	[M-2H] ⁻²		
		818.8112	818.8100	1.47	[M-2H] ⁻²		
7.22	6	798.2967	798.3968	0.13	[M-2H] ⁻²	A2G1	1598.6081
		1597.5992	1597.6008	1.00	[M-H] ⁻¹		
7.55	7	798.2975	798.2968	0.88	[M-2H] ⁻²	A2G1	1598.6081
		1597.6013	1597.6008	0.31	[M-H] ⁻¹		
7.90	8	777.7536	777.7835	0.13	[M-2H] ⁻²	M5A1/M4A1G1	1557.5815
8.28	9	899.8374	899.8365	1.00	[M-2H] ⁻²	A3G1	1801.6875
8.52	10	777.7845	777.7835	1.29	[M-2H] ⁻²	M5A1/M4A1G1	1557.5815
		1556.5755	1556.5743	0.77	[M-H] ⁻¹		
9.12	11	899.8381	899.8365	1.78	[M-2H] ⁻²	A3G1	1801.6875
9.77	12	899.8392	899.8365	3.00	[M-2H] ⁻²	A3G1	1801.6875
		871.3285	871.3257	3.21	[M-2H] ⁻²	A2G1F1	1744.6660
10.02	13	757.2726	757.2702	3.17	[M-2H] ⁻²	M6	1516.555
10.40	14	879.3247	879.3232	1.71	[M-2H] ⁻²	A2G2	1760.6609
		1759.6569	1759.6536	1.88	[M-H] ⁻¹		
11.32	15	858.8117	858.8099	2.10	[M-2H] ⁻²	M5A1G1	1719.6344
		850.8138	850.8125	1.53	[M-2H] ⁻²	M4A1G1F1	1703.6395
11.97	16	858.8101	858.8099	0.47	[M-2H] ⁻²	M5A1G1	1719.6344
		1718.6280	1718.6271	0.52	[M-H] ⁻¹		
13.15	17	952.3528	952.3521	0.74	[M-2H] ⁻²	A2G2F1	1906.7188
13.67	18	838.2991	838.2966	2.98	[M-2H] ⁻²	M7	1678.6078
14.80	19	931.8414	931.8389	2.68	[M-2H] ⁻²	M5A1G1F1	1865.6923
17.34	20	919.3254	919.3230	2.61	[M-2H] ⁻²	M8	1840.6606
20.30	21	1000.3525	1000.3495	3.00	[M-2H] ⁻²	M9	2002.7135

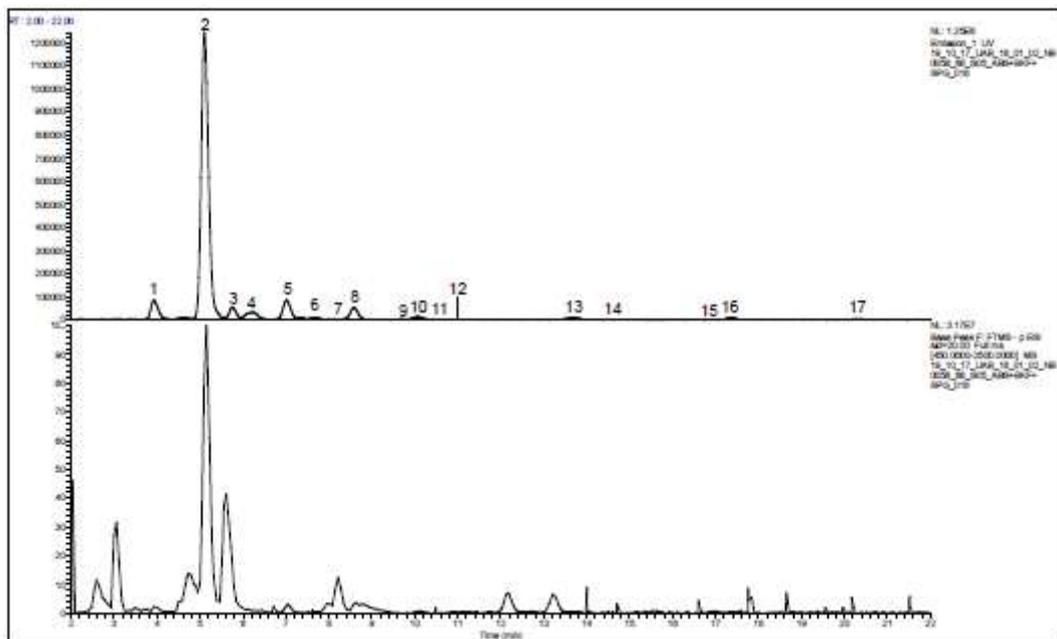


Figura 79. Cromatogramas y picos base para la versión veOMA digerida con ABS+BKF+SPG (HILIC-FLD-MS). ABS (Sialidasa de la *Athrobacter ureafaciens*), BKF (Fucosidasa bovina de riñón), SPG (Galactosidasa de *Streptococcus pneumoniae*).

Tabla 72. Estructuras de N-glicanos propuestas a partir del análisis de la versión veOMA digerida con ABS+BKF+SPG (HILIC-FLD-MS). ABS (Sialidasa de la *Athrobacter ureafaciens*), BKF (Fucosidasa bovina de riñón), SPG (Galactosidasa de *Streptococcus pneumoniae*).

T_R (min)	Pico _{UPLC}	Masa experimental (m/z)	Masa teórica (m/z)	Error (ppm)	Ión	Asignación	Masa Monoisotópica
3.92	1	1232.4698	1232.4686	0.97	[M-H] ⁻¹	A1	1233.4759
		615.7309	615.7307	0.32	[M-2H] ⁻²		
5.10	2	717.2691	717.2704	1.81	[M-H] ⁻¹	A2	1436.5553
		1435.5450	1435.548	2.09	[M-2H] ⁻²		
5.75	3	-	-	-	-	No asignado	-
6.24	4	818.8111	818.8100	1.34	[M-2H] ⁻²	A3	1639.6346
		1638.6290	1638.6274	0.98	[M-H] ⁻¹		
7.02	5	1353.4976	1353.4949	1.99	[M-H] ⁻¹	M5	1354.5022
		676.2450	676.2438	1.77	[M-2H] ⁻²		
		818.8119	818.8100	2.32	[M-2H] ⁻²	A3	1639.6346
		1638.6317	1638.6274	2.62	[M-H] ⁻¹		
		798.2995	798.2968	3.38	[M-2H] ⁻²	A2G1	
7.67	6	798.2990	798.2968	2.76	[M-2H] ⁻²	A2G1	1598.6081
8.04	7	777.7836	777.7835	0.13	[M-2H] ⁻²	M5A1	1557.5815
8.59	8	777.7839	777.7835	0.51	[M-2H] ⁻²	M5A1	1557.5815
		1556.5737	1556.5743	0.39	[M-H] ⁻¹		
9.84	9	871.3288	871.3257	3.56	[M-2H] ⁻²	A2G1F1	1744.6660
10.07	10	757.2727	757.2702	3.30	[M-2H] ⁻²	M6	1516.555
		1515.5521	1515.5477	2.82	[M-H] ⁻¹		
10.45	11	879.3247	879.3232	2.84	[M-2H] ⁻²	A2G2	1760.6609
11.14	12	850.8149	850.8125	2.88	[M-2H] ⁻²	M4A1G1F1	1703.6395
13.70	13	838.2991	838.2966	2.98	[M-2H] ⁻²	M7	1678.6078
		1677.6060	1677.6005	3.28	[M-H] ⁻¹		
14.87	14	931.8422	931.8389	3.54	[M-2H] ⁻²	M5A1G1F1	1865.6923
16.97	15	919.3256	919.3230	2.83	[M-2H] ⁻²	M8	1840.6606
17.37	16	919.3256	919.3230	2.83	[M-2H] ⁻²	M8	1840.6606
20.30	17	1000.3527	1000.3495	3.20	[M-2H] ⁻²	M9	2002.7135

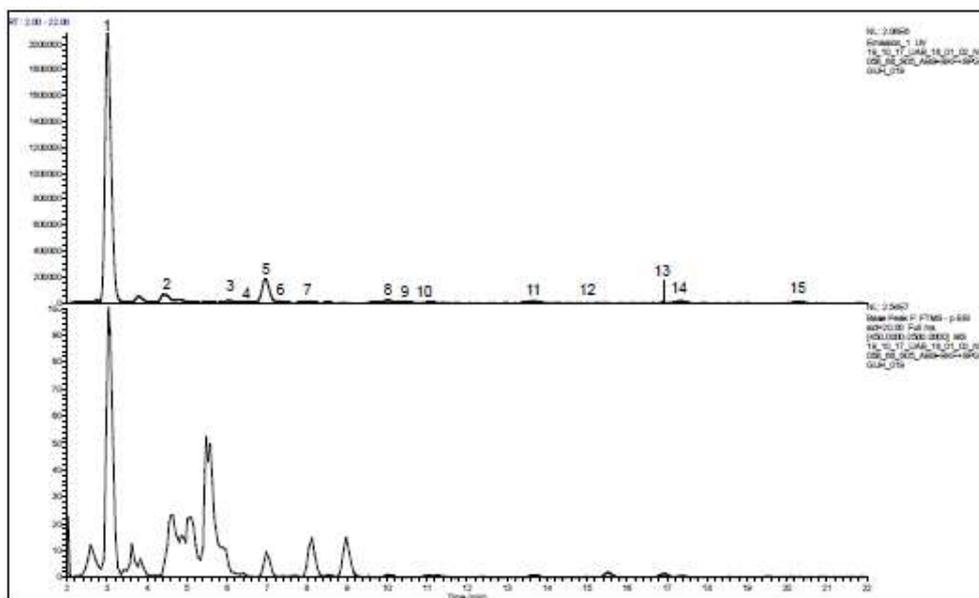


Figura 80. Cromatogramas y picos base para la versión veOMA digerida con ABS+BKF+SPG+GUH (HILIC-FLD-MS). ABS (Sialidasa de la *Athrobacter ureafaciens*), BKF (Fucosidasa bovina de riñón), GUH (Hexosaminidasa de *Streptococcus pneumoniae*), SPG (Galactosidasa de *Streptococcus pneumoniae*).

Tabla 73. Estructuras propuestas de la versión veOMA digerida con ABS+BKF+SPG+GUH (HILIC-FLD-MS). ABS (Sialidasa de la *Athrobacter ureafaciens*), BKF (Fucosidasa bovina de riñón), GUH (Hexosaminidasa de *Streptococcus pneumoniae*), SPG (Galactosidasa de *Streptococcus pneumoniae*).

T_R (min)	Pico _{UPLC}	Masa experimental (m/z)	Masa teórica (m/z)	Error (ppm)	Ión	Asignación	Masa Monoisotópica
3.02	1	1029.3881	1029.3893	1.17	[M-H] ⁻¹	M3	1030.3965
4.42	2	1191.4412	1191.4421	0.76	[M-H] ⁻¹	M4	1192.4494
6.05	3	818.8105	818.8100	0.61	[M-2H] ⁻²	A3	1639.6346
6.42	4	676.2453	676.2438	2.22	[M-2H] ⁻²	M5	1354.5022
		1353.4985	1353.4949	2.66	[M-H] ⁻¹		
6.95	5	1353.4957	1353.4949	0.59	[M-H] ⁻¹	M5	1354.5022
		676.2439	676.2438	0.15	[M-2H] ⁻²		
7.30	6	676.2452	676.2438	2.07	[M-2H] ⁻²	M5	1354.5022
7.99	7	769.7868	769.7860	1.04	[M-2H] ⁻²	A1G1F1	1541.5866
10.02	8	757.2726	757.2702	3.17	[M-2H] ⁻²	M6	1516.555
10.47	9	879.3258	879.3232	2.96	[M-2H] ⁻²	A2G2	1760.6609
11.09	10	850.8138	850.8125	1.53	[M-2H] ⁻²	M4A1G1F1	1703.6395
13.69	11	838.2987	838.2966	2.51	[M-2H] ⁻²	M7	1678.6078
14.79	12	931.8417	931.8389	3.00	[M-2H] ⁻²	M5A1G1F1	1865.6923
16.90	13	919.3247	919.3230	1.85	[M-2H] ⁻²	M8	1840.6606
17.35	14	919.3253	919.3230	2.50	[M-2H] ⁻²	M8	1840.6606
20.29	15	1000.3521	1000.3495	2.60	[M-2H] ⁻²	M9	2002.7135

8.2. Anexo 2. Imágenes cristales de las placas de cribado

- Placa Index™

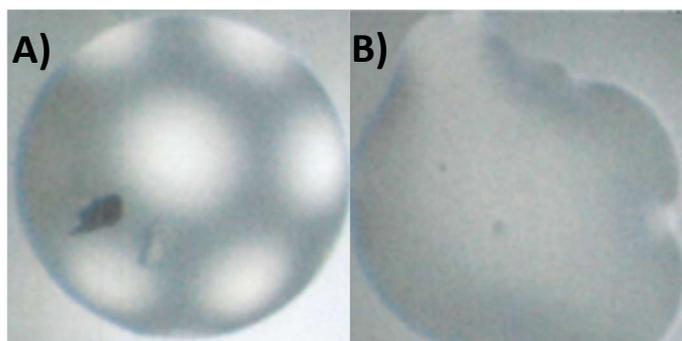


Figura 81. Gotas con cristales obtenidos en la placa de cribado Index™. Ambas condiciones corresponden a la condición 0.1M Tris p 8.5, 0.3M formato de magnesio dihidratado) pero distinta concentración proteica **(a)** 20mg/mL y **(b)** 10mg/mL.

- Placa JCSG-plus™

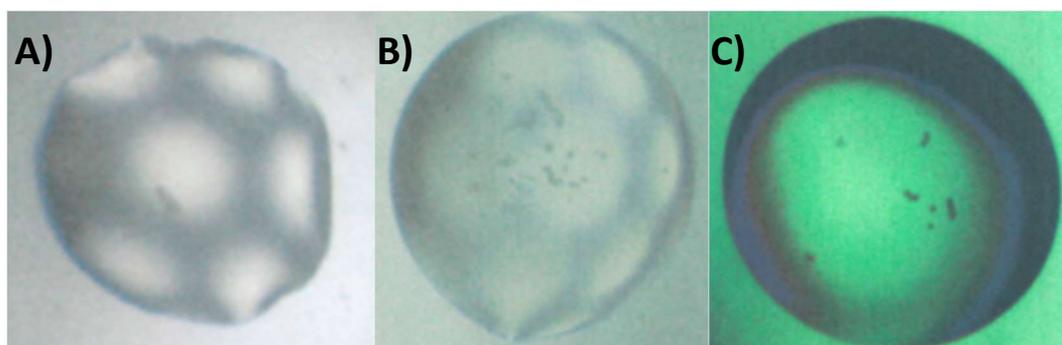


Figura 82. Gotas con cristales obtenidos en la placa de cribado JCSG-plus™ para la concentración proteica 20mg/mL. **(a)** Condición 0.1M Bicina pH 9.0, 10% w/v PEG 20000, 2% v/v 1,4-dioxano, **(b)** condición 0.1M Fosfato Sódico/Potásico pH 6.2, 25% v/v 1,2-Propandiol, 10% v/v Glicerol y **(c)** condición 1M Fosfato amónico dibásico, 0.1M Acetato sódico pH 4.5.

- Placa Structure Screen 1 + 2 HT-96

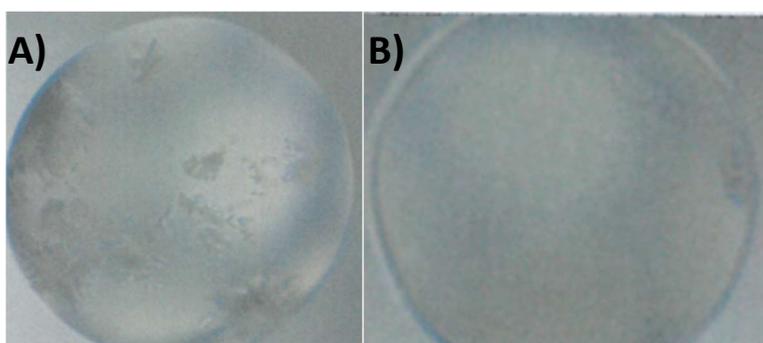


Figura 83. Gotas con cristales obtenidos en la placa de cribado Structure para la concentración proteica 20mg/mL. **(a)** Pocillo D3 (Condición 2.0M Fosfato amónico monobásico, 0.1M Tris pH 8.5) y **(b)** pocillo E3 (Condición 0.1M Bicina pH 9.0, 10% w/v PEG 20000, 2% v/v 1,4-Dioxano).

8.3. Anexo 3. Estadísticas de la colección de los cristales de Fab

Tabla 74. Estadísticas de la colección de los datos para forma cristalina OF. Condición: 1.8M Sulfato de amonio, 0.08M Tris, pH 8.5, 18% glicerol, Codificación: B5X7, Grupo espacial: P212121, Parámetros de la celda cristalina promedios $a = 64.71$ $b = 73.46$ $c = 141.17$ 90.00 90.00 90.00 .

	General	Estructura interior	Estructura exterior
Límite de baja resolución	70.58	70.58	2.09
Límite de alta resolución	1.98	6.27	1.98
R_{merge}	0.095	0.034	0.721
R_{merge} in top intensity bin	0.041	-	-
R_{meas} (dentro I+/I-)	0.108	0.039	0.819
R_{meas} (todo I+ & I-)	0.108	0.039	0.819
R_{pim} (dentro I+/I-)	0.050	0.018	0.378
R_{pim} (todo I+ & I-)	0.050	0.018	0.378
Sesgo parcial fraccional	0.004	0.012	-0.033
Observaciones totales	203917	6782	28983
Total number unique	47213	1651	6798
Media ((I)/sd (I))	7.7	19.6	1.8
Mn (I) correlación de medio conjunto CC (1/2)	0.996	0.998	0.662
Compleitud	99.7	99.3	99.6
Multiplicidad	4.3	4.1	4.3

Tabla 75. Estadísticas de la colección de los datos para forma cristalina MF. Condición: 1.8M Sulfato de amonio, 0.08M Acetato de sodio, pH 4.6, 18% glicerol, Codificación: B5X1_collection1_1, Grupo espacial: P21, Parámetros de la celda cristalina promedios $a = 64.29$ $b = 139.63$ $c = 73.54$ 90.00 92.84 90.00 .

	General	Estructura interior	Estructura exterior
Límite de baja resolución	73.45	73.45	2.00
Límite de alta resolución	1.90	6.01	1.90
R_{merge}	0.109	0.045	1.250
R_{merge} in top intensity bin	0.058	-	-
R_{meas} (dentro I+/I-)	0.133	0.054	1.527
R_{meas} (todo I+ & I-)	0.133	0.054	1.527
R_{pim} (dentro I+/I-)	0.074	0.030	0.866
R_{pim} (todo I+ & I-)	0.074	0.030	0.866
Sesgo parcial fraccional	0.002	-0.003	0.028
Observaciones totales	305217	10275	43201
Observaciones únicas totales	101348	3290	14744
Media ((I)/sd (I))	4.5	11.5	0.8
Mn (I) correlación de medio conjunto CC (1/2)	0.992	0.995	0.240
Compleitud	99.5	99.6	99.4
Multiplicidad	3.0	3.1	2.9

8.4. Anexo 4. Tablas resumen con los resultados de SPR

Tabla 76. Tabla resumen con los resultados obtenidos de la variante vaOMA mediante la técnica SPR. Se presentan los valores (valores crudos (R.D.) y normalizados (Norm.)) de las constantes calculadas por el software BiaEval 1.1. en los diferentes chips utilizados. Se muestran la media de los valores (Mean), la desviación estándar (DS) y el coeficiente de variación (%RSD). Datos del chip 1 (fondo amarillo) y datos del chip 2 (fondo gris). k_a (Constante de asociación), k_d (Constante de disociación), K_D (Constante de afinidad).

	Cinética						Afinidad	
	k_a (1/Ms)		k_d (1/s)		K_D (nM)		K_D (nM)	
	R.D.	Norm.	R.D.	Norm.	R.D.	Norm.	R.D.	Norm.
vaOMA	$1,28 \cdot 10^6$	$1,49 \cdot 10^6$	$4,37 \cdot 10^{-3}$	$4,21 \cdot 10^{-3}$	3,41	2,83	6,39	7,24
	$1,48 \cdot 10^6$	$1,48 \cdot 10^6$	$4,94 \cdot 10^{-3}$	$4,94 \cdot 10^{-3}$	3,33	3,33	6,85	6,85
	$1,50 \cdot 10^6$	$1,50 \cdot 10^6$	$3,72 \cdot 10^{-3}$	$3,72 \cdot 10^{-3}$	2,48	2,48	6,30	6,30
	$1,49 \cdot 10^6$	$1,49 \cdot 10^6$	$3,61 \cdot 10^{-3}$	$3,61 \cdot 10^{-3}$	2,43	2,43	6,25	6,25
Media	$1,44 \cdot 10^6$	$1,49 \cdot 10^6$	$4,16 \cdot 10^{-3}$	$4,12 \cdot 10^{-3}$	2,91	2,77	6,45	6,66
DS	$1,05 \cdot 10^5$	$8,19 \cdot 10^3$	$6,19 \cdot 10^{-4}$	$6,06 \cdot 10^{-4}$	0,53	0,42	0,28	0,48
RSD (%)	7,33%	0,55%	14,87%	14,70%	18,19%	15,00%	4,30%	7,15%

Tabla 77. Tablas resumen de los resultados obtenidos de la versión de veOMA mediante la técnica SPR: (a) Lote 1 y (b) Lote 2. Se presentan los valores (valores crudos (R.D.) y normalizados (Norm.)) de las constantes calculadas por el software BiaEval 1.1. en los diferentes chips utilizados. En la tabla se muestran también la media de los valores (Mean), la desviación estándar (DS) y el coeficiente de variación (%RSD). Datos del chip 3 (fondo naranja) y datos del chip 4 (fondo verde). k_a (Constante de asociación), k_d (Constante de disociación), K_D (Constante de afinidad).

A)	Cinética						Afinidad	
	k_a (1/Ms)		k_d (1/s)		K_D (nM)		K_D (nM)	
	R.D.	Norm.	R.D.	Norm.	R.D.	Norm.	R.D.	Norm.
veOMA (Lote 1)	$2,88 \cdot 10^6$	$2,18 \cdot 10^6$	$2,73 \cdot 10^{-3}$	$2,86 \cdot 10^{-3}$	0,95	1,32	3,08	4,05
	$2,68 \cdot 10^6$	$2,03 \cdot 10^6$	$1,81 \cdot 10^{-3}$	$1,90 \cdot 10^{-3}$	0,68	0,94	1,87	2,46
	$3,00 \cdot 10^6$	$2,28 \cdot 10^6$	$1,79 \cdot 10^{-3}$	$1,88 \cdot 10^{-3}$	0,60	0,83	1,60	2,10
	$3,04 \cdot 10^5$	$2,75 \cdot 10^6$	$1,89 \cdot 10^{-3}$	$1,80 \cdot 10^{-3}$	6,21	0,64	25,31	2,17
	$3,31 \cdot 10^5$	$2,99 \cdot 10^6$	$2,51 \cdot 10^{-3}$	$2,40 \cdot 10^{-3}$	7,59	0,78	26,29	2,25
	$2,35 \cdot 10^5$	$2,13 \cdot 10^6$	$2,33 \cdot 10^{-3}$	$2,23 \cdot 10^{-3}$	9,92	1,01	32,74	2,81
	$3,40 \cdot 10^6$	$3,07 \cdot 10^6$	$2,46 \cdot 10^{-3}$	$2,35 \cdot 10^{-3}$	7,24	0,74	25,80	2,21
Media	$1,39 \cdot 10^6$	$2,49 \cdot 10^6$	$2,22 \cdot 10^{-3}$	$2,20 \cdot 10^{-3}$	4,74	0,89	16,67	2,58
DS	$1,37 \cdot 10^6$	$4,36 \cdot 10^5$	$3,81 \cdot 10^{-4}$	$3,76 \cdot 10^{-4}$	3,90	0,23	13,78	0,69
RSD (%)	97,96%	17,52%	17,20%	17,08%	82,34%	25,24%	82,68%	26,78%

B)	Cinética						Afinidad	
	k_a (1/Ms)		k_d (1/s)		K_D (nM)		K_D (nM)	
	R.D.	Norm.	R.D.	Norm.	R.D.	Norm.	R.D.	Norm.
veOMA (Lote 2)	3,01·10 ⁵	2,72·10 ⁶	1,79·10 ⁻³	1,71·10 ⁻³	5,94	0,61	19,79	1,70
	3,37·10 ⁵	3,05·10 ⁶	3,19·10 ⁻³	3,06·10 ⁻³	9,47	0,97	27,16	2,33
	2,45·10 ⁵	2,22·10 ⁶	2,48·10 ⁻³	2,37·10 ⁻³	10,11	1,03	30,43	2,61
	3,97·10 ⁵	3,59·10 ⁶	2,87·10 ⁻³	2,75·10 ⁻³	7,23	0,74	25,39	2,18
Media	3,20·10⁵	2,90·10⁶	2,58·10⁻³	2,47·10⁻³	8,19	0,84	25,69	2,20
DS	6,36·10⁴	5,76·10⁵	6,05·10⁻⁴	5,79·10⁻⁴	1,94	0,20	4,45	0,38
RSD (%)	19,89%	19,89%	23,43%	23,43%	23,71%	23,71%	17,34%	17,34%

Tabla 78. Tabla resumen de los resultados obtenidos al analizar diferentes lotes de Xolair® mediante la técnica SPR. **(a)** Resultados del lote S010203, **(b)** lote AVXS011303 y **(c)** lote AVXS223003. Se presentan los valores (valores crudos (R.D.) y normalizados (Norm.)) de las constantes calculadas por el software BiaEval 1.1. en los diferentes chips utilizados. En la tabla se muestran también la media de los valores (Mean), la desviación estándar (DS) y el coeficiente de variación (%RSD). Datos del chip 1 (fondo amarillo), datos del chip 2 (fondo gris), datos del chip 3 (fondo naranja) y datos del chip 4 (fondo verde). k_a (Constante de asociación), k_d (Constante de disociación), K_D (Constante de afinidad).

A)	Cinética						Afinidad	
	k_a (1/Ms)		k_d (1/s)		K_D (nM)		K_D (nM)	
	R.D.	Norm.	R.D.	Norm.	R.D.	Norm.	R.D.	Norm.
Xolair® Lote S010203	2,12·10 ⁶	2,47·10 ⁶	2,40·10 ⁻³	2,31·10 ⁻³	1,13	0,94	2,33	2,64
	2,38·10 ⁶	2,38·10 ⁶	2,76·10 ⁻³	2,76·10 ⁻³	1,16	1,16	2,86	2,86
	2,53·10 ⁶	2,53·10 ⁶	2,12·10 ⁻³	2,12·10 ⁻³	0,84	0,84	2,58	2,58
	2,50·10 ⁶	2,50·10 ⁶	2,06·10 ⁻³	2,06·10 ⁻³	0,82	0,82	2,49	2,49
Media	2,38·10⁶	2,47·10⁶	2,34·10⁻³	2,31·10⁻³	0,99	0,94	2,56	2,64
DS	1,87·10⁵	6,48·10⁴	3,20·10⁻⁴	3,17·10⁻⁴	0,18	0,16	0,22	0,16
RSD (%)	7,83%	2,62%	13,69%	13,69%	18,54%	16,62%	8,64%	5,96%

B)	Cinética						Afinidad	
	k_a (1/Ms)		k_d (1/s)		K_D (nM)		K_D (nM)	
	R.D.	Norm.	R.D.	Norm.	R.D.	Norm.	R.D.	Norm.
Xolair® Lote AVXS011303	3,07·10 ⁶	2,33·10 ⁶	2,39·10 ⁻³	2,51·10 ⁻³	0,78	1,08	2,37	3,12
	2,63·10 ⁶	2,00·10 ⁶	1,95·10 ⁻³	2,04·10 ⁻³	0,74	1,03	2,15	2,83
	2,92·10 ⁶	2,21·10 ⁶	1,91·10 ⁻³	2,01·10 ⁻³	0,66	0,91	1,88	2,47
Media	2,87·10⁶	2,18·10⁶	2,08·10⁻³	2,19·10⁻³	0,72	1,01	2,13	2,80
DS	2,22·10⁵	1,69·10⁵	2,66·10⁻⁴	2,79·10⁻⁴	0,06	0,09	0,25	0,33
RSD (%)	7,74%	7,74%	12,76%	12,76%	8,65%	8,65%	11,64%	11,64%

C)	Cinética						Afinidad	
	k_a (1/Ms)		k_d (1/s)		K_D (nM)		K_D (nM)	
	R.D.	Norm.	R.D.	Norm.	R.D.	Norm.	R.D.	Norm.
Xolair® Lote AVXS223003	2,21·10 ⁶	2,21·10 ⁶	2,73·10 ⁻³	2,73·10 ⁻³	1,24	1,24	2,92	2,92
	2,37·10 ⁶	2,37·10 ⁶	2,14·10 ⁻³	2,14·10 ⁻³	0,90	0,90	2,60	2,60
	2,34·10 ⁶	2,34·10 ⁶	2,08·10 ⁻³	2,08·10 ⁻³	0,89	0,89	2,55	2,55
	3,24·10 ⁶	2,46·10 ⁶	2,49·10 ⁻³	2,61·10 ⁻³	0,77	1,07	2,40	3,15
	2,80·10 ⁶	2,12·10 ⁶	2,09·10 ⁻³	2,20·10 ⁻³	0,75	1,04	2,00	2,63
	3,08·10 ⁶	2,34·10 ⁶	2,04·10 ⁻³	2,14·10 ⁻³	0,66	0,92	1,74	2,29
	1,98·10 ⁶	1,79·10 ⁶	2,53·10 ⁻³	2,42·10 ⁻³	12,76	1,31	30,90	2,65
	2,62·10 ⁵	2,37·10 ⁶	2,40·10 ⁻³	2,30·10 ⁻³	9,18	0,94	30,11	2,58
	2,29·10 ⁵	2,07·10 ⁶	2,32·10 ⁻³	2,22·10 ⁻³	10,17	1,04	35,91	3,08
	3,32·10 ⁵	3,00·10 ⁶	2,43·10 ⁻³	2,33·10 ⁻³	7,35	0,75	28,48	2,44
Media	1,71·10⁶	2,31·10⁶	2,33·10⁻³	2,32·10⁻³	4,47	1,01	13,96	2,69
DS	1,29·10⁶	3,12·10⁵	2,30·10⁻⁴	2,13·10⁻⁴	4,83	0,17	15,08	0,28
RSD (%)	75,60%	13,54%	9,90%	9,20%	108,09%	16,59%	108,05%	10,23%

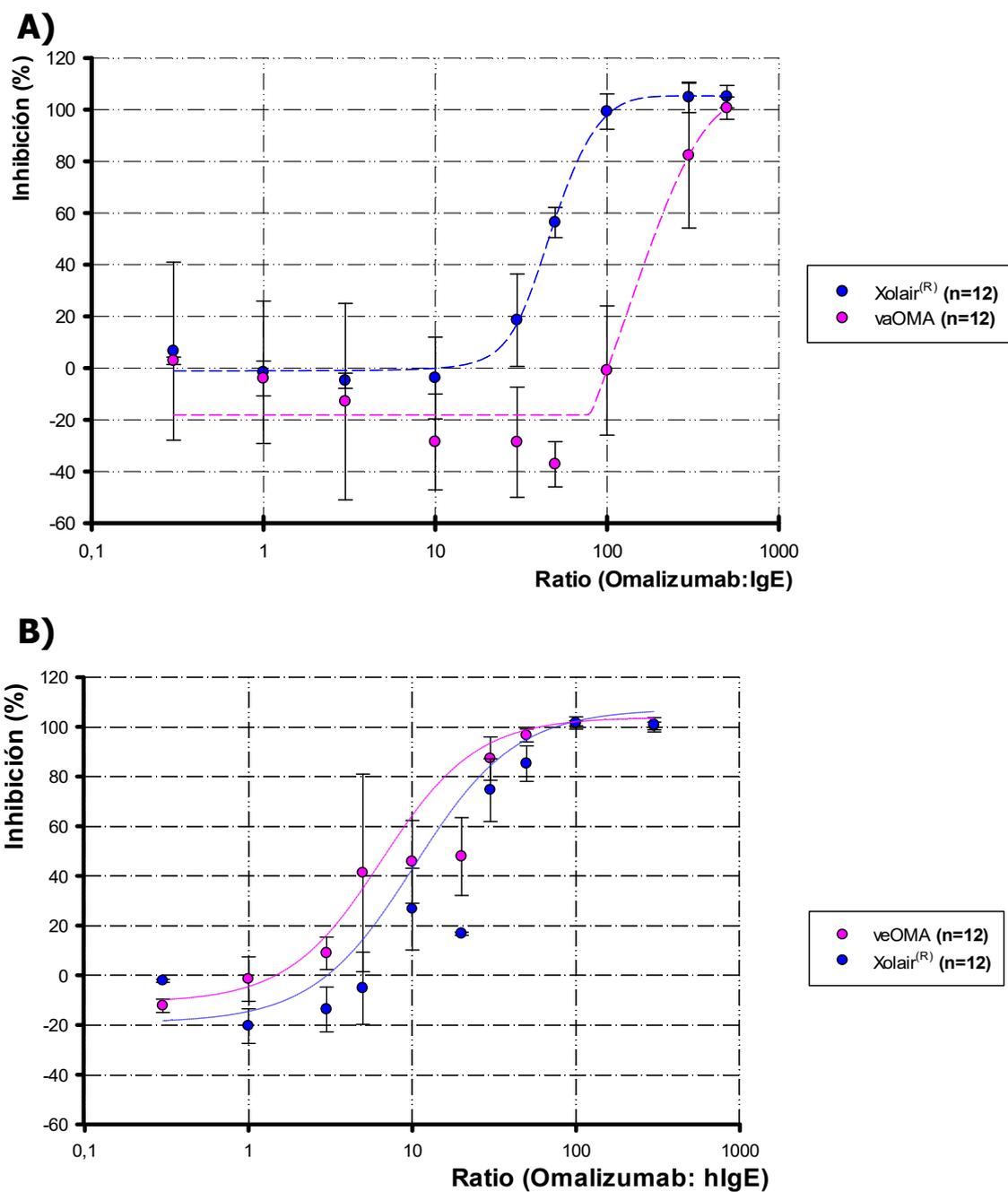
8.5. Anexo 5. Comparación de la actividad *in vitro* en células RS-ATL8

Figura 84. Comparación de la inhibición (%) dosis-dependiente de la liberación de β -hexosaminidasa de diferentes versiones/variantes de omalizumab en células RS-ATL8. **(a)** Comparación entre Xolair[®] y vaOMA, y **(b)** entre Xolair[®] y veOMA. Se representa el efecto inhibitorio en función de la dosis administrada representada por ratio (Cantidad de omalizumab partido cantidad de IgE administrados). Las curvas corresponden a un ajuste sigmoideal logístico realizado por el software SigmaPlot v14.0. Se representan los resultados de 3 experimentos donde cada condición se evaluó por cuadruplicado. Se expresa la media \pm SEM. hIgE: Inmunoglobulina E humana.

