

GUÍA PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE LA DISPOSICIÓN ANMAT N° 9943/19: ESPECIALIDADES MEDICINALES NANOFARMACÉUTICAS, DOXORRUBICINA LIPOSOMAL

Guidelines for the implementation of ANMAT Provision N° 9943/19: nanopharmaceutical products, liposomal doxorubicin

Yanina I. Rodriguez*, Ana Laura Canil*, Paola Carvalho*, María Victoria Cid*, Laura Cladouchos*, Verónica Llauro*, Ana Laura Rinaldi*, Nadia Villar*, Matías Gómez*.

Dirección de Fiscalización y Gestión de Riesgo, Instituto Nacional de Medicamentos, Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, Buenos Aires, Argentina.

Contacto: yrodriguez@anmat.gov.ar

**Todos los autores contribuyeron equitativamente al desarrollo de este trabajo.*

Recibido: 9 de noviembre de 2020. Aprobado: 27 de noviembre de 2020.

RESUMEN

El uso de liposomas como sistemas de administración de fármacos ha visto un gran desarrollo en las últimas décadas. En el caso particular de la doxorubicina, su encapsulación dentro de estas vesículas lipídicas permite reducir sus efectos tóxicos manteniendo su eficacia terapéutica. Debido a su complejidad, cambios en el método de elaboración, en la composición o en la calidad de la materia prima del producto pueden conducir a variaciones considerables en las propiedades fisicoquímicas y en la eficacia de la formulación liposomal. Por lo tanto, la caracterización de estos productos requiere de una exhaustiva evaluación de sus parámetros fisicoquímicos, farmacotécnicos y microbiológicos, junto con la inclusión de ensayos preclínicos que permitan estudiar la farmacocinética, farmacodinamia y toxicidad del producto. Es por tanto, el objetivo de este trabajo proveer una visión regulatoria acerca de las principales características que se deben evaluar para el registro de productos de doxorubicina liposomal nanosimilar.

Palabras clave: nanosimilar, sistemas de administración de fármacos, formulación liposomal, doxorubicina.

ABSTRACT

The use of liposomes as drug delivery systems has seen a great development in the last decades. In the particular case of doxorubicin, its encapsulation inside lipidic vesicles allows a reduction in its toxic effects while maintaining its therapeutic efficacy. Due to their complexity, changes in the elaboration method, in the composition, or in the quality of the raw materials of these products can lead to significant variations in the physicochemical properties and in the efficacy of the liposomal formulation. Therefore, the characterization of these products requires an exhaustive evaluation of their physicochemical, pharmacotechnical and microbiological parameters, including preclinical trials for the study of the products' pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicity. Thus, the objective of this article is to provide a regulatory vision about the main characteristics that must be evaluated for the registry of liposomal doxorubicin nanosimilar products.

Keywords: nanosimilar, drug delivery systems, liposomal formulation, doxorubicin.

INTRODUCCIÓN

El avance en el campo de la nanotecnología ha tenido un gran impacto en diversas áreas tales como la industria alimentaria^[1], la industria textil^[2] y el desarrollo de dispositivos y sistemas de diagnóstico^[3,4]. En particular, en el campo de la medicina, diversos nanomateriales han sido investigados para su uso como sistemas de transporte y liberación de fármacos^[5-7]. Entre ellos, los liposomas han sido destacados debido a características como su biodegradabilidad y no toxicidad, su flexibilidad, su capacidad de transportar tanto sustancias hidrofílicas como lipofílicas, y su capacidad de proteger a la droga encapsulada, disminuyendo sus efectos adversos^[8].

Los liposomas se describen clásicamente como vesículas generadas artificialmente, compuestas por una o más bicapas lipídicas concéntricas que encierran uno o más compartimentos acuosos. Incluyen, hasta el momento, los liposomas monolamelares y multilamelares, los liposomas multivesiculares, los liposomas recubiertos de polímero^[9,10]. Debido a su tamaño, características estructurales y, principalmente, al comportamiento que presentan dichas partículas, los liposomas se definen como productos nanotecnológicos.

Las dispersiones liposomales difieren de las especialidades medicinales inyectables tradicionales, dado que las primeras poseen características de formulación y distribución particulares. Esto genera que concentraciones plasmáticas similares no se correlacionen con la eficacia terapéutica equivalente. Incluso en los casos de composición aparentemente idéntica, la variación en la producción y la tecnología de control de productos y procesos puede dar lugar a productos con diferente eficacia terapéutica^[11]. Por tales motivos, la caracterización completa, el estudio de la estabilidad y su farmacocinética (incluida la distribución tisular) de un nuevo producto liposomal es fundamental para establecer un uso seguro y eficaz.

Diferencias en los pasos del proceso de fabricación y la formulación pueden afectar sustancialmente la eficacia / seguridad debido a cambios en las interacciones específicas entre liposomas y células, el grado de retención del principio activo en el liposoma, así como el tiempo de circulación, el *clearance* y las características de distribución de los nanovehículos^[12]. Por lo antes expuesto, es de suma relevancia determinar y definir los pasos críticos en el proceso de elaboración y control de este tipo de productos^[13].

La investigación, desarrollo y regulación de estos sistemas definidos como Drogas Complejas No Biológicas (NBCD, por su sigla en inglés) representa un desafío y requiere una evaluación diferenciada de los productos sintéticos tradicionales. Dado que la normativa establecida para las especialidades medicinales tradicionales resulta insuficiente en cuanto a su capacidad de describir las características y propiedades moleculares microscópicas y fisicoquímicas de estos productos, la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) en el año 2019 publicó la Disposición ANMAT N° 9943/19 con el objetivo de brindar un marco regulatorio complementario para el registro de especialidades medicinales nanofarmacéuticas.

Desde nuestra perspectiva, como autoridad regulatoria, es deseable el desarrollo de este tipo de sistemas de administración de fármacos de forma tal de direccionar la droga hacia el tejido blanco, evitando procesos de degradación de los fármacos, mejorando la biodisponibilidad y biodistribución, y reduciendo la toxicidad. Por tal motivo, es nuestra intención acompañar, desde el ámbito regulatorio, a la industria en estos procesos de innovación. Así, desde la Dirección de Fiscalización y Gestión de Riesgo (DFyGR) de INAME-ANMAT, se viene trabajando activamente en la definición de los requerimientos regulatorios necesarios para el registro y fiscalización post-comercialización de productos nanosimilares de forma de asegurar la calidad, seguridad y eficacia de todas las especialidades medicinales que se registren ante esta Administración, así como la evaluación del impacto sanitario que esto conlleva.

Es importante destacar que, desde hace más de dos décadas, existen en el mercado local y mundial especialidades medicinales de características nanotecnológicas; aunque, en nuestro país, el interés por el registro de productos similares se está dando en los últimos años. En la actualidad, se encuentran en proceso de registro de especialidades medicinales un número creciente de productos con diversas plataformas de liberación nanoestructuradas.

Con el objetivo de clarificar y unificar criterios en relación a la evaluación de estos productos, se encuentra trabajando un grupo interdisciplinario que abordó el análisis conjunto de todos los expedientes de registro de producto en curso; tomando como base la Disposición ANMAT N° 9943/19 y en concordancia con las guías internacionales, se redactó un documento interno específico denominado *“Documento para la evaluación de registro de Doxorrubicina Liposomal nanosimilar”*, el cual establece parámetros críticos, especificaciones y ensayos necesarios para cumplimentar con lo establecido por la disposición anteriormente mencionada.

El objetivo del presente trabajo fue describir detalladamente los actuales requerimientos regulatorios establecidos por la DFyGR de INAME para el registro de *“Doxorrubicina Liposomal nanosimilar”*, de forma tal de poder clarificar y acelerar los procesos de evaluación y registro. Cabe aclarar que, debido a que se trata de un proceso altamente dinámico de generación de conocimientos, dicha guía se irá actualizando a medida que surja nueva evidencia científica de relevancia.

Para ello se realizó una amplia búsqueda bibliográfica incluyendo guías internacionales existentes a la fecha^[11,15-18], con el fin de obtener la mayor información científica disponible; se realizaron reuniones internas interdisciplinarias de frecuencia semanal, de forma tal de realizar una evaluación conjunta de cada uno de los puntos críticos y/o relevantes necesarios a tener en cuenta en el análisis de registro de especialidades medicinales liposomales; y se elaboró un documento guía, el cual tomó como base la disposición ANMAT previamente mencionada, para establecer lineamientos regulatorios para la evaluación de expedientes de registro de producto.

Características de la doxorubicina liposomal

La doxorubicina (Figura 1) es el miembro más conocido y utilizado del grupo antibiótico antraciclina de agentes anticancerosos. Se introdujo por primera vez en la década de 1970 y, desde entonces, se ha convertido en uno de los fármacos más utilizados para el tratamiento de tumores hematológicos y sólidos. La toxicidad que limita el tratamiento con este fármaco es la miocardiopatía que puede provocar insuficiencia cardíaca congestiva y la muerte. Aproximadamente el 2% de los pacientes que han recibido una dosis acumulada (de por vida) de doxorubicina entre 450 y 500 mg/m² experimentan esta afección^[14].

La encapsulación de la doxorubicina dentro de liposomas permite reducir los efectos adversos asociados a la forma libre de la droga manteniendo su potencia. De esta forma, pueden incrementarse las dosis administradas, resultando en un aumento en la eficacia e índice terapéutico^[12].

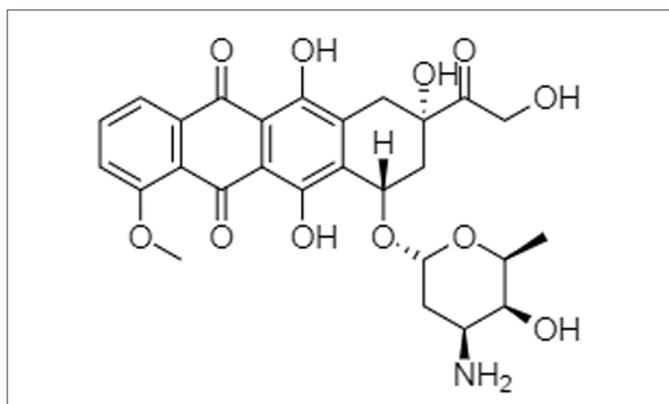


FIGURA 1. ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA DOXORRUBICINA.

Los productos liposomales parenterales presentan propiedades farmacocinéticas críticas, incluido el reconocimiento y la eliminación rápidos por el sistema de fagocítico mononuclear y prematura liberación de fármaco (inestabilidad). Las características fisicoquímicas, entre otras, son determinantes en el comportamiento *in vivo* de dichos productos^[11].

Entre las características relevantes de los liposomas, se debe incluir la composición y morfología, el estado del fármaco encapsulado, el entorno interno del liposoma, la distribución del tamaño de los liposomas, la fluidez de la membrana, el espesor de la capa de polietilenglicol (PEG) en la superficie del liposoma, el potencial o la carga de la superficie eléctrica y las tasas de fuga *in vitro*. Es deseable que los productos nanosimilares se comporten de forma análoga al producto comparador. Es por ello que, a los fines de definir "doxorubicina liposomal nanosimilar" debe tenerse en consideración que, para el registro y evaluación de dicha especialidad medicinal mediante este documento, el producto a registrar deberá demostrar estrictas características de equivalencia estructural, fisicoquímica y de ensayos *in vivo* e *in vitro* con el correspondiente similar.

Definición de producto nanosimilar de doxorubicina liposomal pegilada

Se definió como producto nanosimilar de doxorubicina liposomal pegilada, a aquellos que cumplen con las siguientes características^[19]: concentración de 2 mg/ml de doxorubicina clorhidrato a un pH de 6,5; dicha dispersión está constituida por liposomas unilamelares compuestos de N-(carbonilmetoxipolietilenglicol 2000)-1,2-diestearoil-sn-glicero-Sal sódica de 3-fosfoetanolamina (MPEG-DSPE); fosfatidilcolina de soja completamente hidrogenada (HSPC), y colesterol. En el interior acuoso de los liposomas, la doxorubicina clorhidrato se encuentra en forma de cristal amorfo, estabilizada por un pH interno de 4,8.^[20,21] La Figura 2 muestra una representación esquemática de un liposoma de doxorubicina.

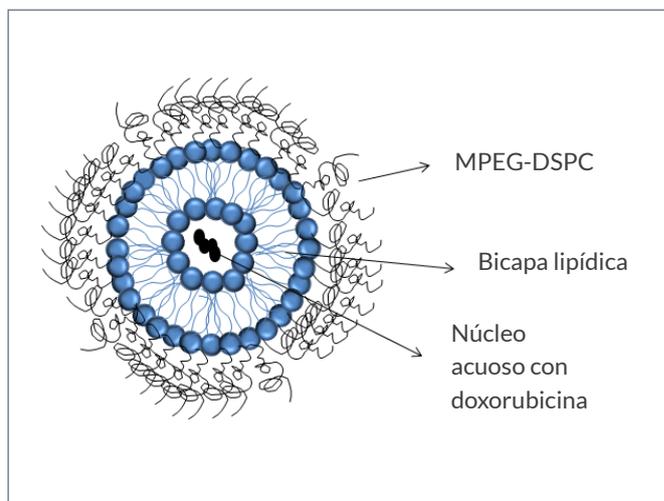


FIGURA 2. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE DOXORRUBICINA LIPOSOMAL.

DOCUMENTO PARA LA EVALUACIÓN DE REGISTRO DE DOXORRUBICINA LIPOSOMAL

La evaluación y trabajo conjunto por distintas áreas de la DFyGR del INAME dio como resultado la guía "Documento para la evaluación de registro de Doxorubicina Liposomal nanosimilar", en la cual se definen las características y parámetros relevantes tanto para la fabricación como para el control de estos productos. Se incluyen los ensayos necesarios para cumplimentar con los requerimientos regulatorios en cada uno de los puntos críticos del proceso. A continuación, se describen cada una de las características incluidas en el documento con los respectivos ensayos recomendados de llevar a cabo.

Las metodologías y especificaciones establecidas para cada uno de los ensayos que se detallan a continuación deberán ser sustentadas con información científica y serán sometidas a la evaluación por parte de la autoridad sanitaria.

1- DESCRIPCIÓN GENERAL DEL PRODUCTO

1.1. Descripción de la composición general (Sustancia activa, fracción lipídica y componentes no lipídicos): incluir concentración de la droga activa en mg/ml ó mg/vial.

1.2. Descripción del tipo de liposoma: unilamelar, multi, neutro, aniónico, catiónico, incluir toda característica morfológica de relevancia.

1.3. Componentes que integran el liposoma: indicar cada uno de los componentes que forman parte del liposoma: lípidos, fosfolípidos, solución acuosa, entre otros; incluyendo la concentración y proporción de cada uno de ellos, así como también indicar la función que cada uno cumple. Los componentes deberán tener una calidad acorde al fin destinado ya que para este producto se requiere una alta pureza y especificidad en las materias primas empleadas.

1.4. Origen de los lípidos que integran el liposoma: deberá indicar si son de origen sintético, semisintético o natural, e indicar el proveedor. Cualquier modificación deberá incluir una evaluación que determine el grado de influencia de dicho cambio en la seguridad, calidad y eficacia del producto. Se deberá notificar a la autoridad regulatoria la intención de realizar dicha modificación con el correspondiente análisis de riesgo y evaluación.

1.5. Tamaño y distribución de tamaño de los liposomas: deberá expresarlo como tamaño promedio y parámetros indicativos de la distribución (D10, D50 y D90).

1.6. Indicar las especificaciones correspondientes: los rangos permitidos para la identificación y valoración de cada uno de los componentes.

2- MATERIALES DE PARTIDA

En los trámites de registros se puede observar que la carga del principio activo se realiza por gradiente de pH en los *carriers* previamente formados, por lo tanto, se cuentan con diferentes materiales de partida:

2.1 Materias primas

2.1.1. Doxorrubicina clorhidrato: de acuerdo a las monografías codificadas en farmacopeas vigentes.

2.1.2. Componentes estructurales del liposoma: los excipientes empleados en la estructura del liposoma deben tener una calidad acorde al fin destinado. Se deberán incluir ensayos de identificación, valoración, evaluación de impurezas y posibles productos de degradación, isómeros, características de estabilidad, ensayos microbiológicos, entre otros. En aquellos casos que no se cuente con una monografía codificada en farmacopeas vigentes, deberá realizar el control de calidad de acuerdo a lo indicado por el proveedor de la materia prima.

2.2 Liposomas vacíos

Deberían realizarse como mínimo los siguientes ensayos:

2.2.1. Identificación de cada uno de los componentes del liposoma: mediante técnica de TLC, HPLC, entre otros.

2.2.2. Determinación de las cargas superficiales-Potencial Z: parámetro que brinda información sobre la posibilidad o no de agregación, estabilidad de la dispersión liposomal y da información sobre la posible interacción de los liposomas con el medio biológico y el tejido diana.

2.2.3. Determinación del pH de la dispersión liposomal.

2.2.4. Tamaño y distribución del tamaño de los liposomas: en este punto debe indicarse el tamaño medio de los liposomas, así como también el D10, D50 y D90.

2.2.5. Ensayos de estabilidad del liposoma vacío: aquí se solicita la presentación de un estudio de estabilidad con diferentes tipos de ensayos, de forma tal de determinar el tiempo límite y las condiciones de almacenamiento en la que pueden permanecer previo a la carga del principio activo sin modificar sus características. Los ensayos mínimos requeridos son:

A. Determinación de parámetros críticos que hacen a la estabilidad del liposoma frente a cambios deliberados en los parámetros a considerar (pH, osmolaridad, temperatura, entre otros).

B. Determinación de la estabilidad del liposoma en el tiempo transcurrido entre la elaboración y la carga: aspecto, pH, potencial Z, tamaño de partícula y distribución de tamaño, capacidad de carga.

2.2.6. Ensayos microbiológicos: determinar la carga biológica y de endotoxinas bacterianas de los liposomas vacíos, estableciéndose límites de aceptación, en base a la estabilidad de éstos desde el punto de vista microbiológico. En cuanto a la determinación de endotoxinas, se sugiere ver lo indicado para producto terminado (punto 3.18 de la presente guía). Asimismo, se deben establecer las medidas necesarias de contención frente a una posible contaminación microbiológica, según los lineamientos de las Disposiciones ANMAT N° 3602/2018 y N° 3827/2018. Finalmente, se debe controlar el nivel de carga biológica (bioburden, según su denominación en inglés) antes del paso de esterilización final, para cada lote de producto terminado elaborado, de acuerdo a lo indicado en la legislación citada.

3- PRODUCTO TERMINADO

Todos los ensayos deben realizarse sobre el producto en su envase primario.

3.1. Aspecto: detallar las características de forma inequívoca.

3.2. Caracterización morfológica del liposoma: dentro de los parámetros de importancia para la caracterización del liposoma se encuentra también la morfología ya que de ésta dependen diversos aspectos del desempeño biológico de la nanopartícula, tales como el flujo en los vasos sanguíneos, la extravasación y acumulación en el sitio de acción, y el desencadenamiento de la respuesta inmune^[23]. Se solicitará que se realice sobre el producto terminado de forma tal de corroborar la estructura, estado cristalino y disposición del principio activo en el liposoma, espesor de la bicapa lipídica y lamellaridad obtenidos con el proceso de fabricación empleado en la elaboración de

los liposomas. Este ensayo será requerido para el registro del producto (sobre los lotes sometidos a estabilidad), no como ensayo de rutina. Asimismo, el laboratorio deberá contar con la posibilidad de realizar estos ensayos, en caso de que la autoridad sanitaria así lo requiera.

En este sentido, el ensayo que se solicitará es Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), de forma de confirmar la estructura morfológica del nano-objeto, determinada indirectamente por otros ensayos. En particular, la técnica de cryo-TEM permite una mejor preservación de las vesículas y de otras estructuras que puedan coexistir.

A modo de ejemplo, se adjunta una serie de metodologías que serían consideradas aceptables de adicionar a la determinación, en caso de considerarlo oportuno. El conjunto de ensayos realizados debe aportar los parámetros requeridos en este ítem de caracterización morfológica.

- Espectroscopía de resonancia electroparamagnética
- Resonancia magnética nuclear
- Técnicas de fluorescencia
- Microscopía de fuerza atómica
- Otras técnicas espectroscópicas que aportan información relevante adicional, como IR, rayos x, dispersión láser, entre otras.

3.3. Propiedades termodinámicas del liposoma: otro parámetro crítico a determinar es la Temperatura de Transición de Fase (TTF) del liposoma, ya que esta se ve afectada por cambios en la composición de los lípidos que forman la estructura y brinda información de la fluidez y homogeneidad de los lípidos. Modificaciones en la TTF pueden afectar la efectividad de carga del liposoma, así como el estado y distribución del principio activo en el mismo.

3.4. Identificación: deberá realizarse la identificación del principio activo y de cada uno de los componentes estructurales del liposoma.

3.5. pH de la dispersión liposomal.

3.6. Ensayos farmacotécnicos para inyectables: volumen extraíble, partículas subvisibles, osmolaridad, opalescencia y límite de color.

3.7. Tamaño medio y distribución de partículas: deberá informarse el tamaño medio y la distribución indicando D10, D50 y D90.

3.8. Determinación de las cargas superficiales-Potencial Z.

3.9. Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) libre: deberá cuantificarse el principio activo que se encuentra en la dispersión de forma libre, es decir que no se encuentra encapsulado en el interior de la estructura liposomal.

3.10. IFA Encapsulado: deberá cuantificarse el principio activo que se encuentra encapsulado en el interior acuoso de los liposomas.

3.11. Valoración del IFA total: por tratarse de un producto nanofarmacéutico se solicitará se ajuste la especificación para el IFA total (libre + encapsulado) al rango 95-105% del valor declarado.

3.12. Eficiencia de carga de IFA: relación IFA libre / IFA encapsulado, disuelto, adsorbido o adherido.

3.13. Capacidad de carga: Relación IFA/moléculas lipídicas, cuando corresponda.

3.14. Impurezas Orgánicas provenientes del IFA: deberá evaluarse de acuerdo a los estudios de degradación forzada a los que deberá someterse el producto, al estudio de estabilidad y a la bibliografía disponible.

3.15. Uniformidad de Unidades de Dosificación: de acuerdo a la Disposición ANMAT N° 9943/2019 el ensayo debe realizarse por Uniformidad de Contenido.

3.16. Ensayo de liberación *in vitro*: estos productos representan un cambio de paradigma, en el cual el concepto de biodisponibilidad involucra la integridad de los liposomas en circulación, su biodistribución y su acumulación en tejido diana. Además, poseen un mecanismo de liberación del fármaco desde la plataforma que no se encuentra completamente dilucidado en la actualidad. Por estos motivos, se considera necesaria la realización de dos tipos de ensayos, el primero (A) tendrá como finalidad la evaluación de la *performance* farmacotécnica y consistencia lote a lote; mientras que el segundo ensayo (B) será utilizado para evaluar la integridad del nanovehículo en circulación sanguínea.

A. Ensayo de liberación del principio activo a diferentes pH y temperaturas: deberá diseñarse un ensayo que permita la evaluación de la liberación *in vitro* del principio activo, bajo múltiples condiciones de pH y temperaturas, representativas de las condiciones ambientales del tejido sano y tejido diana^[24].

B. Ensayo de integridad del liposoma en circulación: deberá diseñarse un ensayo que permita la evaluación de la integridad del liposoma en el plasma. Para dicho ensayo se podrá emplear como medio suero bovino, el cual deberá estabilizarse a 37 °C; el uso de membranas de diálisis de tamaño de poro adecuado resulta aceptable para este tipo de ensayo.

3.17. Ensayo de esterilidad: se deberá aportar la metodología de control microbiológico específica y detallada del producto objeto del registro y su correspondiente ensayo de aptitud, según los lineamientos del capítulo 370 de la Farmacopea Argentina^[22], o su equivalente de farmacopeas internacionalmente reconocidas. Los procedimientos de ensayo no deben verse afectados por las características del producto. En este sentido, deberá emplearse el método de filtración por membrana, con un tamaño de poro de 0,45µm, a menos que se especifique de otro modo según resulte del ensayo de aptitud realizado.

3.18. Endotoxinas: en este punto es importante la descripción detallada de la metodología incluyendo la preparación de la muestra. Existe evidencia científica que indica que, por la naturaleza lipofílica de las endotoxinas bacterianas, las mismas podrían quedar retenidas dentro de los liposomas. Por tal motivo, es recomendable realizar la ruptura de los nanoobjetos, como por ejemplo con tratamiento térmico, previa determinación de endotoxinas^[25]. Por otro lado, se debe describir inequívocamente la metodología empleada, ya que se describe en la bibliografía que las nanopartículas o componentes que acompañan a las

mismas como contaminantes (como los beta-glucanos) pueden interferir en el ensayo^[25,26]. Finalmente, tanto la metodología empleada como la determinación del Límite de Endotoxinas (LE) debe realizarse según los lineamientos de la Farmacopea Argentina o farmacopeas internacionalmente reconocidas. En este sentido, es aceptable un LE no mayor a 3.7 EU/mg, el cual surge de aplicar el cálculo teniendo en cuenta la dosis y la vía de administración del producto^[22,26,27].

3.19. Solventes residuales: Los mismos deberán determinarse de acuerdo a lo indicado en el capítulo 715 de la Farmacopea Argentina y deberán expresarse sobre el producto terminado^[22].

3.20. Caracterización de la capa de PEG para liposomas PEGilados: deberá realizarse un ensayo que permita estimar el espesor y disposición de la capa PEG en la superficie y la estabilidad de la conjugación.

3.21. Envase primario: se deberá aportar metodología del control de calidad del envase primario que incluya todos los ensayos listados para envases de vidrio en el capítulo 430 de la Farmacopea Argentina y los ensayos químicos, físicos y de reactividad biológica realizados a los tapones elastoméricos según farmacopeas internacionalmente reconocidas.

4- VALIDACIONES

4.1 Validación de las metodologías analíticas: deberá realizar la validación/ verificación (según corresponda) de cada una de las metodologías empleadas en el control de calidad del producto.

4.2 Validación del proceso de esterilización: es conocido que los métodos de esterilización pueden provocar cambios en las características fisicoquímicas de las nanopartículas, con consecuencias en su estabilidad y toxicidad^[28]. En este sentido, tal como se establece en la Disposición N° 9943/19, se requiere una evaluación del proceso de esterilización no solo desde el punto de vista microbiológico, sino también desde el punto de vista de las características intrínsecas del producto nanosimilar. Los trámites de registro hasta la fecha evaluados proponen como método de esterilización la filtración por membrana de 0,22 µm. Esta estrategia de esterilización se presenta una opción razonable para eliminar una posible contaminación microbiana para estas especialidades medicinales^[28,29]. Sin embargo, se quiere destacar la importancia de realizar los ensayos enumerados sobre el producto terminado, es decir una vez concluido todo el proceso de manufactura, a los fines de evaluar el impacto que puede acarrear dicho proceso sobre el producto.

5- ESTABILIDAD DEL PRODUCTO TERMINADO

Durante el estudio de estabilidad del producto terminado deberá contemplarse, como mínimo, la determinación de cada uno de los parámetros que figuran a continuación en cada uno de los intervalos estudiados:

5.1. Cuantificación del IFA: deberá realizarse la determinación del IFA total, IFA encapsulado y del IFA libre.

5.2. Ensayos que determinen la integridad del liposoma:

5.2.1. Determinación de las cargas superficiales: determinación del potencial Z.

5.2.2. Distribución y tamaño de partícula: informando tamaño medio y distribución de tamaño (D10, D50 y D90).

5.2.3. Posibles productos de degradación:

A. Ensayo de impurezas del IFA: de acuerdo con bibliografía disponible/ estudio de degradaciones forzadas, estado físico y a las posibles rutas de degradación. Incorporar especificaciones para impurezas individuales conocidas y desconocidas e impurezas totales.

B. Ensayo de impurezas del liposoma: determinación de posibles impurezas debido a posible degradación de los componentes estructurales del liposoma (ácidos grasos libres, índice de peróxidos, lisofosfolípidos, entre otros)^[30,31].

5.3. Tasa de fuga del IFA desde la nanopartícula a lo largo de la vida útil: este es un parámetro que se debe tener en cuenta al momento de la evaluación, dado que una alta tasa de fuga durante la vida útil debería considerarse una limitante en el límite inferior de la especificación de IFA encapsulado al momento de la liberación del producto, de forma tal de asegurar que el producto se encuentre dentro de las especificaciones durante toda su vida útil.

5.4. Estabilidad de producto reconstituido/diluido con cada uno de los solventes descritos en el prospecto, rótulos e información para el paciente a fin de asegurar los tiempos y las condiciones de conservación del producto hasta su total administración al paciente.

6- ENSAYOS DE COMPARABILIDAD

En primera instancia se solicitará la presentación de datos de similitud frente al producto comparador en cuanto a las características fisicoquímicas y estudios preclínicos detallados a continuación.

7- ESTUDIOS NO CLÍNICOS

Dada la complejidad que se asocia a los productos con características nanofarmacéuticas, los mismos requieren una evaluación diferenciada a los productos sintéticos tradicionales. En este sentido, se solicitará la realización de estudios preclínicos previamente a la aprobación de la especialidad medicinal.

El producto nanosimilar utilizado en los ensayos preclínicos deberá elaborarse utilizando el proceso de fabricación final (fórmula final)^[11]. Deben realizarse ensayos comparativos de farmacocinética, farmacodinamia y toxicidad, frente al producto comparador, en especies relevantes respecto a la farmacología y seguridad del producto.

7.1. Farmacocinéticos: estudios cinéticos y toxicocinéticos a dosis simple y repetidas en distintos niveles de dosis (elegidas en base a niveles en sangre a dosis terapéuticas en humanos) en animales de experimentación, determinando en sangre, plasma o suero el IFA libre y el IFA asociado/encapsulado. Se debe demostrar la similitud del producto en estudio y el comparador, en cuanto a la absorción, distribución (con énfasis en áreas de acumulación y órganos de retención), metabolismo y eliminación de la droga y del *carrier*, y su impacto potencial en la seguridad^[11,32]. Justificar la elección de la especie.

7.2. Farmacodinamia: determinación de eficacia en modelos *in vitro* e *in vivo*. Demostrar la similitud del producto similar y el comparador en la respuesta farmacodinámica, utilizando modelos *in vivo* apropiados, a varios niveles de dosis y régimen de dosificación justificados, según la aplicación clínica propuesta, elegidos teniendo en cuenta la sensibilidad del modelo. Caracterizar la interacción entre el *carrier* y células blanco u otras células con relevancia toxicológica, en ensayos *in vitro* e *in vivo*^[11,17].

7.3. Toxicología y Seguridad: estudios toxicológicos y de seguridad farmacológica a dosis única y repetidas, comparativos entre ambos productos, en especies relevantes. El diseño de los ensayos de toxicidad debe incluir la evaluación de los tejidos donde el nanoproducción podría acumularse y la evaluación específica de órganos blanco de toxicidad conocidos. Además, se debe incluir la evaluación de reactividad *in vitro* e *in vivo* y pruebas de pseudoalergia relacionadas con la activación del complemento (CARPA) en modelos animales sensibles^[11,33].

8- MANUFACTURA

Si bien aquí aplica y se requerirá todo lo referente a la Disposición ANMAT N° 3602/18 (t. o. N° 3827/18), se hace hincapié en los siguientes puntos:

- 8.1.** Descripción de la formulación (cuali-cuantitativa), indicando la función de cada uno de los componentes.
- 8.2.** Control de productos intermedios y granel.
- 8.3.** Descripción detallada de cada uno de los pasos individuales del proceso de manufactura.
- 8.4.** Descripción de los materiales críticos y parámetros sensibles a las variaciones que permitan una adecuada caracterización del producto; en este punto se requerirá la descripción exhaustiva de cada uno de los parámetros críticos del proceso.

9- CAMBIOS POST-REGISTRO

Pequeñas modificaciones en la calidad de las materias primas, formulación y/o en los procesos de elaboración de productos liposomales pueden impactar sobre la estabilidad e integridad de las especialidades medicinales nanotecnológicas, así como también sobre los efectos farmacológicos, especificidad en la interacción producto/célula, biodistribución, llegada al órgano blanco, inmunogenicidad y toxicidad de los mismos.

Es por ello que los laboratorios deberán informar a la autoridad sanitaria cualquier cambio que tuviese intención de realizar, debidamente justificado, tanto sobre los proveedores de las materias primas y productos semielaborados como sobre los procesos de fabricación, acondicionamiento y almacenamiento. Dichas modificaciones serán evaluadas caso por caso, dependiendo de la modificación que el laboratorio quisiese realizar y se emitirá un dictamen sobre la factibilidad de las mismas y/o los nuevos requerimientos de documentación y ensayos que el laboratorio deberá llevar a cabo para su aprobación.

CONCLUSIÓN

La caracterización estructural completa, así como también la evaluación preclínica (farmacocinética, farmacodinamia y toxicidad) de estos productos es de suma relevancia al momento de determinar la nanosimilaridad. Las características únicas de estos productos introducen un nuevo paradigma al concepto tradicional de biodisponibilidad, en el cual la biodistribución y acumulación en el tejido diana juegan un papel crucial en la efectividad de la especialidad medicinal liposomal.

Es por ello que, desde la Dirección de Fiscalización y Gestión de Riesgo, se decidió implementar un sistema de seguimiento continuo sobre los productos nanofarmacéuticos, el cual se llevará a cabo desde las instancias iniciales del proceso de registro, autorización de comercialización y fiscalizaciones periódicas post-registro, de forma de asegurar que los productos presentes en el mercado sean seguros, eficaces y de calidad, en virtud de promover y proteger la salud pública.

Con el fin de unificar el estándar regulatorio y de calidad de los productos en el mercado, en una segunda etapa se incorporarán otros principios activos, así como también todas las especialidades medicinales alcanzadas por la Disposición ANMAT N° 9943/19.

Los requerimientos descritos en este trabajo serán sometidos a revisiones periódicas con el fin de ir actualizándose en concordancia con el avance del conocimiento científico, las tecnologías emergentes, como así también en lo concerniente a la regulación de estos productos.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Rashidi L, Khosravi-Darani K. The Applications of Nanotechnology in Food Industry. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2011; (51):723-730.
- 2- Wong YWH, Yuen CWM, Leung MYS, Ku SKA, Lam HLI. Selected Applications of Nanotechnology in Textiles. AUTEX Research Journal. 2006; (6): 1-8.
- 3- Poulos NG, Hall JR, Leopold MC. Functional Layer-By-Layer Design of Xerogel-Based First-Generation Amperometric Glucose Biosensors. Langmuir. 2015; (31): 1547-1555.
- 4- Li J, Yan X, Li X, Zhang X, Chen J. A new electrochemical immunosensor for sensitive detection of prion based on Prussian blue analogue. Talanta. 2018; (179): 726-733.
- 5- Muraca GS, Talevi A, Pesce GO. Enfermedad de Chagas: novedades en nanomedicina como estrategia terapéutica. Revista Ciencia Reguladora. 2019; (5): 32-37.
- 6- Suri SS, Fenniri H, Singh B. Nanotechnology-based drug delivery systems. J. Occup. Med. Toxicol. 2007; (2): 16-22.
- 7- Du Y, Chen W, Zheng M, Meng F, Zhong Z. pH-sensitive degradable chimaeric polymersomes for the intracellular release of doxorubicin hydrochloride. Biomaterials. 2012; (33): 7291-7299.
- 8- Popovska O, Simonovska J, Kavrovski Z, Rafajlovska V. An Overview: Methods for Preparation and Characterization of Liposomes as Drug Delivery Systems. Int. J. Pharm. Biopharm. Res. 2013; 3 (3): 182-189.

- 9- Gregoriadis, G. *Liposomes Technology*. 3^o edición. London, U.K: The School of Pharmacy University of London and Lipoxen PLC. 2007; 1-268. Vol. 1. Liposome Preparation and related techniques.
- 10- Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koshki K. Liposome: classification, preparation and applications. *Nanoscale Research Letters*. 2013; (8): 102-111.
- 11- Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product. EMA/CHMP/806058/2009/Rev. 02 Committee for Human Medicinal Products (CHMP). 2013.
- 12- Tardi PG, Boman NL, Cullis PR. Liposomal Doxorubicin. *J Drug Target*. 1996; 3 (4): 129-140.
- 13- Olson F, Hunt CA, Szoka FC, Vail WJ, Papahadjopoulos D. Preparation of Liposomes of defined size Distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Bioch. Et Biophysics Acta*. 1979; (557): 9-23.
- 14- Abraham SA, Waterhouse DN, Mayer LD, Cullis PR, Madden TD, Bally MB. The Liposomal Formulation of Doxorubicin. *Methods in Enzimology*. 2005; (391): 71-97.
- 15- Disposición ANMAT 9943/2019; DI-2019-9943-APN-ANMAT#MSYDS; Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. 2019.
- 16- Liposome Drug Products-Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation. Food and Drug Administration, 2018.
- 17- Guideline for the Development of Liposome Drug Products. MHLW, Japón, 2016.
- 18- Guidance for Industry Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology. Food and Drug Administration, 2014.
- 19- DOXIL® (doxorubicin HCl liposome injection) for intravenous infusion Initial U.S. Approval: 1995, Food and Drug Administration.
- 20- Madden TD, Harrigan PR, Tai LCL, Bally MB, Mayer LD, Redelmeier TE, Loughrey HC, Tilcock CPS, Reinish LW, Cullis PR. The accumulation of drugs within large unilamellar vesicles exhibiting a proton gradient: a survey. *Chemistry and Physics of lipids*. 1990; (53): 37-46.
- 21- Mayer LD, Cullis PR, Bally MB. The use of transmembrane pH gradient-driven drug encapsulation in the pharmacodynamic evaluation of liposomal doxorubicin. *Journal of Liposome research*. 1994; 4 (1): 529-553.
- 22- Farmacopea Argentina, 7^o Edición. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, 2013 y primer suplemento 2019.
- 23- Wibroe PP, Ahmadvand D, Oghabian MA, Yaghmur A, Moein Moghimi S. An integrated assessment of morphology, size, and complement activation of the PEGylated liposomal doxorubicin products Doxil®, Caelyx®, DOXOrubicin, and SinaDoxosome. *J. Control. Release*. 2016; (221): 1-8.
- 24- Gaber MH, Hong K, Huang SK, Papahadjopoulos, D. Thermosensitive Sterically Stabilized Liposomes: Formulation and in Vitro Studies on Mechanism of Doxorubicin Release by Bovine Serum and Human plasma. *Pharmaceutical Research*. 1995; 10 (12): 1407-1416.
- 25- Neun BW, Dobrovolskaia MA. Considerations and some practical solutions to overcome nanoparticle interference with LAL assays and to avoid endotoxin contamination in nanoformulations. In: McNeil S (eds) *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*. *Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press. 2018; p. 23-33.
- 26- Neun BW, Dobrovolskaia MA. Detection of Endotoxin in Nano-formulations Using Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) Assays. *Journal of Visualized Experiments*. 2019; (143): e58830.
- 27- United States Pharmacopeia -NF. Capítulo (85) Prueba de Endotoxinas Bacterianas.
- 28- Vetten MA, Yah CS, Singh T, Gulumian M. Challenges facing sterilization and depyrogenation of nanoparticles: Effects on structural stability and biomedical applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2014; (10): 1391-1399.
- 29- Sharma A, Sharma US. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*. 1997; (154): 123-140.
- 30- Piraupe C, Postaire E, Lize JM, Prognon P, Pradeau D. Evidence of Chemical Instability of Phospholipids in Liposomes. *Chem.Pharm.Bull*. 1988; 36 (11): 4600-4602.
- 31- Grit M, Crommelin DJ, Lang J. Determination of phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol and their lyso forms from liposome dispersions by high-performance liquid chromatography using high-sensitivity refractive index detection.) *Journal of Chromatography*. 1991; 2 (585): 239-246.
- 32- Drug Products, Including Biological Products, that Contain Nanomaterials Guidance for Industry. DRAFT GUIDANCE. Food and Drug Administration, 2017.
- 33- Szebeni J, Bedöcs P, Rozsnyay Z, Weiszhar Z, Urbanics R, Rosivall L, Cohen R, Garbuzenko O, Báthori G, Tóth M, Bünger R, Barenholz Y. Liposome-induced complement activation and related cardiopulmonary distress in pigs: factors promoting reactivity of Doxil and AmBisome. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2012; (8): 176-184.