

**MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCIÓN SOCIAL****RESOLUCIÓN NÚMERO 004490 DE 2016****(27 SEP 2016)****G/TBT/N/COL/196/Add.6**

Por la cual se expide la “*Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos*” y se dictan otras disposiciones

EL MINISTRO DE SALUD Y PROTECCIÓN SOCIAL

En ejercicio de sus facultades legales, en especial, las conferidas en el numeral 9 del artículo 2 del Decreto - Ley 4107 de 2011 y en desarrollo del artículo 22 del Decreto 1782 de 2014 y,

CONSIDERANDO

Que mediante Decreto 1782 de 2014 estableció con relación al párrafo transitorio del artículo 89 de la Ley 1438 de 2011, los requisitos y el procedimiento para las evaluaciones farmacológica y farmacéutica de los medicamentos biológicos en el trámite del registro sanitario.

Que los artículos 22 y 23 ibídem, establecen que el Ministerio de Salud y Protección Social debe expedir, entre otras, la guía de evaluación de la inmunogenicidad para los medicamentos biológicos, tomando en consideración estándares internacionales si existen y que, para su adopción y elaboración, se observarán los principios de garantía de calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos biológicos, sin generar barreras innecesarias a la competencia y a su disponibilidad.

Que la inmunogenicidad se define como la capacidad de una proteína terapéutica para generar respuestas inmunes frente a esta, y hacia proteínas semejantes o a formulaciones de las mismas y a inducir eventos adversos clínicos inmunológicamente relacionados, que en ocasiones este tipo de respuestas pueden ser irrelevantes o indetectables.

Que la inmunogenicidad puede ser generada por cualquier medicamento biológico, independientemente de su condición de pionero o competidor, y puede tener consecuencias clínicas sobre su eficacia o su seguridad y dado lo anterior, no es posible determinar *ex ante* cuáles son las pruebas particulares para evaluar la inmunogenicidad de todos los productos, sin embargo existen modelos y lineamientos que, aplicados caso a caso, aportan información determinante como herramientas de caracterización, que van desde las pruebas analíticas hasta las *in vivo* y deben ser aplicadas para evaluar cada caso en concreto.

Que la Dirección de Medicamentos y Tecnologías en Salud de este Ministerio, para la elaboración y construcción de la guía de evaluación de la inmunogenicidad para los medicamentos biológicos de que trata la presente resolución, se apoyó en los documentos 1) “*Guidance for Industry: Immunogenicity Assesment for Therapeutic Protein Products*”, emitida en agosto de 2014 por las siguientes entidades: Center for Drug Evaluation and Research (CDER) y Center for Biologics Evaluation and Research (CBER) de la Agencia Sanitaria de Estados Unidos, Food And Drug Administration –FDA-, adscrita al U.S. Department of Health and Human Services y 2) “*Guideline on Immunogenicity Assessment of Biotechnology-Derived Therapeutic Proteins*” emitida en diciembre de 2007 por el Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) de la Agencia Sanitaria Europea, European Medicines Agency -EMA- (Documento Ref. EMEA/CHMP/BMWP/14327/2006).

Continuación de la resolución “Por la cual se expide la “Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos” y se dictan otras disposiciones”

Que en cumplimiento de lo previsto en el artículo 2.2.1.7.3.6. del Decreto 1074 de 2015 Único Reglamentario del Sector Comercio, este Ministerio, mediante oficio 201524001786361 solicitó concepto previo al Ministerio de Comercio, Industria y Turismo, para determinar si lo aquí propuesto debía surtir el proceso de consulta pública ante la Organización Mundial del Comercio – OMC, ante lo cual la Dirección de Regulación de dicho Ministerio, mediante radicado 2-2015-018313 del 11 de noviembre de 2015, manifestó que, si bien, el proyecto no constituye un obstáculo técnico al comercio, debe surtir el trámite de “*notificación ante la OMC, Comunidad Andina y demás socios comerciales en acatamiento del principio de transparencia*”.

Que, atendiendo el anterior concepto, la propuesta de guía de evaluación de la inmunogenicidad de medicamentos biológicos de que trata el presente acto administrativo, fue objeto de notificación a la Organización Mundial del Comercio - OMC, mediante la signatura G/TBT/N/COL/196/Add.4, del 2 de marzo al 26 de mayo de 2016, y sobre la misma los países miembros de dicha Organización y de la Comunidad Andina de Naciones - CAN, y demás socios comerciales de Colombia, no presentaron observaciones.

Que conforme con lo anteriormente señalado, se hace necesario establecer los lineamientos a seguir por los solicitantes de registros sanitarios de medicamentos biológicos y que deberán observar para la evaluación de la inmunogenicidad de medicamentos biológicos que se importen al país o se produzcan en el territorio nacional, en aras de salvaguardar la salud de la población usuaria de este tipo de productos.

En mérito de lo expuesto,

RESUELVE

Artículo 1. Objeto. La presente resolución tiene por objeto expedir la “*Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos*” contenida en el Anexo Técnico que forma parte integral del presente acto administrativo.

Artículo 2. Ámbito de aplicación. Las disposiciones previstas en la presente resolución, aplican a:

- 2.1. Las personas naturales y jurídicas que soliciten registros sanitarios de medicamentos biológicos que se pretendan producir en el territorio nacional o importar al país.
- 2.2. Los titulares de registro sanitario de medicamentos biológicos que soliciten la renovación de registro.
- 2.3. La autoridad sanitaria del orden nacional, Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos - INVIMA.

Parágrafo. Se exceptúa del cumplimiento de lo previsto en la presente resolución a las vacunas, que se regulan por lo dispuesto en la Resolución 1606 de 2014 o la norma que la modifique o sustituya.

Artículo 3. Alcance de los estudios clínicos de inmunogenicidad para evaluación de competidores. Para proteínas terapéuticas competidoras, la extensión y tiempo de los estudios clínicos de inmunogenicidad dependerá del grado de similitud físico-química y funcional entre la proteína terapéutica objeto de evaluación y el producto de referencia (o estándar farmacopéico de referencia, en lo que se refiere a la fase de caracterización físico-química).

Artículo 4. Alcance de los estudios clínicos de inmunogenicidad cuando se realicen comparaciones para evaluación de cambios en el proceso de manufactura. La necesidad, extensión y tiempo de los estudios clínicos de inmunogenicidad, se deberá evaluar teniendo en cuenta el grado de similitud físico-química y funcional del producto elaborado bajo las nuevas

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

condiciones frente al producto previamente aprobado por el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos - INVIMA.

Artículo 5. Vigilancia post-comercialización. El titular de registro sanitario de medicamentos biológicos deberá entregar al INVIMA, como parte de los informes periódicos de seguridad, un análisis de los resultados de la evaluación y caracterización de la inmunogenicidad, como es el caso de la valoración de Anticuerpos Anti-Fármaco (ADA) en pacientes colombianos, y cuya periodicidad se realizará teniendo en cuenta la "Guía De Evaluación de la Inmunogenicidad de los Medicamentos Biológicos". De acuerdo a los resultados de la evaluación, el INVIMA, podrá modificar la batería de ensayos y la periodicidad de su realización.

Parágrafo 1. Para las solicitudes de los registros sanitarios de medicamentos biológicos nuevos y que hayan sido objeto de comercialización en otros países, el interesado debe aportar los análisis de la información post-comercialización de la población allí expuesta. En caso de renovación, se deben adjuntar, además de los informes periódicos aquí señalados, los reportes de eventos adversos que se hubieran presentado y una evaluación de la inmunogenicidad que responda a la gestión y minimización de dichos eventos.

Parágrafo 2. La vigilancia de los eventos adversos asociados a la inmunogenicidad, en el marco de las actividades de vigilancia post-comercialización, se hará de acuerdo con lo establecido en el plan de gestión de riesgo de medicamentos biológicos y de las buenas prácticas de farmacovigilancia, incluyendo la farmacovigilancia activa de estos productos, a la que se refiere el Decreto 1782 de 2014 o la norma que lo modifique o sustituya.

Artículo 6. Medidas sanitarias de seguridad, procedimientos y sanciones. El incumplimiento de lo dispuesto en la presente resolución, dará lugar a la aplicación del régimen de control y vigilancia sanitaria, medidas sanitarias de seguridad, procedimientos y sanciones contenidas en el Decreto 677 de 1995 o la norma que lo modifique o sustituya.

Artículo 7. Notificación. La presente resolución se notificará a la Organización Mundial de Comercio - OMC, Comunidad Andina de Naciones - CAN y al Tratado de Libre Comercio - TLC G3, a través del Sistema de Información sobre Medidas de Normalización y Procedimientos de Evaluación de Conformidad.

Artículo 8. Vigencia. La presente resolución empezará a regir un (1) año después de la fecha de su publicación, de conformidad con lo previsto en el numeral 5 del artículo 9 de la Decisión Andina 562.

PUBLÍQUESE Y CÚMPLASE

Dada en Bogotá, D. C., a los **27 SEP 2016**


ALEJANDRO GAVIRIA URIBE
Ministro de Salud y Protección Social


Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

ANEXO TÉCNICO

GUÍA DE EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD PARA LOS MEDICAMENTOS BIOLÓGICOS (PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS)

TABLA DE CONTENIDO

PARTE I. ASPECTOS GENERALES

- 1. INTRODUCCIÓN**
- 2. ANTECEDENTES**
- 3. CONSECUENCIAS CLÍNICAS**
 - 3.1. Consecuencias para la eficacia
 - 3.2. Consecuencias para la seguridad
 - 3.2.1. *Anafilaxis*
 - 3.2.2. *Síndrome de liberación de citoquinas*
 - 3.2.3. *Reacciones de infusión*
 - 3.2.4. *Reacciones no agudas*
 - 3.2.5. *Reactividad cruzada a proteínas endógenas*
- 4. RECOMENDACIONES PARA LA MITIGACIÓN DEL RIESGO DE INMUNOGENICIDAD EN LA FASE CLÍNICA DEL DESARROLLO DE PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS.**
 - 4.1. Ensayos para anticuerpos anti-fármacos (ADA)
 - 4.2. Consideraciones sobre las muestras de anticuerpos para productos específicos
 - 4.3. Dosificación
 - 4.4. Eventos adversos
 - 4.5. Alcance de los estudios clínicos de inmunogenicidad cuando se realizan comparaciones.
 - 4.6. Seguimiento post-comercialización
- 5. FACTORES ESPECÍFICOS DE LOS PACIENTES Y LOS PRODUCTOS QUE AFECTAN LA INMUNOGENICIDAD**
 - 5.1. Factores específicos de los pacientes que afectan la inmunogenicidad
 - 5.1.1. *Estado inmunológico y competencia del paciente*
 - 5.1.2. *Sensibilización anterior / historia de alergias*
 - 5.1.3. *Vía de administración, dosis y frecuencias de administración*
 - 5.1.4. *Estado Genético*
 - 5.1.5. *Estado de Inmuno-Tolerancia a la proteína endógena*
 - 5.2. Factores específicos de los productos que afectan la inmunogenicidad
 - 5.2.1. *Origen del producto (humano o foráneo)*
 - 5.2.2. *Estructura Molecular Primaria / Modificaciones postraslacionales.*
 - 5.2.3. *Estructura Cuaternaria: Agregados del Producto y Medición de los Agregados*
 - 5.2.4. *Glicosilación / Pegilación*
 - 5.2.5. *Impurezas con actividad coadyuvante*
 - 5.2.6. *Propiedades inmuno-moduladoras de las proteínas terapéuticas*
 - 5.2.7. *Formulación*
 - 5.2.8. *Consideraciones sobre el sistema de envase/cierre*
 - 5.2.9. *Custodia del producto*
- 6. CONCLUSIONES**

PARTE II. DIAGNÓSTICO Y FISIOPATOLOGÍA DE LAS CONSECUENCIAS ADVERSAS DE RESPUESTAS INMUNES A PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS

- 1. DIAGNÓSTICO DE LA ANAFILAXIS**
- 2. SÍNDROME DE LIBERACIÓN DE CITOQUINAS**
- 3. RESPUESTAS INMUNES NO AGUDAS**
- 4. RESPUESTAS DE ANTICUERPOS A LAS PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS**

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

5. UTILIDAD DE LOS ESTUDIOS EN ANIMALES

PARTE III. DETALLES ADICIONALES SOBRE LOS MÉTODOS DE EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD

1. MODELOS PREDICTIVOS NO-CLÍNICOS

2. DESARROLLO DE ENSAYOS PARA LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR

2.1. Ensayos estratégicos

2.2. Ensayos para la detección de anticuerpos

2.3. Caracterización de anticuerpos frente a proteínas terapéuticas

3. DETALLES DE LOS MÉTODOS PARA LA EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD

3.1. Ensayos para anticuerpos

3.2. Características de los ensayos

3.3. Estandarización, materiales de referencia y ensayos de validación

REFERENCIAS

Continuación de la resolución “Por la cual se expide la “Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos” y se dictan otras disposiciones”

PARTE I. ASPECTOS GENERALES

1. INTRODUCCIÓN

La presente guía tiene el propósito de proporcionar lineamientos a los solicitantes de registro sanitario de medicamentos biológicos. Dichos lineamientos se basan en la evaluación del riesgo, así como en la mitigación de las respuestas inmunes o las respuestas adversas inmunológicamente asociadas con las proteínas terapéuticas que afectan su seguridad y eficacia. Cualquier aproximación para la evaluación y mitigación de la inmunogenicidad, está determinada por el análisis del caso concreto y debe tomar en consideración la evaluación del riesgo que se describe.

Para propósitos de la presente guía, se entiende por *inmunogenicidad* la capacidad de una proteína terapéutica o de sus coadyuvantes de formulación o impurezas para generar una respuesta inmune frente a ésta y hacia proteínas semejantes, y de inducir eventos adversos clínicos inmunológicamente relacionados. La inmunogenicidad puede ser generada por cualquier medicamento biológico, independientemente de su condición de pionero o competidor, y puede tener consecuencias clínicas sobre su eficacia o su seguridad. Por lo anterior, no es posible determinar ex ante, cuáles son las pruebas particulares para evaluar la inmunogenicidad de todos los productos, lo que existe son modelos y lineamientos que, aplicados caso a caso, aportan información determinante como herramientas de caracterización, que van desde las pruebas analíticas hasta las in vivo y deben ser aplicadas para evaluar la inmunogenicidad en el caso concreto.

La parte I “*Aspectos Generales*”, describe las consecuencias clínicas importantes de respuestas inmunes a proteínas terapéuticas y proporciona recomendaciones para la mitigación y minimización del riesgo en la fase de desarrollo clínico y post-comercialización. También describe factores relacionados con pacientes y productos específicos que pueden afectar la inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas. Para cada factor, se hacen recomendaciones dirigidas a los solicitantes de registro sanitario que pueden ayudarles a reducir la probabilidad de que estos productos generen una respuesta inmune no deseada.

La Parte II “*Diagnóstico y Fisiopatología de las Consecuencias Adversas de Respuestas Inmunes a Proteínas Terapéuticas*”, provee información suplementaria para el diagnóstico y fisiopatología de las consecuencias adversas particulares de respuestas inmunes a proteínas terapéuticas y una breve discusión de los usos de los ensayos en animales y la realización de pruebas de inmunogenicidad.

La Parte III “*Detalles Adicionales Sobre los Métodos De Evaluación y Caracterización de la Inmunogenicidad*”, comprende información sobre los modelos predictivos no-clínicos y desarrollo de ensayos para la respuesta inmune humoral y celular, detalles de los métodos para la evaluación y caracterización de la inmunogenicidad.

Esta guía comprende productos usados para modular o modificar la respuesta inmune, incluidos los que son antígeno-específicos, no cubre productos cuyo propósito es inducir una respuesta inmune específica para prevenir o tratar una enfermedad o condición (como vacunas para prevenir enfermedades infecciosas) o para potenciar la actividad de otras intervenciones terapéuticas.

Adicionalmente, esta guía incluye los lineamientos generales que serán aplicados en cada situación particular, en consecuencia, con la normativa nacional.

2. ANTECEDENTES

Las respuestas inmunes a las proteínas terapéuticas pueden significar problemas tanto para la seguridad de los pacientes como para la eficacia de los productos. Los eventos adversos a nivel de la respuesta inmune, **como la anafilaxia, el síndrome de liberación de citoquinas**

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

y la neutralización de proteínas endógenas por reactividad cruzada (Parte II) han ocasionado el abandono del desarrollo de proteínas terapéuticas que podrían haber sido eficaces. Las respuestas indeseadas a proteínas terapéuticas pueden también neutralizar su actividad biológica y resultar en eventos adversos que no solo inhiben la eficacia del medicamento biológico, sino que reaccionan de forma cruzada con su contraparte proteica endógena, generando una pérdida de su función fisiológica, por ejemplo anticuerpos neutralizantes frente a eritropoyetinas terapéuticas que causan aplasia pura de células rojas, por efecto neutralizante sobre la proteína endógena (Hermeling et al. 2004; Rosenberg and Worobec 2004; Rosenberg and Worobec 2005; Koren et al. 2008; Murphy 2011).

Dado que la mayoría de los efectos adversos que resultan de la activación de una respuesta inmune a un medicamento biológico parecen estar generalmente mediados por mecanismos humorales, el anticuerpo circulante contra el medicamento biológico ha sido el principal criterio para definir una respuesta inmune a esta clase de productos (La mayoría de las respuestas de anticuerpos IgG and IgE están asociados con eventos adversos clínicos y su generación implica generalmente la colaboración entre antígenos específicos de células T ayudadoras y células B).

Existen factores relacionados tanto con el producto como con el paciente que pueden afectar la inmunogenicidad frente a las proteínas terapéuticas. Estos factores son elementos críticos de la evaluación de riesgo de la inmunogenicidad. Idealmente, estos factores deben tomarse en consideración en las etapas tempranas del desarrollo de proteínas terapéuticas. El numeral 3 de la parte I contiene una discusión detallada de la naturaleza y los factores de riesgo para la respuesta inmune a las proteínas terapéuticas, así como las posibles estrategias de mitigación y minimización que podrían ser utilizadas.

3. CONSECUENCIAS CLÍNICAS

El tratamiento de pacientes con proteínas terapéuticas, puede resultar en respuestas inmunes de variada relevancia clínica: desde generación de anticuerpos sin aparente manifestación clínica, hasta reacciones adversas que amenazan la vida. Durante el desarrollo de proteínas terapéuticas se debe procurar dilucidar los mecanismos inmunológicos que subyacen a la aparición de eventos adversos, pues esta información puede facilitar el desarrollo de estrategias para mitigar el riesgo de que se presenten (ver parte I, numeral 3.2.). La extensión de la información requerida para realizar la evaluación riesgo-beneficio variará según el producto del que se trate, de acuerdo con su origen y características, la respuesta inmune relevante, la indicación en la enfermedad objeto de estudio y la población de pacientes expuesta.

3.1. Consecuencias para la eficacia

En pacientes tratados con proteínas terapéuticas, el desarrollo de anticuerpos puede limitar la eficacia del producto. Los anticuerpos neutralizantes pueden bloquear la eficacia de las proteínas terapéuticas al elegir como blanco dominios críticos para la eficacia. Por ejemplo, anticuerpos que se unen ya sea al dominio catalítico o al de unión o captación de una enzima terapéutica pueden conducir a la pérdida de la eficacia del producto.

La pérdida de eficacia es problemática en todos los productos, pero es de mayor relevancia si el producto hace parte de una terapia vital. Los anticuerpos neutralizantes que reaccionan de manera cruzada con una contraparte endógena no redundante de la proteína terapéutica, también impactan la seguridad, como se discute el numeral 3.2.5. de la parte I.

Tanto los anticuerpos neutralizantes como los no neutralizantes pueden alterar la farmacocinética del producto por el incremento del aclaramiento (y por lo tanto reducir la vida media del anticuerpo en el suero) o, por el contrario, por el prolongamiento de la vida media del anticuerpo en el suero y la actividad del producto. Si un anticuerpo no neutralizante está presente en un título lo suficientemente alto puede unirse a un blanco equivocado de la proteína terapéutica por medio del receptor Fc (FcR) unido a las células, reduciendo o

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

eliminando la eficacia del producto (Brooks et al. 1998; Wang et al. 2008). Aunque algunas respuestas de anticuerpos a las proteínas terapéuticas pueden no tener efecto aparente en la seguridad o eficacia clínicas pueden promover la generación de anticuerpos neutralizantes vía el mecanismo de propagación epítope de respuesta de anticuerpos. (Disis et al. 2004; Hintermann et al. 2011).

Los biomarcadores de farmacodinámica pueden ser útiles en la evaluación de las interferencias con la actividad del producto mediada por anticuerpos, aunque la correlación con la respuesta clínica, es usualmente necesaria para determinar la relevancia clínica.

3.2. Consecuencias para la seguridad

Las consecuencias para la seguridad de la inmunogenicidad pueden variar ampliamente y a menudo son impredecibles en pacientes a los que se les administran proteínas terapéuticas. De esta manera, debe mantenerse un alto nivel de sospecha para los eventos clínicos que pueden originarse en tales respuestas, incluso si la evaluación de riesgo inicial sugiere un bajo nivel de inmunogenicidad. El solicitante debe proveer una base lógica del paradigma propuesto de evaluación de la inmunogenicidad. En los siguientes numerales se describen algunas de las más importantes preocupaciones sobre seguridad asociadas a la inmunogenicidad:

3.2.1. Anafilaxis

La anafilaxis es una reacción alérgica seria y aguda identificada por ciertas características clínicas. La definición actualmente aceptada se basa en criterios de diagnóstico clínico y no especifica un mecanismo inmunológico particular (Sampson et al. 2006). Históricamente, la definición de anafilaxis ha invocado la participación de anticuerpos IgE específicos. Sin embargo, una definición tan mecánica puede ser problemática en el contexto del desarrollo de proteínas terapéuticas y en otros escenarios clínicos en los que no siempre es posible identificar un mecanismo inmunológico específico, como base del evento adverso. Para capturar todos los potenciales eventos adversos de interés, se recomienda identificar todos los casos que cumplan con los criterios clínicos de anafilaxis, independientemente de la fisiopatología presumida. Información adicional como la evaluación de la histamina y de la triptasa séricas, así como de las fracciones del complemento luego de una reacción o de la detección de anticuerpos IgE asociados a un producto específico, pueden ayudar a dilucidar la fisiopatología de la respuesta anafiláctica y, por lo tanto, guiar las estrategias de control y mitigación.

Más aún, la sola presencia de anticuerpos anti-fármaco (ADA) no es necesariamente predictiva de reacciones anafilácticas o de hipersensibilidad. Para determinar la relevancia clínica de estos anticuerpos es típicamente requerida una correlación con respuestas clínicas. La determinación del mecanismo subyacente, sin embargo, sigue siendo de interés porque la anafilaxis con confirmación de la participación IgE, tiene ciertas implicaciones pronósticas para exposiciones repetidas y también para potenciales opciones terapéuticas de mitigación.

3.2.2. Síndrome de liberación de citoquinas

El síndrome de liberación de citoquinas es un complejo sintomático causado por la rápida liberación de citoquinas pro-inflamatorias por células inmunes (Stebbing et al. 2007; Stebbings et al. 2013). Aunque el síndrome de liberación de citoquinas no está directamente relacionado con la inmunogenicidad, la manifestación clínica de dicho síndrome se puede sobreponer a anafilaxis y otras reacciones adversas inmunológicamente relacionadas. Distinguir este complejo sintomático de otros tipos de reacciones adversas es potencialmente útil para propósitos de mitigación del riesgo. Aunque los mecanismos subyacentes puedan no ser comprendidos en su totalidad, en algunos casos el mecanismo parece estar relacionado a la reactividad cruzada de células que activan receptores expresados en la superficie, los cuales son el objetivo de la proteína terapéutica (por ejemplo, CD28 expresado en células T). En la fase temprana del desarrollo clínico debe realizarse una evaluación basada en el riesgo,

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

enfocada en el mecanismo de acción de la proteína terapéutica, así como en resultados de evaluaciones en animales e in vitro para determinar la necesidad de analizar niveles de citoquinas antes y después de la dosis (Los modelos animales en algunos casos pueden ser poco predictivos del comportamiento clínico, cuando se usen deberá definirse con claridad el valor agregado de la prueba y su potencial extrapolación en humanos). En caso de un evento adverso clínico, tal evaluación contribuye a la evidencia para apoyar el diagnóstico clínico del síndrome de liberación de citoquinas y contribuir a distinguirlo de otras reacciones medicamentosas agudas (por ejemplo, anafilaxis. Ver parte II, numerales 1 y 2)

3.2.3. Reacciones de infusión

Las proteínas terapéuticas pueden provocar un amplio rango de efectos agudos: desde leves reacciones sintomáticas, hasta reacciones repentinas y fatales que en el pasado han sido frecuentemente agrupadas como "reacciones de infusión o de administración". Aunque el término implica cierta relación temporal no está bien definido y pueden abarcar un amplio rango de eventos clínicos, incluida la anafilaxis y otros eventos que pueden no estar directamente relacionados con respuestas de anticuerpos, como el síndrome de liberación de citoquinas. En ausencia de una definición consensuada del término "reacción de infusión", la categorización de ciertos eventos adversos como éste sin más detalles, es problemática y no se recomienda. Por lo tanto, es importante que los solicitantes describan detalladamente la temporalidad, la duración y las señales y síntomas específicos observados luego de la administración de un medicamento biológico y proveer información sobre estudios de los mecanismos de acción que puedan facilitar la estrategia de mitigación.

3.2.4. Reacciones no agudas

La anafilaxis, el síndrome de liberación de citoquinas y otras reacciones agudas están relacionadas temporalmente con la administración de proteínas terapéuticas. La hipersensibilidad retardada (como la enfermedad del suero) y las respuestas inmunes secundarias a formación de complejos inmunes tienen típicamente una manifestación sub-aguda. Como resultado, la asociación entre la administración del medicamento biológico y reacciones no agudas, puede ser más difícil de establecer y la evaluación del mecanismo subyacente probablemente requiera el análisis de complejos inmunes circulantes y activación del complemento. Los signos clínicos pueden incluir fiebre, brotes, artralgia, mialgia, hematuria, proteinuria, serositis, complicaciones del sistema nervioso central, anemia hemolítica, frente a una continua respuesta de anticuerpos al medicamento biológico (Hunley et al. 2004; Goto et al. 2009). Cuando se sospecha de una reacción como esta, la evaluación de laboratorio de complejos inmunes circulantes puede ayudar a confirmar el diagnóstico. La necesidad y el nivel de detalle de las evaluaciones de laboratorio, dependerá de cada situación individual.

3.2.5. Reactividad cruzada a proteínas endógenas

Un ADA puede tener consecuencias severas, si inhibe y reacciona cruzadamente con contrapartes endógenas no redundantes de la proteína terapéutica o proteínas relacionadas (Macdougall et al. 2012; Seidl et al. 2012). Si la proteína endógena es redundante en cuanto a la función biológica, la inhibición de las proteínas terapéuticas y endógenas puede no producir un síndrome clínico obvio hasta que el sistema se estrese, porque no todas las funciones biológicas de una proteína endógena pueden ser conocidas o completamente caracterizadas (Stanley et al. 1994; Bukhari et al. 2011). Incluso, las consecuencias a largo plazo del uso de tales anticuerpos pueden no ser conocidos. Una consecuencia adicional de la reactividad cruzada a proteínas endógenas resulta en respuestas de anticuerpos a una proteína terapéutica cuya contraparte endógena está en una superficie celular o de una citoquina endógena expresada en una membrana. Tales anticuerpos pueden unirse de manera cruzada a los respectivos receptores de la superficie celular o a proteínas, causando liberación de citoquinas u otras manifestaciones de activación celular.

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

Para las proteínas terapéuticas con contraparte endógena que son críticas para el desarrollo normal de los fetos o los neonatos, la neutralización de tales proteínas endógenas, derivada de anticuerpos generados contra proteínas terapéuticas que reaccionan cruzadamente con una contraparte endógena, tiene el potencial de impactar negativamente el desarrollo del feto o del neonato, cuando estas respuestas inmunes son generadas o estimuladas durante el embarazo o la lactancia. Como parte de la evaluación del riesgo, los solicitantes deben considerar la potencial transmisión de anticuerpos al feto a través de la placenta o a través de la leche humana, en neonatos. Así pues, es necesario evaluar el riesgo del desarrollo de anticuerpos neutralizantes luego de la administración de tales proteínas terapéuticas a una mujer en edad fértil, a la luz del potencial beneficio. Aún más, se ha de evaluar en población pediátrica el riesgo de desarrollar anticuerpos neutralizantes frente a proteínas endógenas críticas para el crecimiento y desarrollo más allá del período neonatal.

Aunque los estudios en animales pueden proveer información útil sobre las posibles consecuencias de la inhibición de una proteína endógena, particularmente en relación con proteínas altamente conservadas evolutivamente, dichos estudios no son considerados predictivos de la probabilidad de una respuesta inmune en humanos a una proteína terapéutica. Inclusive, diferencias en la medida de la duración y extensión de la transferencia de anticuerpos maternos a través de la placenta puede limitar la utilidad de los estudios en animales para evaluar los efectos intrauterinos de anticuerpos que reaccionan cruzadamente con contrapartes endógenas de la proteína terapéutica.

4. RECOMENDACIONES PARA LA MITIGACIÓN DEL RIESGO DE INMUNOGENICIDAD EN LA FASE CLÍNICA DEL DESARROLLO DE PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS.

Dada la variedad de factores que pueden afectar la inmunogenicidad, la evaluación del riesgo y las estrategias de control y mitigación dependerán del programa de desarrollo individual y deberán considerarse en la etapa más temprana de desarrollo del producto y en cada etapa subsecuente. La extensión de la información de seguridad a nivel de la inmunogenicidad, requerida en el pre-mercadeo y en el post-mercadeo variará, dependiendo de la potencial severidad de las consecuencias de tales respuestas inmunes y la probabilidad de su ocurrencia. Para evaluar la relevancia clínica de las respuestas inmunes, esta guía provee las siguientes recomendaciones:

4.1. Ensayos para anticuerpos anti-fármacos (ADA)

Los solicitantes deben implementar inmuno-ensayos sensibles adecuados a la totalidad del programa de desarrollo del producto. Se debe realizar una valoración concomitante de los niveles de la proteína terapéutica en la muestra, para valorar el potencial de la presencia del producto de interferir con la detección de anticuerpos en el ensayo. Se usará la abreviatura del inglés ADA, que corresponde a Anti Drug Antibodies.

4.2. Consideraciones sobre las muestras de anticuerpos para productos específicos

Se deben recolectar muestras para la detección de ADA que sirvan de línea base y la frecuencia y duración del muestreo posterior a la línea base deben reflejar el uso anticipado o temprano del producto. Es apropiado hacer un muestreo más frecuente durante la iniciación y el uso temprano de un producto nuevo para patologías que requieren administración crónica del mismo; un muestreo menos frecuente puede ser apropiado luego de un uso prolongado. Los muestreos repetidos deben tener lugar, por lo general, durante períodos de duración suficientes para determinar si estas respuestas son persistentes, neutralizantes y asociadas con secuelas clínicas. Las muestras para la evaluación de anticuerpos deben tomarse antes de la administración del medicamento biológico.

Adicionalmente es necesaria una programación preestablecida de toma de muestras y muestreos no programados asociados con sospechas de eventos adversos de tipo inmunológico para el establecimiento de la relevancia clínica de los ADAs. El solicitante debe presentar un plan de toma de muestras para la detección de ADA en la fase post-

Continuación de la resolución *“Por la cual se expide la “Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos” y se dictan otras disposiciones”*

comercialización en los casos en los que se obtuvieron resultados positivos al final del ensayo, de forma que se analice la importancia clínica de los mismos, si existiera. La toma de muestras post-comercialización en pacientes que participaron en el ensayo pre comercialización, deberá contar con consentimiento informado. Igualmente, el almacenamiento de las muestras de suero usadas en ensayos clínicos, para evaluaciones posteriores, deben ser almacenadas en condiciones apropiadas, siguiendo procedimientos estandarizados.

4.3. Dosificación

Para los primeros ensayos en humanos debe adoptarse una aproximación conservadora, en un escenario médico apropiado con acceso inmediato a cuidados de apoyo en el caso de un evento adverso serio como la anafilaxis, con un apropiado esquema de dosificación escalonada en pacientes individualmente y según las cohortes de dosificación. El diseño del ensayo debe incluir criterios preestablecidos de escalamiento de dosis e intervalos adecuados de tiempo entre las cohortes de dosificación y, según sea apropiado para la farmacocinética y farmacodinámica del producto, entre individuos dentro de una cohorte de dosificación con el fin de evaluar toxicidades antes de administrar las dosis subsecuentes o incluir individuos adicionales. La necesidad de tal aproximación dependerá de las circunstancias individuales. Aparte de los primeros ensayos en humanos, puede haber otras situaciones en las que una aproximación conservadora similar puede estar indicada, por ejemplo: cambios en la ruta de administración, cambios en la formulación o cambios en el sistema de cierre del envase. En la medida en que el desarrollo del producto progresa, las estrategias de dosificación y los parámetros de seguridad pueden ser modificados con base en la experiencia clínica con el producto u otros productos de la misma clase.

Debido a que puede ser difícil predecir la incidencia de aparición de anticuerpos específicos contra el producto, en diferentes escenarios de los ensayos clínicos, los regímenes de dosis en ensayos subsecuentes deben estar basados en riesgo y tomar en cuenta lo siguiente: información de los ensayos iniciales; el potencial de que se presente reactividad cruzada a proteínas endógenas y la predicción de sus efectos; la severidad de los efectos de la neutralización de la proteína terapéutica (por ejemplo tratamiento que salva vidas vs. tratamiento adyuvante); parámetros clínicos que afectan la inmunogenicidad en distintas poblaciones de pacientes; lo adecuado de la propuesta de seguimiento de la seguridad (Koren et al. 2008).

Las dosis altas de proteínas terapéuticas no superan de manera uniforme respuestas de anticuerpos neutralizantes con alta titulación y/o sostenidas y pueden impactar la seguridad, por ejemplo, pueden precipitar enfermedad mediada por complejos inmunes o causar otras toxicidades. Lo apropiado de tal estrategia de escalamiento de dosis depende del producto específico, la magnitud de la respuesta de anticuerpos y la indicación de la enfermedad. Antes de la implementación del escalamiento de dosis, debe desarrollarse un protocolo que defina evaluaciones específicas de seguimiento a la seguridad y reglas para suspenderla, con el fin de superar la respuesta de anticuerpos.

4.4. Eventos adversos

El desarrollo de anticuerpos neutralizantes o la presencia sostenida de títulos de anticuerpos puede conducir a la pérdida de eficacia o al aumento del riesgo de una reacción adversa. En algunas situaciones de alto riesgo (por ejemplo, evaluación de un producto con una contraparte endógena no redundante), se recomienda por razones de seguridad la evaluación en tiempo real de anticuerpos durante un ensayo clínico. Las evaluaciones en tiempo real implican análisis de las muestras lo más pronto posible después de la toma de las mismas, antes de almacenarlas y antes de suministrar dosis adicionales. La necesidad de un seguimiento tan intensivo dependerá de las circunstancias individuales.

Se recomienda al solicitante el estudio de mecanismos subyacentes e identificar cualquier factor crítico contribuyente cuando se observen respuestas inmunes clínicamente relevantes, con el fin de facilitar el desarrollo y adopción de estrategias potenciales de control y mitigación,

Continuación de la resolución “Por la cual se expide la “Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos” y se dictan otras disposiciones”

incluida la modificación de la formulación del producto y la selección de pacientes de alto riesgo.

En algunos casos, los solicitantes pueden escoger explorar pre-medicación, desensibilización y procedimientos de inducción de inmuno-tolerancia como potenciales estrategias de mitigación. Dados los riesgos asociados con la desensibilización o los procedimientos de inducción de inmuno-tolerancia y el riesgo potencial de que la pre-medicación enmascare signos y síntomas tempranos de eventos adversos, lo apropiado de dichos procedimientos dependerá de la naturaleza de la indicación específica, la población de pacientes objetivo y el estado de desarrollo.

4.5. Alcance de los estudios clínicos de inmunogenicidad cuando se realizan comparaciones.

- En los casos en los que se realicen estudios de inmunogenicidad comparativos (por ejemplo aquellos que comparan los eventos adversos inmunológicamente relacionados, incidencia de anticuerpos, título o actividad neutralizante al producto antes y después de los cambios en el proceso de manufactura), se deben proporcionar los argumentos y criterios con el fin de justificar las diferencias en la incidencia o severidad de la respuesta inmune que pueden constituir diferencias inaceptables en la seguridad del producto.
- La necesidad, extensión y tiempo de los estudios clínicos de inmunogenicidad en el contexto de la evaluación de los efectos de un cambio en la manufactura dependerá de factores como el grado de comparabilidad analítica entre el proceso antes y después del cambio de manufactura, hallazgos de estudios informativos comparativos en animales y la incidencia y consecuencias clínicas de respuestas inmunes al producto antes del cambio de manufactura. Por ejemplo, si la consecuencia clínica de una respuesta inmune es severa (como cuando el producto es una contraparte terapéutica de una proteína endógena con una función biológica crítica no redundante o se sabe que provoca anafilaxis) probablemente se requerirá mayor evaluación de la inmunogenicidad.
- En relación con proteínas competidoras, lo anterior aplicará para determinar la extensión y tiempo de los estudios de inmunogenicidad.
- En el caso de las proteínas terapéuticas competidoras se requiere que la similitud de la eficacia y seguridad sean claramente deducidas desde las características fisicoquímicas, actividad biológica/potencia y los perfiles PK y/o PD del competidor y el producto de referencia o estándar farmacopéico de referencia (en lo que se refiere a la fase de caracterización físico-química).

4.6. Seguimiento post-comercialización

El seguimiento robusto de la seguridad post-mercadeo es un componente importante para garantizar la seguridad y efectividad de las proteínas terapéuticas.

Los riesgos de seguridad raros, pero potencialmente serios (por ejemplo, efectos adversos relacionados con la respuesta inmune), pueden no ser detectados durante las pruebas clínicas realizadas antes de la aprobación, porque el tamaño de la población expuesta puede no ser lo suficientemente grande para valorarlos. En algunos casos, puede ser necesario evaluar tales riesgos a través de la vigilancia post-mercadeo o estudios específicos o ensayos clínicos.

Debido a que algunos aspectos de la seguridad post-mercadeo son específicos para cada producto, los solicitantes deben presentar un plan de seguimiento post-mercadeo de la seguridad. Se recomienda que en el marco de los Planes de Gestión de Riesgo (PGR) se realice un análisis de los resultados de la evaluación y caracterización de la inmunogenicidad en pacientes colombianos, como es el caso de la valoración de anticuerpos

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

anti-fármaco (ADA). La presentación de esta valoración y otros datos de seguridad post-mercadeo dependen de factores como:

- Factores relacionados con la enfermedad como su prevalencia, vulnerabilidad de los pacientes, disponibilidad de alternativas terapéuticas, duración de los tratamientos, etc.
- Los hallazgos de inmunogenicidad pre-comercialización, incluyendo el impacto sobre la seguridad y eficacia.
- La experiencia de inmunogenicidad con proteínas terapéuticas similares o de la misma clase terapéutica, incluyendo las proteínas producidas con procesos de producción semejantes.

5. FACTORES ESPECÍFICOS DE LOS PACIENTES Y LOS PRODUCTOS QUE AFECTAN LA INMUNOGENICIDAD

5.1. Factores específicos de los pacientes que afectan la inmunogenicidad

Los factores que se describen a continuación relacionados con los pacientes pueden incrementar o disminuir el potencial riesgo asociado con una respuesta inmune. En consecuencia, se recomienda precaución cuando se cambie de una población de pacientes con unas características a una población con otras características y debe realizarse una nueva evaluación de riesgo para cada nueva población de pacientes con características diferentes que se considere tratar.

5.1.1. Estado inmunológico y competencia del paciente

Los pacientes que están inmuno-suprimidos pueden tener menor riesgo de presentar respuestas inmunes a las proteínas terapéuticas que los voluntarios sanos con respuestas inmunes intactas. Por ejemplo, el 95% de pacientes de cáncer inmuno-competentes generaron anticuerpos neutralizantes al factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF); pero solo el 10% de pacientes con cáncer inmuno-comprometidos lo hicieron en respuesta al GM-CSF (Ragnhammar et al. 1994). Los agentes inmuno-supresores pueden disminuir la respuesta inmune a proteínas terapéuticas. Por ello, los agentes que matan linfocitos activados por antígenos y/o que provocan la actividad de células T reguladoras, como el metrotexato, han mostrado tener un efecto sustantivo en la inmunogenicidad de anticuerpos monoclonales u otros anticuerpos que son co-administrados (Baert et al. 2003).

En contraste con los pacientes inmuno-suprimidos, los pacientes con un sistema inmune activado (por ejemplo, pacientes con algunas infecciones o con enfermedades auto-inmunes) pueden tener respuestas aumentadas. La generación de una respuesta inmune también puede estar afectada por la edad del paciente, particularmente en los rangos de edad extremos (LeMaout et al. 1997; PrabhuDas et al. 2011; Cuenca et al. 2013; Goronzy and Weyand 2013). Se debe tener particular cuidado en relación con la inmunogenicidad y las respuestas inmunes en los estudios que evalúan productos terapéuticos nuevos en voluntarios sanos (Li et al. 2001; Stebbings et al. 2007; Colombel et al. 2010; Garces et al. 2013)

En el desarrollo de proteínas terapéuticas, debe darse una razón fundamental para apoyar la selección de la población de estudio apropiada, especialmente para los primeros estudios con humanos. La potencial influencia de medicamentos concomitantes en los ADAs debe ser tomada en cuenta durante todas las etapas de desarrollo clínico.

5.1.2. Sensibilización anterior / historia de alergias

La exposición previa a una proteína terapéutica o a una proteína estructuralmente similar puede conducir a anticuerpos pre-existentes detectados en la línea de base. Esta es una preocupación particular en pacientes que reciben un producto de reemplazo como factores de coagulación o terapia de reemplazo de enzimas, los cuales pueden tener anticuerpos a un producto anterior o pueden reaccionar de manera cruzada a un producto análogo.

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

La sensibilización a los excipientes o a impurezas relacionadas con el proceso de producción del medicamento biológico puede también predisponer al paciente a una consecuencia clínica adversa. Por ejemplo, los productos originados por fuentes transgénicas pueden contener proteínas alergénicas foráneas como proteínas lácteas o proteínas de huevo de pollo.

Dado que la historia del paciente puede no capturar toda la exposición previa que pudiera haber generado una respuesta de anticuerpos pre-existente o predecir la anafilaxia, se debe considerar, cuando sea apropiado, hacer exámenes para determinar la pre-existencia de anticuerpos, como por ejemplo anticuerpos inhibidores o neutralizantes en terapias de reemplazo de factores.

Para la selección de pacientes a incluir en los estudios clínicos, se recomienda realizar un examen de la historia de alergias relativas a la fuente de material de las proteínas terapéuticas (por ejemplo, las producidas en huevos transgénicos de gallina vs. células de mamíferos). Debe considerarse si es apropiada la realización de pruebas de laboratorio o clínicas adicionales antes de la administración, a la luz de la evaluación riesgo/beneficio general.

5.1.3. Vía de administración, dosis y frecuencias de administración

La vía de administración puede afectar el riesgo de sensibilización. En general, las vías de administración intradérmica, subcutánea y por inhalación están asociadas con un incremento de la inmunogenicidad en comparación con las vías intramusculares o intravenosas (IV). La vía IV es considerada como la que menos probabilidad tiene de generar una respuesta inmune. Junto con la vía de administración, la dosis y la frecuencia también pueden afectar la inmunogenicidad (Rosenberg and Worobec 2004). Por ejemplo, en algunas circunstancias, una dosis baja administrada de manera intermitente puede ser más inmunogénica que una dosis mayor administrada sin interrupción. Es importante notar que los efectos de la dosis y la frecuencia en el desarrollo de ADA puede estar afectada por otros factores como la ruta de administración, el origen del producto, y factores relacionados con el producto que influyen en la inmunogenicidad.

Se debe considerar la inmunogenicidad en la selección de una vía de administración apropiada, especialmente para las proteínas terapéuticas de alto riesgo (por ejemplo, contrapartes terapéuticas de proteínas endógenas no redundantes) en primera dosificación en humanos.

Los cambios en la vía de administración o dosificación durante el desarrollo de productos pueden estar asociados con los cambios en el perfil de inmunogenicidad y deben obtenerse datos de seguridad clínica para justificar dichos cambios.

5.1.4. Estado Genético

Los factores genéticos pueden modular la respuesta inmune a un medicamento biológico. En particular, algunos haplotipos de antígenos leucocitarios humanos (HLA) pueden predisponer a los pacientes al desarrollo de respuestas no deseadas de anticuerpos a productos específicos (Hoffmann et al. 2008). Si es apropiado y factible, los estudios de mapeo HLA pueden ayudar a definir un subconjunto de la población de pacientes en mayor riesgo. Por otra parte, los polimorfismos genéticos en genes de citoquinas pueden regular positiva o negativamente la respuesta inmune (Donnelly et al. 2011).

Se recomienda la evaluación de los factores genéticos que pueden modular la respuesta inmune a un medicamento biológico en circunstancias en las que un subgrupo de pacientes tratados pierde el beneficio clínico del tratamiento o experimentan eventos adversos severos. Por ejemplo, el subgrupo de pacientes que generan anticuerpos neutralizantes a productos de IFN-beta tienen más probabilidades de poseer distintos haplotipos HLA (Hoffmann et al. 2008). Por lo tanto, el conocimiento de la susceptibilidad exacerbada de los pacientes con

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

este tipo de haplotipos HLA puede permitir medidas para prevenir este tipo de respuestas o para búsqueda de otras opciones de tratamiento.

5.1.5. Estado de Inmuno-Tolerancia a la proteína endógena

Los seres humanos no son igualmente inmuno-tolerantes a todas las proteínas endógenas. Por lo tanto, el nivel de la inmuno-tolerancia a una proteína endógena afecta la capacidad de una proteína terapéutica contraparte de una proteína endógena para revertir dicha tolerancia. La inmuno-tolerancia células T y B proteína-específicas depende de muchos factores, entre los que destacan la abundancia de la proteína endógena: la inmuno-tolerancia es más débil para las proteínas de baja abundancia y más fuerte para las altas abundancias (Weigle 1980; Goodnow 1992; Haribhai et al 2003).

El sistema inmune humano no es totalmente tolerante a las proteínas endógenas de baja abundancia, como las citoquinas y factores de crecimiento, para las cuales los niveles séricos pueden estar en el rango de nanogramos (ng) / mililitro (ml) a picogramos (pg) / ml. Este aspecto cobra relevancia por la presencia de auto-anticuerpos a las citoquinas y factores de crecimiento en individuos sanos; el desarrollo de anticuerpos a citoquinas inflamatorias; y la reducción de la tolerancia a las proteínas endógenas por la administración de proteínas terapéuticas recombinantes exógenas (Hermeling et al 2004; Rosenberg y Worobec 2004; Rosenberg y Worobec 2005; Koren et al 2008).

Cuando se pretende usar una proteína terapéutica de origen humano para el reemplazo de una proteína endógena ausente o deficiente, los pacientes con mutaciones genéticas que confieren un fenotipo que no expresa la proteína (knock out) pueden responder a la proteína terapéutica como si fuera un neoantígeno o pueden estar ya sensibilizados como el resultado de una exposición previa a una proteína terapéutica u otras proteínas provenientes de otras fuentes. Tales respuestas pueden anular la eficacia de la terapia de reemplazo.

Para un producto terapéutico que es una contraparte de una proteína endógena, se recomienda investigar el nivel de inmuno-tolerancia a la proteína endógena antes de iniciar un ensayo clínico considerando riesgos relevantes como: si el estudio clínico implica el uso en humanos por primera vez, si la proteína endógena tiene una función fisiológica no redundante y si las respuestas inmunes a la proteína endógena han sido detectadas en el contexto de una enfermedad autoinmune. Las evaluaciones sugeridas incluyen:

- Cuantificación o recolección de información sobre el nivel de proteína endógena en el suero en el estado estable, así como en condiciones específicas que puedan generar su producción (Weigle 1980).
- Evaluación o recolección de información sobre la presencia de anticuerpos pre-existentes en individuos sanos y en poblaciones de pacientes y sobre la frecuencia y el rol de dichos anticuerpos en enfermedades autoinmunes (Bonfield et al. 2002; Hellmich et al. 2002).
- Evaluación de la inmunogenicidad, activación de células inmunes, respuestas inflamatorias y liberación de citoquinas en los estudios relevantes en animales para obtener tendencias y proveer directrices en evaluaciones de la seguridad clínica. (La valoración de la información de modelos animales considerando su valor agregado o su correlación con el comportamiento en humanos, aunque en parte II este asunto se deja claro). (Koren 2002). Ver también la parte II numeral 5.
- En pacientes que requieren terapias de reemplazo de factores/enzimas, debe considerarse fuertemente la evaluación de muestras de los tejidos del paciente para la detección de proteínas endógenas o péptidos (por ejemplo material inmunológico que reacciona de manera cruzada -CRIM-), así como mutaciones genéticas y alelos HLA (según sea apropiado) con el fin de predecir mejor el desarrollo de respuestas inmunes a la terapia de reemplazo y para evaluar la necesidad de estrategias de mitigación de la inducción de la tolerancia (Pandey et al. 2013).
- Según sea apropiado, evaluar la extensión de polimorfismos, incluyendo polimorfismos de nucleótido único en poblaciones de pacientes relevantes para identificar la posible

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

alteración funcional de la proteína terapéutica (Jefferis and Lefranc 2009; Viel et al. 2009; Pandey et al. 2013). Es importante señalar que no siempre los polimorfismos inducen una actividad funcional distinta.

5.2. Factores específicos de los productos que afectan la inmunogenicidad

Existen factores específicos de los productos que pueden aumentar o disminuir el potencial de una respuesta inmune y los riesgos asociados con la misma. El solicitante debe considerar hacer una evaluación de la inmunogenicidad cuando se hacen cambios a factores específicos de los productos.

5.2.1. Origen del producto (humano o foráneo)

Las respuestas inmunes a proteínas no humanas (es decir foráneas) son esperadas y, como se explicó previamente, pueden ser anticipadas para proteínas humanas endógenas. Más aún, los desajustes entre las secuencias de una proteína endógena del paciente y las secuencias de la proteína terapéutica, causados por polimorfismos que ocurren naturalmente, son un factor de riesgo para el desarrollo de respuestas inmunes al medicamento biológico (Viel et al. 2009). Sin embargo, la velocidad de desarrollo de la respuesta, su potencia (título) y persistencia pueden depender de varios factores, incluidos los siguientes: exposición ambiental previa o continua y la modalidad de tal exposición; la presencia en el producto de factores inductores de inmunidad como agregados de producto y auxiliares de formulación activos; y la actividad inmuno-moduladora inherente al producto (ver parte I, numeral 5.2.6.). Por ejemplo, la exposición ambiental a proteínas bacterianas de bacterias comensales o patogénicas en la piel o en el intestino pueden predisponer la generación de respuestas inmunes cuando tales proteínas bacterianas (tanto recombinantes como derivadas naturalmente) son usadas como terapéuticas.

En relación con proteínas que se derivan de fuentes naturales, pueden desarrollarse anticuerpos no sólo contra la proteína terapéutica deseada, sino contra otros componentes protéicos foráneos potencialmente presentes en el producto. Inclusive, tales proteínas foráneas pueden contener regiones de homología hacia proteínas humanas endógenas. La capacidad de una proteína foránea para romper la tolerancia e inducir respuestas de anticuerpos al factor humano homólogo debe ser evaluada en el ensayo clínico. Por ejemplo, durante el tratamiento con un producto de trombina bovina, la respuesta inmune al factor V de coagulación bovino, presente incidentalmente en el producto, condujo al desarrollo de anticuerpos que reaccionaron de manera cruzada con el factor V humano y resultó en un sangrado amenazante de la vida en algunos pacientes (Kessler and Ortel 2009).

En relación con los anticuerpos monoclonales, el origen del producto es un factor importante que puede influenciar la inmunogenicidad. Aunque los anticuerpos de ratones han mostrado provocar, de manera robusta, reacciones inmunes en humanos en comparación con los anticuerpos monoclonales quiméricos, humanizados y humanos, debe notarse que éstos últimos también pueden provocar inmunogenicidad en altas proporciones dependiendo del régimen de dosis y la población de pacientes (Singh 2011). De hecho, algunos anticuerpos humanos desarrollados al usar fagos desplegados pueden generar respuestas ADA significativas.

Es más, formatos estructurales novedosos, incluyendo las proteínas de fusión, anticuerpos bi-específicos o multi-específicos (bivalentes o tetravalentes), fragmentos de cadena única, anticuerpos de dominio único y anticuerpos de ingeniería específica con mutaciones en las regiones constantes o variables, pueden provocar respuestas inmunes, dado que dichas estructuras novedosas pueden crear neo-antígenos o exponer epítopes crípticos. Adicionalmente, mutaciones de sitios específicos en regiones constantes pueden crear alotipos novedosos y el uso de un proceso in vitro de maduración de la afinidad puede resultar en idiotipos novedosos. La comprensión de la inmunogenicidad incrementada asociada con ciertos productos de anticuerpos requerirá una caracterización más completa de la respuesta ADA, como por ejemplo la identificación del epítipo/ epítopes (Singh 2011).

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

Se debe evaluar el potencial inmunogénico de las impurezas de producto y de proceso, incluidos los contenidos proteicos y no proteicos y con base en dicha evaluación, el solicitante debe diseñar un programa de pruebas. Adicionalmente si la proteína foránea a las que se quiera dar un uso terapéutico, tiene regiones que mantienen una fuerte homología con proteínas endógenas humanas se debe realizar una evaluación de anticuerpos a la proteína homóloga humana además de la evaluación de anticuerpos a la proteína terapéutica foránea.

Al desarrollarse los ensayos para evaluar la inmunogenicidad de nuevo productos relacionados con anticuerpos, se deben incorporar los controles apropiados en el ensayo para determinar si la respuesta ADA está dirigida hacia nuevos epítopes.

5.2.2. Estructura Molecular Primaria / Modificaciones postraslacionales.

Las secuencias primarias, las estructuras de alto orden, el origen de las especies y el peso molecular de las proteínas terapéuticas, son factores importantes que pueden contribuir a la inmunogenicidad. El análisis de la secuencia primaria puede revelar diferencias en la secuencia potencialmente inmunogénicas en las proteínas que de otra manera están relativamente conservadas entre humanos y animales. En algunos casos, epítopes no humanos pueden inducir la respuesta de células T o promover la generación de epítopes humorales (anticuerpos) frente a secuencias humanas conservadas (Dalum et al. 1997). Según el numeral 5.1.4 de la parte I, es importante notar que las proteínas terapéuticas de origen humano pueden provocar respuestas inmunes en subgrupos de pacientes con haplotipos HLA particulares, así como en pacientes cuya secuencia de aminoácidos de la proteína endógena difiere de aquella de la proteína terapéutica, incluso en un solo nucleótido.

Los análisis avanzados adicionales de las secuencias primarias también pueden probablemente detectar epítopes de unión a HLA de la clase II en proteínas humanas no polimórficas. Tales epítopes pueden provocar y activar células T regulatorias, las cuales refuerzan la auto-tolerancia, o, por el contrario, pueden activar células T ayudantes (Th) cuando la inmuno-tolerancia a las proteínas endógenas no es robusta (Barbosa and Celis 2007; Tatarewicz et al. 2007; De Groot et al. 2008; Weber et al. 2009). Sin embargo, si se considera apropiado, la ingeniería de los cambios de la secuencia primaria para eliminar epítopes reconocidos por células Th inmunogénicas o la adición de epítopes reconocidos por células T tolerogénicas debe hacerse de manera cautelosa porque estas modificaciones pueden alterar atributos críticos de calidad del producto como la agregación, la desaminación y la oxidación y pueden por lo tanto alterar la estabilidad y la inmunogenicidad del producto.

En consecuencia, deben realizarse evaluaciones y pruebas extensivas de los atributos críticos del producto, después de tales cambios. Las consideraciones sobre la secuencia primaria son especialmente importantes en la evaluación de la inmunogenicidad de las proteínas de fusión porque pueden provocarse respuestas inmunes a neo-antígenos formados en la región de unión (Miller et al. 1999) y pueden luego extenderse a segmentos conservados de la molécula. Las proteínas de fusión formadas por una proteína foránea y una endógena son de particular cuidado por la capacidad de la proteína foránea de inducir a una respuesta de células T frente a la proteína endógena. De manera similar, las proteínas de bioingeniería comprenden la introducción de secuencias que no se encuentran normalmente en la naturaleza y por lo tanto puede contener neo-epítopes. Estos epítopes tienen el potencial amplio de provocar respuestas inmunes o pueden, en su lugar, interactuar con alelos HLA que se encuentran sólo en un subgrupo de pacientes con el fin de inducir respuestas inmunes. (Kimchi-Sarfaty et al. 2013).

Las modificaciones químicas de las proteínas terapéuticas, tales como la oxidación, la desaminación, la modificación aldehídica y la deiminación, pueden provocar respuestas inmunes por ejemplo al modificar la secuencia primaria, causar formación de agregados o alterar el procesamiento y la presentación de antígenos. Es importante tener en cuenta que tales cambios pueden estar bien controlados durante la manufactura y el almacenamiento, pero pueden ocurrir *in vivo* en un contexto de un pH relativamente alto del entorno *in vivo* o

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

en entornos inflamatorios y pueden causar pérdida de la actividad, así como provocar respuestas inmunes. La evaluación de los medicamentos biológicos en el contexto del entorno *in vivo* para el cual son blanco puede revelar la susceptibilidad a tales modificaciones químicas (Huang et al. 2005; Demeule et al. 2006; Makrygiannakis et al. 2006). La susceptibilidad a las modificaciones de las proteínas terapéuticas y por lo tanto la posibilidad de pérdida de la actividad o la inducción a respuesta inmunes *in vivo*, deben estimular la reflexión en torno a una ingeniería cuidadosa de las proteínas.

Se recomienda llevar a cabo pruebas con capacidad de evaluar la reactividad a la totalidad de la molécula, así como a sus distintos componentes. Se debe otorgar especial cuidado a las secuencias primarias escogidas para el desarrollo de las proteínas terapéuticas en general y especialmente a las que son contrapartes de proteínas endógenas, dados los potenciales polimorfismos de las proteínas endógenas a través de las poblaciones humanas.

Las respuestas ADA a las moléculas de fusión o versiones de ingeniería de proteínas terapéuticas, deben evaluarse por medio de ensayos que sean capaces de determinar la reactividad a la totalidad de la molécula, así como a sus distintos componentes. Las respuestas inmunes dirigidas al producto proteico intacto pero que no sean reactivas a alguna de las proteínas asociadas pueden tener como blanco epítopes novedosos en la región de fusión (o bisagra).

La evaluación de proteínas terapéuticas en el medio *in vivo* en el que funcionan (por ejemplo, en ambientes inflamatorios o a pH fisiológico) puede revelar susceptibilidades a las modificaciones (por ejemplo, agregación o desaminación) que resultan en la pérdida de la eficacia o en la inducción de respuestas inmunes. Esta información puede facilitar la ingeniería del producto para aumentar su estabilidad ante tales circunstancias de estrés. Los solicitantes deben considerar obtener esta información en fases tempranas de diseño y desarrollo del producto.

5.2.3. Estructura Cuaternaria: Agregados del Producto y Medición de los Agregados

Los agregados proteicos están definidos como cualquier especie de proteína auto-asociada, con monómero definido como la sub-unidad funcional más pequeña y/o que ocurre naturalmente. Los agregados se clasifican así mismo con base en 5 características: tamaño, reversibilidad/disociación, conformación, modificación química y morfología (Narhi et al. 2012). Se reconoce desde hace más de medio siglo, que los agregados cuyo rango de tamaño va desde un dímero hasta cientos de micro-metros (Narhi et al. 2012), tienen un potencial de provocar respuestas inmunes a proteínas terapéuticas (Gamble 1966). Los mecanismos por los cuales los agregados proteicos pueden provocar o aumentar las respuestas inmunes son los siguientes: unión cruzada extensiva de receptores de células B, causando su eficiente activación (Dintzis et al. 1989; Bachmann et al. 1993); aumento del consumo, procesamiento y presencia de antígenos; disparo de las señales de peligro inmuno-estimulantes (Seong and Matzinger 2004). Tales mecanismos pueden aumentar el reclutamiento de células T ayudantes necesarias para la generación de anticuerpos IgG cambiados por isótopos, de alta afinidad, que es la respuesta de anticuerpos más frecuentemente asociada con la neutralización de la eficacia del producto (Bachmann and Zinkernagel 1997).

Las potenciales consecuencias clínicas de las respuestas inmunes inducidas por los agregados proteicos pueden depender, en gran medida, de la pérdida o preservación de epítopes nativos en el agregado. Algunos anticuerpos generados por los agregados que contienen proteínas nativas pueden unirse a la proteína monomérica así como al agregado, con el potencial de inhibir o neutralizar la actividad del producto. En contraste, algunos anticuerpos a proteínas desnaturalizadas/degradadas se unen únicamente a material agregado, pero no a monómeros de proteínas nativas, como en el caso de las primeras preparaciones de inmunoglobulina humana intravenosa (IVIG) (Barandun et al. 1962; Ellis and Henney 1969). Se ha demostrado que las respuestas a los agregados que contienen epítopes degradados causan anafilaxia, pero no inhiben o neutralizan la actividad de la proteína nativa (Ellis and Henney 1969).

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

Falta información crítica sobre los tipos y cantidades de agregados que se requieren para generar respuestas inmunes en relación con cualquier medicamento biológico (Marszal and Fowler 2012), aunque hay evidencia de que agregados y partículas de altos pesos moleculares y son más potentes para provocar tales respuestas que los agregados de pesos moleculares más bajos (Dintzis et al. 1989; Bachmann et al. 1993; Joubert et al. 2012). Los agregados que se forman y las cantidades que de manera eficiente provocan una respuesta inmune, también pueden diferir entre distintos productos y en diversos escenarios clínicos. Es más, el uso de cualquier método particular para la evaluación de agregados no es suficiente para proporcionar una medida robusta de la agregación de proteínas. Por ejemplo, el uso exclusivo de cromatografía de exclusión de tamaño puede excluir la detección de agregados de altos pesos moleculares que no atraviesan el pre-filtro de la columna pero que pueden ser las especies más cruciales en la generación de respuestas inmunes.

Así mismo, ha sido reconocido que partículas sub-visibles que están en el rango de tamaño de 0.1 a 10 micras, tienen un alto potencial de ser inmunogénico, pero no son detectadas por las tecnologías actualmente empleadas. (Berkowitz 2006; Roda et al. 2009; Gross and Zeppezauer 2010; Mahler and Jiskoot 2012). Estos grandes agregados pueden contener miles de millones de moléculas de proteínas y pueden ser homogéneas o heterogéneas (por ejemplo, moléculas de proteínas que se adhieren a partículas de vidrio o de metal).

Es crítico que los fabricantes de proteínas terapéuticas minimicen al máximo la agregación de proteínas. Deben desarrollarse estrategias para minimizar la formación de agregados en las fases tempranas de desarrollo del producto. Esto puede hacerse usando el sustrato de células apropiado, empleando un sistema de purificación robusto que remueva los agregados al máximo y escogiendo la formulación (ver parte I, numeral 5.2.7.) y el sistema de envase/cierre (ver parte I, numeral 5.2.8.) que minimice la agregación durante el almacenamiento. Es particularmente importante que el establecimiento de la fecha de expiración del producto tome en cuenta cualquier aumento en los agregados proteicos asociados con la desnaturalización o degradación durante el almacenamiento.

Deben emplearse métodos que de manera individual o combinada aumenten la detección de agregados proteicos con el fin de caracterizar distintas especies de agregados en el producto. Los métodos para medir la agregación cambian y mejoran constantemente lo cual debe ser considerado al escoger uno o más ensayos apropiados. Los ensayos deben estar validados para el uso en evaluaciones rutinarias de liberación de lotes y de estabilidad y deben emplearse varios de ellos para las evaluaciones de comparabilidad. Los estudios en animales pueden ser útiles para identificar especies agregadas que tengan el potencial de ser inmunogénicas, aunque otras consideraciones (cantidad y tipo de agregados, ruta de administración, etc.) pueden determinar hasta qué punto tales especies agregadas constituyen un riesgo clínico.

Debe hacerse una evaluación del rango y los niveles de partículas sub-visibles (2 a 10 micras) presentes en los medicamentos biológicos al inicio y durante el tiempo de almacenamiento. Actualmente existen varios métodos calificados para evaluar el contenido de partículas sub-visibles que estén en ese rango de tamaño. (Mahler and Jiskoot 2012). En la medida en que más métodos se hacen disponibles, los solicitantes deben esforzarse por caracterizar partículas de rangos de tamaño inferiores (0.1 – 2 micras). Los solicitantes deben realizar una evaluación de riesgo del impacto de estas partículas en el desempeño del medicamento biológico y desarrollar estrategias de control y mitigación con base en esa evaluación, según sea necesario.

5.2.4. Glicosilación / Pegilación

La glicosilación puede modular fuertemente la inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas. Aunque glico-formas foráneas como los azúcares xenogénicos de mamíferos (mammalian xenogenic sugars) (Chung et al. 2008; Ghaderi et al. 2010) o azúcares vegetales (Gomord and Faye 2004) pueden desencadenar respuestas inmunes vigorosas, tanto innatas como

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

adquiridas, la glicosilación de las proteínas con azúcares mamíferas conservadas aumenta la solubilidad del producto y disminuye su agregación e inmunogenicidad. La glicosilación altera de manera indirecta la inmunogenicidad de la proteína al minimizar su agregación, así como al proteger al sistema inmune de los epítopes inmunogénicos. (Wei et al. 2003; Cole et al. 2004). Se ha encontrado que la pegilación de las proteínas terapéuticas disminuye su inmunogenicidad vía mecanismos similares (Inada et al. 1995; Harris et al. 2001), aunque se ha reconocido que las respuestas inmunes al polietilenglicol (PEG) en sí mismas causan pérdida de la eficacia del producto y consecuencias adversas de seguridad (Liu et al. 2011). También se ha encontrado que Anticuerpos anti-PEG reaccionan de manera cruzada entre productos pegilados. (Garay et al. 2012; Schellekens et al. 2013).

En general la glicosilación de proteínas con azúcares de mamíferos disminuye su potencial inmunogénico. De igual manera la pegilación disminuye inmunogenicidad, se recomienda que el ensayo de ADA detecte tanto los anticuerpos anti-proteínas como los anticuerpos contra fracciones de PEG u otras entidades de alto peso molecular, por ejemplo, hidroxietilalmidón.

5.2.5. Impurezas con actividad coadyuvante

La actividad coadyuvante puede surgir a través de múltiples mecanismos, incluida la presencia de impurezas relacionadas con microbios o células huésped presentes en las proteínas terapéuticas (Verthelyi and Wang 2010; Rhee et al. 2011; Eon-Duval et al. 2012; Kwissa et al. 2012). Estas respuestas inmunes innatas moduladas por las impurezas (IIRMI en inglés), incluidas liposacáridos, glucan beta, proteína de alta movilidad del grupo B1 (HMGB1) y ácidos nucleicos ejercen una actividad inmune incrementada al unirse e inducir señalización por medio de los receptores toll-like u otros receptores reconocedores de patrones presentes en las poblaciones celulares de interés (Iwasaki and Medzhitov 2010; Verthelyi and Wang 2010). Esta señalización estimula la maduración de células que presentan antígeno y/o sirve directamente para estimular la producción de anticuerpos de células B.

Es muy importante que los fabricantes minimicen los tipos y cantidades de las impurezas presentes en las proteínas terapéuticas relacionadas con microbios o con células huésped. Se recomienda llevar a cabo pruebas sensibles para evaluar los tipos de respuestas inmunes innatas moduladas por las impurezas (IIRMI) que estén presentes, ya que inclusive trazas de IIRMI pueden modificar la inmunogenicidad de un medicamento biológico, y se requiere medir los niveles que puedan conducir a respuestas inmunes de relevancia clínica. Si se usan bio-marcadores para detectar y comparar la presencia de IIRMI, estos deben ajustarse a los IIRMI que puedan estar presentes en el producto.

Ejemplos de biomarcadores pueden incluir aquellos para liberación de citoquinas y activación de factor de transcripción de poblaciones de células definidas.

5.2.6. Propiedades inmuno-moduladoras de las proteínas terapéuticas

La actividad inmuno-moduladora de cualquier proteína terapéutica influye de manera crítica no solo en la respuesta inmune dirigida hacia sí misma, sino en las respuestas dirigidas a otras proteínas terapéuticas co-administradas, proteínas endógenas o incluso a drogas de moléculas pequeñas y puede no ser predecible. Por ejemplo, el interferón alfa (Gogas et al. 2006; Tovey and Lallemand), la interleuquina 2 (Franzke et al. 1999) y los factores estimulantes de colonias de granulocitos –GM-CSF, en inglés- (Hamilton 2008) no solo son relativamente inmunogénicos por sí mismos, sino que también se sabe que estimulan la regulación de las respuestas inmunes a las proteínas endógenas y que inducen auto-inmunidad clínica. Las proteínas terapéuticas inmuno-supresoras pueden en general inhibir la regulación de las respuestas inmunes, aumentando la posibilidad de infecciones serias. Sin embargo, no todas las proteínas terapéuticas inmuno-supresoras suprimen las respuestas hacia sí mismas. Por ejemplo, las integrinas y los anticuerpos monoclonales factor de necrosis tumoral (TNF, en inglés) tienden a ser inmunogénicos. Por lo tanto, la inmunogenicidad a tales proteínas terapéuticas debe evaluarse empíricamente.

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

Se recomienda tener en cuenta las propiedades immuno-moduladoras de las proteínas terapéuticas, sus efectos en las respuestas inmunes hacia sí mismas y su capacidad de inducir auto-inmunidad desde las primeras etapas de desarrollo del producto (Franzke et al. 1999; Gogas et al. 2006; Hamilton 2008).

Se debe evitar la vacunación con organismos vivos atenuados cuando la proteína terapéutica del medicamento biológico es inmunosupresora. Se recomienda que antes de aplicar un medicamento biológico se tenga actualizado el estado de vacunación del paciente según estándares de salud nacionales. Esta información deberá ser incluida en los PGR y será verificada en los procesos de vigilancia post-comercialización.

5.2.7. Formulación

Los componentes de formulación se escogen principalmente por su capacidad de preservar la conformación nativa de la proteína terapéutica durante el almacenamiento al prevenir la desnaturalización debida a las interacciones hidrofóbicas, así como al prevenir la degradación química incluida la truncación, oxidación, y desaminación. (Cleland et al. 1993; Shire et al. 2004; Wakankar and Borchardt 2006). Los excipientes de formulación de gran tamaño como la albúmina de suero humano (HSA) pueden afectar la inmunogenicidad de manera positiva o negativa. Aunque los excipientes tales como la HSA, se añaden por su capacidad de inhibir reacciones hidrofóbicas, pueden co-agregarse con la proteína terapéutica o formar aductos proteicos cuando esté bajo condiciones sub-óptimas de almacenamiento (Braun and Alsenz 1997). El polisorbato, un detergente no iónico, es la alternativa al HSA más utilizada. La estabilidad de ambos tipos de excipientes (esto es, HSA y polisorbato) debe tomarse en cuenta para propósitos de la formulación porque son muy susceptibles a las modificaciones (por ejemplo, la oxidación), lo cual puede constituir una amenaza a la integridad del medicamento biológico.

La formulación también puede afectar la inmunogenicidad del producto al alterar el espectro de lixiviables del sistema de cierre del envase. Se ha demostrado que los lixiviables de los tapones de caucho poseen actividad inmune coadyuvante, como se demostró en un experimento en animales (Mueller et al. 2009). Los compuestos orgánicos con actividad inmunológica, así como los metales, pueden haber sido eluidos de materiales del cierre del envase por formulaciones que contienen polisorbato, lo cual lleva a un incremento de la oxidación y la agregación (Seidl et al. 2012).

Se debe evaluar la capacidad de los excipientes para mantener la estabilidad de la proteína. Este análisis tendrá que llevarse a cabo durante la etapa de formulación y estudios de estabilidad.

Por lo tanto, los excipientes deben ser evaluados para determinar su potencial de prevenir la desnaturalización y degradación de las proteínas terapéuticas durante el almacenamiento. Las interacciones entre excipientes y las proteínas terapéuticas deben evaluarse de manera cuidadosa, especialmente en términos de co-agregación o formación de aductos de excipientes de proteínas.

La estabilidad de los excipientes debe considerarse de manera cuidadosa al establecer la vida del producto en la estantería. Debe realizarse un análisis completo de los lixiviables y los extraíbles, para evaluar la capacidad de interacción del material de cierre del envase con la proteína terapéutica o su capacidad de modificarla. Debe realizarse una evaluación del riesgo y deben desarrollarse estrategias de control y mitigación del riesgo, según sea necesario.

5.2.8. Consideraciones sobre el sistema de envase/cierre

Las interacciones entre proteínas terapéuticas y el sistema de envase/cierre pueden afectar de manera negativa la calidad del producto y la inmunogenicidad. Estas interacciones son más probables con jeringas pre-llenadas y materiales que interactúan con la proteína terapéutica durante un período de tiempo prolongado y por lo tanto tienen el potencial de

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

alterar la calidad del producto y su inmunogenicidad. A continuación, se presentan otras consideraciones sobre el sistema envase/cierre, relevantes para la inmunogenicidad.

- Las interfaces de vidrio y de aire pueden desnaturalizar las proteínas y causar agregación en jeringas de vidrio y en viales.
- Se sabe que los viales de vidrio se deslaminan o degradan a pH altos y con formulaciones de citrato, lo cual potencialmente crea partículas de vidrio con capas de proteínas las cuales pueden realzar la inmunogenicidad de la proteína terapéutica (Fradkin et al. 2011).
- Los componentes de las jeringas cubiertas de aceite de silicona, proveen un entorno químico y estructural en el cual las proteínas puede desnaturalizarse o agregarse.
- Deben realizarse estudios apropiados de estabilidad durante el uso para confirmar que las condiciones necesarias para mantener la calidad del producto y prevenir la degradación están adecuadamente definidas.
- Materiales lixiviados del sistema de envase/cierre pueden ser una fuente de materiales que aumentan la inmunogenicidad, tanto al modificar a la proteína terapéutica o al tener una actividad coadyuvante directa, que incluye lo siguiente:
 - Compuestos orgánicos con actividad inmuno-moduladora pueden ser eluidos del sistema de envase/cierre por formulaciones que contienen polisorbato: se encontró un compuesto orgánico lixiviado involucrado en la vulcanización en producto formulado con polisorbato cuando las superficies del tapón no estaban cubiertas de teflón (Boven et al. 2005).
 - Los metales que oxidan o agregan proteínas terapéuticas o que activan metaloproteinasas han sido encontrados en varios productos contenidos en jeringas pre-llenadas o viales. Por ejemplo, ha sido reportado que el óxido de tungsteno lixiviado del cilindro de la jeringa causa agregación de proteínas (Bee et al. 2009); y que metales lixiviados de los tapones del vial causaron un incremento de la proteólisis de una proteína terapéutica por la activación de una metaloproteinasa que co-purificaba con el producto.

Se recomienda el análisis de los materiales de envase y cierre. Este análisis tendrá que llevarse a cabo durante la etapa de formulación y estudios de estabilidad.

El solicitante debe allegar información detallada sobre la descripción de todas las materias primas usadas en la manufactura del sistema de cierre del envase usado en sus productos. Los solicitantes deben realizar análisis de laboratorio exhaustivos sobre los extraíbles y los lixiviados, usando múltiples técnicas analíticas para evaluar los atributos del sistema de cierre del envase puedan interactuar con la proteína terapéutica o degradarla.

Se deben evaluar los lixiviados de los sistemas envase/cierre elastoméricos de productos inyectables bajo condiciones de almacenamiento en tiempo real.

Deben realizarse pruebas en el producto para detectar lixiviados bajo condiciones de estrés, así como bajo condiciones de almacenamiento en tiempo real, dado que en algunos casos la cantidad de lixiviados aumenta a lo largo del tiempo en temperaturas elevadas. Deben realizarse pruebas sobre la compatibilidad del producto para medir los efectos de los materiales del sistema de cierre y todos los lixiviados sobre la calidad del producto.

5.2.9. Custodia del producto

Debe examinarse la estabilidad de los productos dentro de los empaques primarios que pretenden utilizarse, con su respectivo sistema de cierre, usando protocolos que incluyan condiciones apropiadas durante el uso (por ejemplo, luz, temperatura y agitación) para identificar condiciones y prácticas que puedan causar la desnaturalización y degradación del producto.

Continuación de la resolución *“Por la cual se expide la “Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos” y se dictan otras disposiciones”*

Dado que la mayoría de las proteínas terapéuticas se degradan al ser expuestas al calor y a la luz o con la agitación mecánica, los profesionales de la salud y los pacientes deben ser educados sobre el almacenamiento, manejo y administración del producto con el fin de asegurar su calidad. Esta información deberá ser incluida en los PGR y será verificada en los procesos de vigilancia post-comercialización.

Es crítico que la cadena de suministro sea segura. El transporte con control de temperatura y almacenamiento apropiados es de la mayor importancia para preservar la calidad del producto. Por ejemplo, el almacenamiento de una epoyetina alfa, bajo condiciones inapropiadas por vendedores no autorizados se asoció con altos niveles de agregados y aplasia pura de células rojas mediada por anticuerpos (Fotiou et al. 2009).

Se recomienda que se siga la guía de manejo en cuanto a transporte y almacenamiento con control de temperatura de la proteína y el manejo adecuado del medicamento, por parte del paciente. Esta información deberá ser incluida en los PGR y será verificada en los procesos de vigilancia post-comercialización.

Los materiales para la educación de los pacientes (por ejemplo, cartillas, videos de aplicación de las proteínas, así como cuidados particulares del producto) deben identificar de manera explícita las condiciones apropiadas de almacenamiento y manejo del producto. La instrucción apropiada del paciente por parte de los cuidadores es vital para asegurar la calidad del producto y para ayudar a minimizar los impactos adversos sobre la calidad del producto durante el almacenamiento y su manejo. Debe asegurarse transporte y almacenamiento con control de temperatura.

6. CONCLUSIONES

Las consecuencias de las respuestas inmunes a las proteínas terapéuticas pueden comprender desde ningún efecto aparente, hasta eventos adversos serios, incluyendo complicaciones que amenazan la vida como la anafilaxia, la neutralización de la eficacia de terapias altamente efectivas o salvavidas o la neutralización de proteínas endógenas con funciones no redundantes. Aunque hay comprensión acerca de los factores de riesgo de la inmunogenicidad relativos a los atributos de calidad del producto y a factores del paciente/protocolo, las respuestas inmunes a las proteínas terapéuticas no pueden predecirse basándose solamente en la caracterización de esos factores, por lo cual deben evaluarse en la clínica. Una aproximación basada en el riesgo, tal y como se delinea en esta guía, provee a los investigadores herramientas para desarrollar proteínas terapéuticas pioneras, y conocidas, para evaluar los cambios en la manufactura y evaluar la potencial necesidad de protocolos que inducen tolerancia cuando la inmunogenicidad tenga consecuencias severas.

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

PARTE II. DIAGNÓSTICO Y FISIOPATOLOGÍA DE LAS CONSECUENCIAS ADVERSAS DE RESPUESTAS INMUNES A PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS

1. DIAGNÓSTICO DE LA ANAFILAXIS

El diagnóstico de la anafilaxia se basa en los tres siguientes criterios clínicos, considerando que la anafilaxia es altamente probable cuando uno de estos tres criterios se cumplen (Sampson et al. 2006):

- 1.1. Comienzo agudo de una enfermedad (después de minutos o varias horas) con participación de la piel, el tejido mucoso o ambos (por ejemplo, ampollas generalizadas, prurito o enrojecimiento, labios, lengua o úvula inflamados) **y al menos uno de los siguientes:**
 - 1.1.1. Compromiso respiratorio (por ejemplo, disnea, broncoespasmo con sibilancias, estridor, flujo espiratorio con picos reducidos, hipoxemia)
 - 1.1.2. Baja presión arterial o síntomas asociados de disfunción de órganos diana (por ejemplo, hipotonía –colapso-, síncope, incontinencia)
- 1.2. Dos o más de los siguientes cuando ocurran rápidamente luego de una exposición a un probable alérgeno para el paciente (minutos o varias horas después):
 - 1.2.1. Participación de tejido mucoso de la piel (por ejemplo, ampollas generalizadas, enrojecimiento con prurito, hinchazón de labios, lengua y o úvula)
 - 1.2.2. Compromiso respiratorio (por ejemplo, disnea, broncoespasmo con sibilancias, estridor, flujo espiratorio con picos reducidos, hipoxemia)
 - 1.2.3. Presión baja o síntomas asociados (por ejemplo, hipotonía –colapso-, síncope, incontinencia)
 - 1.2.4. Síntomas gastrointestinales persistentes (por ejemplo, dolor abdominal con calambres, vómito)
- 1.3. Presión arterial baja luego de una exposición a un alérgeno conocido para ese paciente (minutos o varias horas después):
 - 1.3.1. En infantes o niños: baja presión arterial sistólica (específica para la edad) o una reducción de la misma de más del 30%.
 - 1.3.2. Adultos: presión arterial de menos de 90 mm Hg o una reducción mayor al 30% de la línea de base para esa persona.

Aunque ninguno de los criterios clínicos es 100% sensible o específico, se cree que estos criterios probablemente capturan más del 95% de los casos de anafilaxia (Sampson et al. 2006).

Pruebas de laboratorio para evaluar la anafilaxia:

Actualmente, no existen pruebas de laboratorio específicas o sensibles para confirmar el diagnóstico clínico de la anafilaxia. Pueden ser útiles las pruebas en la piel y pruebas de diagnóstico in vitro para determinar el nivel de anticuerpos IgE específicos dirigidos contra la proteína terapéutica, la liberación de mediadores o la activación de basófilos, pueden ser útiles para caracterizar la pato-fisiología subyacente y pueden proveer percepciones que permitan establecer posibles estrategias de mitigación (Simons 2010; Lee and Vadas 2011). Sin embargo, los resultados de pruebas no validadas deben ser interpretados con cuidado. La relevancia clínica de los resultados positivos de pruebas no validadas pueden ser inciertas durante el desarrollo del producto.

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

2. SÍNDROME DE LIBERACIÓN DE CITOQUINAS

Los anticuerpos monoclonales específicos para receptores de la superficie de la célula o las citoquinas que se expresan en las membranas de las células, así como los anticuerpos que se desarrollan en pacientes y que se unen a los receptores de las superficies de las células tienen el potencial de aumentar la actividad antagonista intrínseca y exacerbar las toxicidades relacionadas con las infusiones. Se recomiendan evaluaciones *in vitro* de la capacidad de tales proteínas terapéuticas para mediar la activación celular, incluida la proliferación y la liberación de citoquinas en la sangre humana completa o en células mononucleares de sangre periférica.

Para productos con el potencial de incurrir en síndrome de liberación de citoquinas, también puede ser recomendable una dosis inicial más baja que la obtenida mediante cálculos tradicionales y tasas de infusión más lentas, cuando sea aplicable (Duff 2006). Los niveles de proteínas C reactivas y citoquinas antes y después de la administración, tales como TNF-alfa, IL-2, IL6, IL-10, y IFN- γ , así como ciertas señales y síntomas clínicos, tales como elevación aguda de la temperatura corporal, eritema e hipotensión pueden servir como marcadores una respuesta pro-inflamatoria relacionada con liberación de citoquinas.

Datos de estudios en animales y evaluaciones *in vitro* pueden proveer información para guiar el desarrollo de proteína terapéuticas con el potencial de inducir liberación de citoquinas. Aunque los datos de los estudios en animales y de las evaluaciones *in vitro* pueden ser mutuamente complementarios, generalmente no son totalmente predictivos de la ocurrencia o resultado clínico. En consecuencia, es imperativo que se ejerza la mayor cautela en el desarrollo clínico de productos con el potencial de mediar la unión cruzada de receptores (Ver parte I numerales 3.2.1 y 3.2.2). Aunque los modelos tradicionales en animales usados para las pruebas de toxicología (por ejemplo, ratas, ratones, perros y monos *Cynomolgus*) raramente demuestran abiertamente toxicidades relacionadas con activación de linfocitos o liberación de citoquinas, marcadores específicos relacionados con la activación de células T y liberación de citoquinas pueden medirse en estudios toxicológicos de rutina, siempre y cuando el fármaco sea farmacológicamente activo en las especies de prueba.

Estos datos pueden luego ser útiles para predecir el potencial de estos agentes para inducir desde el punto de vista clínico un síndrome de liberación de citoquinas o para evaluar la actividad de agentes de segunda generación que han sido modificados para reducir su nivel de activación de células T. Por ejemplo, la producción de citoquinas puede ser medida en muestras de sangre obtenidas de animales tratados durante pruebas de farmacocinética o estudios generales de toxicología, siempre y cuando la cantidad de muestras obtenidas no comprometa la salud de los animales, o la capacidad de evaluar parámetros toxicológicos de punto final, a la terminación del estudio.

Cuando la evaluación de la liberación de citoquinas se incluye en los ensayos con animales, se recomienda la medición de un panel de citoquinas que sea tan amplio como sea posible y que incluya IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF-alfa, así como otras citoquinas relevantes que indiquen síndrome de liberación de citoquinas. (Hsu et al. 1999; Norman et al. 2000). Evaluaciones *in vitro* de la activación celular, incluida la proliferación y la liberación de citoquinas en células mononucleares de sangre humana total o periférica, constituyen herramientas importantes de evaluación que pueden ayudar a superar las limitaciones conocidas de los animales para modelar estímulos activadores sobre algunos subgrupos de células T (Stebbing et al. 2007; Hellwig et al. 2008; Findlay et al. 2011; Romer et al. 2011; Stebbings et al. 2013). El impacto del enlazamiento cruzado de receptores celulares provocado por el producto debe considerarse en tales estudios. Los signos de activación celular *in vitro* deben tomarse como una indicación de que el producto tiene el potencial de inducir toxicidades en la clínica, independientemente de los hallazgos negativos de los estudios con animales.

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

3. RESPUESTAS INMUNES NO AGUDAS

Las respuestas de hipersensibilidad tipo III, incluidas aquéllas mediadas por complejos inmunes y células T (en la vieja literatura, respuestas de hipersensibilidad retardada), son relativamente raras en relación con las proteínas terapéuticas y se requiere que exista un alto nivel de sospecha clínica para el diagnóstico (Dharnidharka et al. 1998; Hunley et al. 2004; Gamarra et al. 2006; Goto et al. 2009). Los signos y síntomas de deposición de complejos inmunes pueden incluir fiebre, erupción, artralgia, mialgia, hematuria, proteinuria, serositis, complicaciones del sistema nervioso central y anemia hemolítica. Los complejos inmunes compuestos de anticuerpo y proteína terapéutica, han sido responsables del desarrollo de glomerulonefritis y síndrome nefrótico en pacientes bajo tratamiento de inducción de la tolerancia (con factor IX y glucosidasa alfa) de cara a títulos altos y de respuesta de anticuerpos sostenida (Dharnidharka et al. 1998; Hunley et al. 2004). Existen reportes de casos de enfermedades de complejo inmune con respuestas inmunes a anticuerpos monoclonales (Gamarra et al. 2006; Goto et al. 2009) y situaciones en las que grandes dosis de anticuerpos monoclonales que tienen como blanco niveles altos de antígeno multivalente circulante pueden incrementar la probabilidad de depósitos de complejos inmunes (Gonzalez and Waxman 2000).

Si los pacientes desarrollan signos o síntomas que sugieran una enfermedad de complejo inmune deben realizarse las valoraciones de laboratorio apropiadas para determinar si hay complejos inmunes circulantes y activación del complemento. Así mismo debe suspenderse la administración del medicamento biológico. En algunas situaciones, el desarrollo de terapias que inducen la tolerancia y que eliminan la respuesta de anticuerpos pueden ser apropiadas antes de realizar más intentos del tratamiento.

Esta información deberá ser incluida en los PGR y serán verificados en los procesos de vigilancia post-comercialización.

4. RESPUESTAS DE ANTICUERPOS A LAS PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS

Los anticuerpos contra las proteínas terapéuticas se clasifican como neutralizantes y no neutralizantes. Los anticuerpos neutralizantes se unen a distintos dominios funcionales de la proteína terapéutica y evitan su actividad. Por ejemplo, los anticuerpos contra enzimas terapéuticas pueden unirse tanto al sitio catalítico, bloqueando la catálisis del sustrato o al dominio de unión, previniendo la captación de la enzima en la célula. En circunstancias poco comunes, los anticuerpos neutralizantes pueden actuar como transportadores y aumentar la vida media del producto y prolongar su efecto terapéutico. Tal y como se discute en la sección 3 de la parte I de esta guía, los anticuerpos no neutralizantes se unen a áreas de la proteína terapéutica distintas a los dominios funcionales y pueden presentar una variedad de efectos en la seguridad y la eficacia –eliminación aumentada o retardada de la proteína terapéutica, lo cual puede sugerir consideraciones de cambio de dosis, inducción de anafilaxia, disminución de la eficacia del producto al causar la captación de la proteína terapéutica en las células que expresan FcR y no en las células que son su blanco y facilitación de la diseminación de epítopes, permitiendo el surgimiento de anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, pueden no tener ningún efecto aparente en eficacia o seguridad.

Con la administración de proteínas no humanas se espera el desarrollo de anticuerpos neutralizantes y en pacientes que reciben terapias de reemplazo de factor/enzimas para tal proteína terapéutica que parece foránea. Sin embargo, un anticuerpo neutralizante de una proteína terapéutica que reacciona de manera cruzada con una proteína endógena no siempre aparece en situaciones en las que el factor endógeno es defectuoso o faltante debido a una mutación genética, como en el caso de la hemofilia A o las enfermedades de depósito lisosomal. Los anticuerpos neutralizantes pueden desarrollarse en individuos sanos contra algunas proteínas endógenas normales porque la tolerancia inmune a algunas proteínas endógenas no es robusta y puede romperse por un homólogo de la proteína terapéutica con provocación suficiente. Por ejemplo, voluntarios sanos tratados con proteínas tipo trombopoietinas (TPO), escalaron una respuesta de anticuerpos neutralizantes a la terapia,

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

que neutralizó de manera reactiva cruzada TPO endógena, induciendo un estado prolongado de trombocitopenia en esos individuos que antes estaban sanos (Li et al. 2001). Por lo tanto, el tratamiento con contraparte terapéutica de proteínas endógenas que cumplen una función única o proteínas endógenas presentes en baja cantidad debe realizarse con la máxima precaución. El anticuerpo neutralizante contra la proteína terapéutica también puede ser catastrófico cuando neutraliza la eficacia de una terapia salvavidas como las enzimas terapéuticas para los desórdenes de depósito lisosomal y en tales circunstancias debe considerarse la inducción a la tolerancia inmune. (Wang et al. 2008).

La pérdida de la eficacia de los anticuerpos monoclonales en los pacientes, causada por las respuestas inmunes al anticuerpo monoclonal pueden ser altamente problemáticas y las consecuencias clínicas no deben minimizarse. Los solicitantes deben considerar desarrollar terapias de inducción de la tolerancia inmune en esos pacientes.

Tal y como se discute en el numeral 3.2.5 de la parte I, si una proteína endógena es redundante en la función biológica (por ejemplo, interferones tipo I), la neutralización de la proteína terapéutica y la endógena puede no producir aparentemente un síndrome clínico obvio. Sin embargo, los efectos más sutiles del bloqueo de factores endógenos, aunque redundantes en algunas funciones, puede no ser aparentes hasta que el sistema esté estresado, dado que no todas las funciones biológicas de un factor pueden ser conocidas o caracterizadas completamente.

Aún más, los efectos de la persistencia por largo tiempo de anticuerpos neutralizantes, como se ha observado, por ejemplo, en un porcentaje pequeño de pacientes con anticuerpos contra IFN-beta (Bellomi et al. 2003), no sería deducido de seguimiento de corto plazo y debe ser estudiado en plazos más largos. Generalmente, para los productos suministrados crónicamente, deben recolectarse y evaluarse los datos de inmunogenicidad de un año o más al menos que una duración más corta pueda ser justificada científicamente. Sin embargo, una evaluación de más largo plazo debe estar garantizada, dependiendo de la frecuencia y severidad de las consecuencias. En algunos casos, estos estudios pueden hacerse en el escenario post-mercado.

En algunas circunstancias, se debe hacer seguimiento en serie a las respuestas de anticuerpos, independientemente del efecto clínico aparente, hasta que los niveles regresen a la línea de base. Aún más, para los pacientes en los cuales el medicamento biológico parece perder la eficacia, independientemente de la duración del curso de tratamiento, es importante que se realice una evaluación para determinar si la pérdida de eficacia está mediada por anticuerpos.

Se recomienda considerar la profilaxis mediante inducción de tolerancia, antes o durante el tratamiento, en los pacientes que desarrollan anticuerpos neutralizantes a proteínas terapéuticas salvavidas o que están en alto riesgo de desarrollarlos (Wang et al. 2008; Mendelsohn et al. 2009; Messinger et al. 2012). Dado el grado de supresión inmune de dichos tratamientos, aunque sea bastante menor que el del régimen terapéutico para revertir una respuesta de anticuerpos en marcha, debe realizarse un monitoreo cuidadoso de la seguridad durante la duración del protocolo.

5. UTILIDAD DE LOS ESTUDIOS EN ANIMALES

Las evaluaciones de inmunogenicidad en animales se realizan para ayudar en la interpretación de resultados de los estudios en animales (por ejemplo, estudios de toxicología) y en el diseño de estudios clínicos y no clínicos subsecuentes. Dichas evaluaciones son generalmente limitadas en su capacidad de predecir la *incidencia* de las respuestas inmunes humanas a las proteínas terapéuticas, pero pueden ser útiles para describir las *consecuencias* de las respuestas de anticuerpos particularmente cuando una proteína evolutivamente conservada, endógena no redundante es inhibida por anticuerpos que reaccionan cruzadamente y que se generan en contra de su contraparte en la proteína terapéutica. Cuando estén disponibles, los modelos en animales, incluidos los ratones hiper-inmunizados

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

o ratones *knock out* pueden usarse para analizar las principales consecuencias de la inhibición de proteínas endógenas. Un caso particular es el de las proteínas endógenas que son vitales para el desarrollo del embrión o del feto y cuya eliminación es letal para el embrión. En tales situaciones el uso de ratones copia (knock-out) condicionales puede ser útil para evaluar las potenciales consecuencias de los anticuerpos neutralizantes. Así como sucede en los estudios con humanos, debe dársele consideración a la transmisión potencial de anticuerpos a neonatos en desarrollo a través de la leche materna.

En contraste con las proteínas que median funciones biológicas únicas, los modelos en animales generalmente no son útiles para predecir las consecuencias de las respuestas inmunes a las proteínas terapéuticas que son contraparte de proteínas endógenas con funciones biológicas redundantes. Los ratones transgénicos con genes que codifican proteínas humanas, ratones humanizados (por ejemplo, ratones inmuno-deficientes con sistemas inmunes humanos) y modelos en ratones con enfermedades humanas se están desarrollando cada vez más y pueden ser considerados para lidiar con múltiples asuntos clínicos, incluida la inmunogenicidad.

Además de los estudios en animales apropiados, deben considerarse análisis *in vitro* e *in silico* que puedan complementar los estudios en animales, con el fin de dilucidar aún más el riesgo de inmunogenicidad.

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

PARTE III. DETALLES ADICIONALES SOBRE LOS MÉTODOS DE EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD

1. MODELOS PREDICTIVOS NO-CLÍNICOS

Las proteínas terapéuticas muestran, en la mayoría de los casos, diferencias según la especie. Así, las proteínas humanas serán reconocidas como proteínas antigénicas cuando se usan **en animales** de experimentación. Por esta razón, el valor predictivo de los modelos con animales de experimentación, para la evaluación de inmunogenicidad, es considerado bajo. Sin embargo, caso a caso se podrá establecer un análisis de la inmunogenicidad como parte de los estudios de toxicidad a dosis repetidas, lo cual favorece la interpretación de tales estudios.

Algunas situaciones donde los estudios de inmunogenicidad, con el uso de animales de experimentación, pueden ser considerados:

Los estudios en modelos animales pueden ayudar en reducción del potencial inmunogénico durante el desarrollo del proceso de producción, la formulación y la ruta de administración de una proteína terapéutica.

Como se menciona en estos lineamientos, una respuesta inmune frente a la proteína terapéutica puede causar reacciones autoinmunes, contra la proteína endógena. El solicitante deberá discutir cualquier experiencia relevante sobre las consecuencias de inducción de una respuesta inmune a la proteína endógena o su ausencia/disfunción en modelos animales. A su vez deben ser consideradas las respuestas tanto humoral como celular. Los estudios en animales pueden ser considerados en ausencia de estos datos.

El desarrollo de tecnologías in vitro e in vivo, por ejemplo, modelos transgénicos en ratones, pueden ser útiles en la evaluación del potencial inmunogénico de una proteína terapéutica.

2. DESARROLLO DE ENSAYOS PARA LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR

La inmunogenicidad no deseada inducida por proteínas biológicas puede incluir respuesta inmune tanto humoral, como celular. Por lo tanto, es muy importante seleccionar y/o desarrollar ensayos y estrategias para la evaluación de tales respuestas inmunes. La mayor parte del esfuerzo por lo general es enfocado en la detección de anticuerpos y en su caracterización, dado que es técnicamente factible y frecuentemente, relacionada con la seguridad clínica y la eficacia. Sin embargo, las respuestas mediadas por células son claramente importantes y su evaluación también tiene que ser considerada.

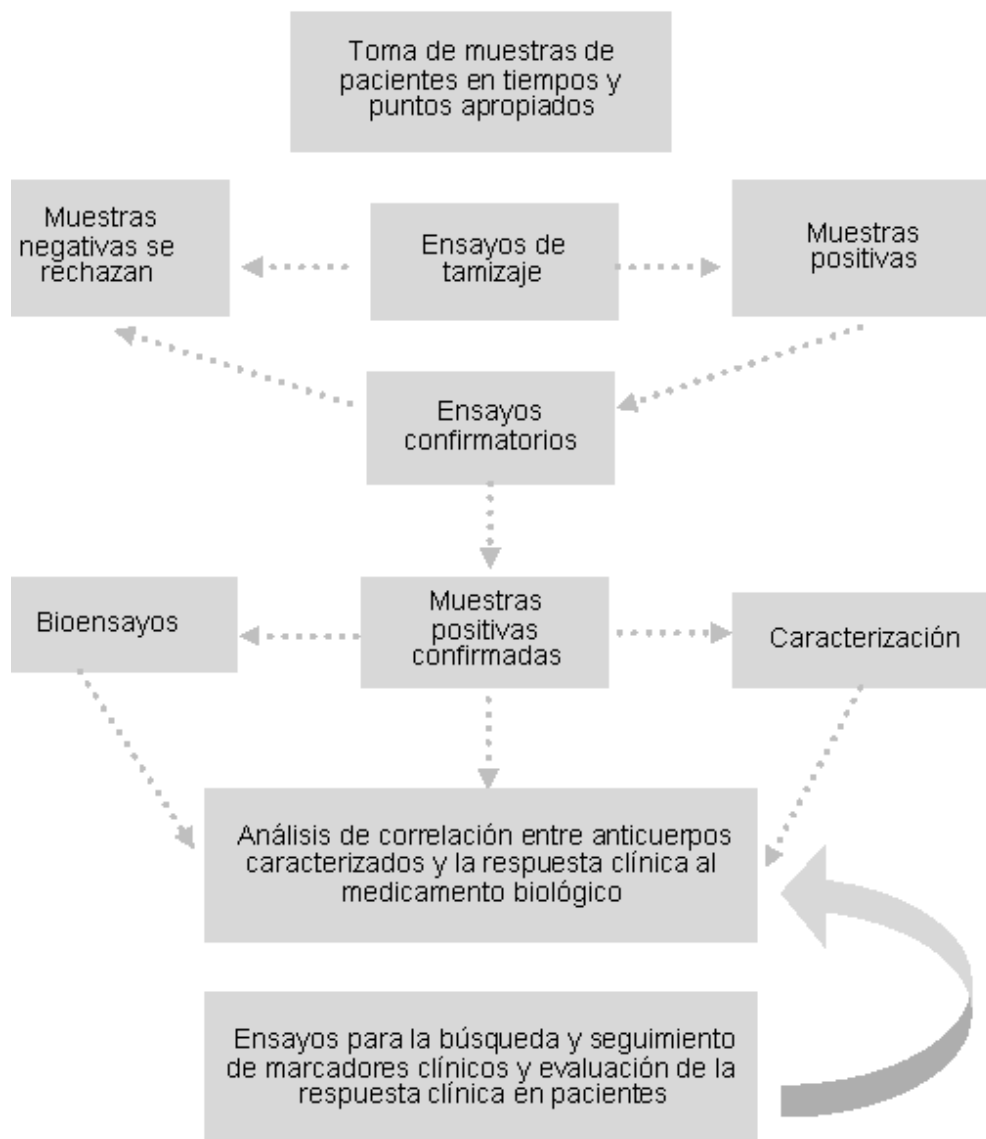
2.1. Ensayos estratégicos

Es esencial la adopción de una estrategia apropiada para identificar la inmunogenicidad no deseada frente a productos biológicos. Por lo general debería incluir un ensayo para la identificación de anticuerpos en muestras/pacientes positivos, procedimientos de inmunohistoquímica analíticos para confirmar la presencia de anticuerpos y determinar la especificidad de anticuerpo y bio-ensayos funcionales para la evaluación de la capacidad neutralizante de dichos anticuerpos. Además, se requerirán ensayos para evaluar y caracterizar el impacto clínico de anticuerpos (y posiblemente, de otros componentes de la respuesta inmunes ó si estos son detectados/inducidos). Como se menciona en los lineamientos, conviene incluir datos apropiados en la línea de base de todos los pacientes.

Se sugiere seguir este flujograma:

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

Estrategia para la Detección y Caracterización de Anticuerpos



2.2. Ensayos para la detección de anticuerpos

2.2.1. Ensayos de tamizaje: Los ensayos de tamizaje deben diseñarse de manera que estén sesgados hacia la detección de muestras de falsos positivos dado que esas muestras pueden eliminarse después usando el ensayo confirmatorio. Las características deseables de un ensayo de tamizaje son la sensibilidad, la especificidad, la precisión, la reproductibilidad y la robustez. Un ensayo de tamizaje debería ser capaz de detectar anticuerpos inducidos contra la proteína terapéutica en todas las muestras/pacientes positivas, aunque son inevitables los resultados falsos positivos y los falsos negativos.

2.2.2. Ensayo para elucidar la especificidad y confirmar la presencia de anticuerpos: Estos ensayos son necesarios para la eliminación de muestras/pacientes falsas positivas después del tamizaje inicial. Es necesario considerar tanto las limitaciones como las características del ensayo de selección.

2.2.3. Ensayos de neutralización: La evaluación de la capacidad de neutralización de los anticuerpos por lo general requiere el empleo de bio-ensayos. El ensayo debe ser seleccionado o desarrollado acorde con la naturaleza del producto biológico. Los bio-ensayos

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

son usados para medir la potencia de productos biológicos. Por ejemplo, ensayos de liberación pueden ser adaptados para evaluar la presencia de anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, estos, con frecuencia, requieren refinación para tener información óptima en la capacidad neutralizante de los anticuerpos detectados.

2.2.4. Validación de Ensayos: Los ensayos tienen que ser validados según el objetivo planteado. Los estudios de validación deben ser conducidos estableciendo que las respuestas correspondan con los analíticos relevantes, sobre la base de la exactitud, la precisión, la sensibilidad, la especificidad y la robustez. Los ensayos también deben ser validados para mostrar que efectos son causados por los reactivos o por la presencia de otras sustancias en las muestras, que pueden afectar desfavorablemente los resultados obtenidos. Lo anterior debe ser analizado con una completa gama de diluciones de las muestras.

El producto biológico residual presente en la sangre de los pacientes puede combinarse con el anticuerpo inducido y, por ende, reducir la cantidad de anticuerpo perceptible en los ensayos. Esto puede afectar los ensayos de manera diferente, dependiendo del ensayo y de las características de anticuerpo. Si esto ocurre, puede ser analizado/resuelto usando distintas aproximaciones, por ejemplo, buscando disociar los complejos inmunes con ácido, quitando el exceso de biológico por la adsorción de fase sólida y/o usando un ensayo que permita una dilución suficiente de la muestra. Tales aproximaciones deben ser validadas según la eficacia y adoptados caso-a-caso, según necesidades. En algunos casos este problema puede ser abordado considerando el tiempo entre la administración del bio-medicamento y el momento de la toma de muestra para la evaluación del anticuerpo.

Otra aproximación estadística, sugerida por la FDA, para calcular los puntos de corte para los ensayos de inmunogenicidad basado en las tasas de falsos positivos esperadas, lo cual ayuda a la gestión de la tasa de falsos negativos del ensayo, por ejemplo, para los ensayos de tasa de tamizaje se pide una tasa del 5% de falsos positivos y para los ensayos confirmatorios y de neutralización una tasa de 1% de falsos positivos. La tasa de falsos positivos para el ensayo confirmatorio es mucho más baja que la tasa para los ensayos de tamizaje dado que es un ensayo secundario. La tasa de falsos negativos para los ensayos de neutralización es mucho más baja que para los ensayos de tamizaje por que las muestras evaluadas en el ensayo de neutralización han sido ya confirmadas a través del antígeno específico ADA. La confirmación de positividad normalmente requiere ensayos repetidos, frecuentemente usando un método de ensayo diferente.

2.2.5. Estandarización y materiales de referencia: Los ensayos deben ser estandarizados y esto requiere la identificación y/o el desarrollo de materiales de referencia apropiados, así como del empleo de estándares biológicos relevantes. Los materiales de referencia y estándares, son esenciales para la calibración del ensayo y su posterior validación. Lo anterior es fundamental para ensayos usados en investigaciones/estudios sobre inmunogenicidad no deseada, lo cual está estrechamente asociado con la interpretación del ensayo y con la apropiada diferenciación de anticuerpos positivos, respecto a muestras negativas para el anticuerpo de interés.

2.3. Caracterización de anticuerpos frente a proteínas terapéuticas

Si los anticuerpos son detectados en pacientes bajo terapia, es necesario su estudio a fin de establecer su importancia clínica. Esto normalmente implica una evaluación inmunológica y/o biológica de las características de los anticuerpos e investigar los efectos de los anticuerpos (u otras respuestas inmunes inducidas) sobre el producto terapéutico. Podrían realizarse estudios *in vitro*, pero quizá se requiera de una evaluación clínica de los pacientes que reciben la terapia, considerando los criterios normativos.

2.3.1. Características del anticuerpo: Si se inducen anticuerpos en pacientes, el suero o las muestras de suero o plasma, tienen que ser caracterizadas en términos del contenido de anticuerpo (concentración/título) y otros criterios, que tienen que ser considerados caso a caso según el producto biológico, el tipo de pacientes tratados, el objetivo del estudio y

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

posiblemente, otros factores. Estos pueden *incluir* la clase de anticuerpo y la subclase (isotipos), la afinidad y la especificidad. Los anticuerpos presentes en las muestras positivas confirmadas, deben ser analizados a nivel de la especificidad para la proteína activa y diferenciarse de los anticuerpos, que se unen a componentes relacionados con el producto o relacionados con el proceso de producción. Los anticuerpos pueden ser inducidos contra todo y frente a cualquiera de los componentes del bio-medicamento. Es también útil analizar la reactividad cruzada con otros productos basados en la proteína particular, así como (si es posible y relevante) frente a la proteína endógena.

La capacidad neutralizante de los anticuerpos presentes en las muestras positivas tiene que ser establecida en su correlación con la posible reducción en la respuesta clínica esperada con el producto biológico. Debería anotarse que la neutralización de la actividad no necesariamente tiene correlación con el contenido de anticuerpo, por ejemplo, las muestras que contienen cantidades significativas o elevadas de anticuerpos con capacidad de unión, pueden fallar en neutralizar la actividad biológica. Esto puede depender del producto, pero debe ser determinado empíricamente, de ahí que la inmunogenicidad deba ser estudiada, también y especialmente, durante la comercialización y uso del bioterapéutico. El tamizaje de muestras con anticuerpos neutralizantes por medio de ensayos de neutralización cruzada, frente a otros productos basados en la misma proteína y con la proteína endógena, es importante para elucidar posibles implicaciones sobre la eficacia clínica y la seguridad del bioterapéutico.

3. DETALLES DE LOS MÉTODOS PARA LA EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD

3.1. Ensayos para anticuerpos

3.1.1. Ensayos de tamizaje: dada la necesidad de incorporar un número significativamente alto de muestras, es indispensable el empleo de un ensayo con el alto rendimiento y automatización apropiada. La selección de métodos incluye inmunoensayos como ensayos de radioinmunoprecipitación y ensayos de resonancia de plasmón superficial. Todos los procedimientos detectan la interacción de antígeno-anticuerpo (unión), pero pueden diferenciarse en sus principios científicos/técnicos. Los inmunoensayos constituyen un grupo importante de ensayos basados en una variedad de sistemas de detección y formatos. Estos incluyen: ensayos de unión directos, ensayos de captura (sandwich) y competitivos usando radioligandos, enzimas, moléculas fluorescentes, quimioluminiscentes o sistemas de detección de luminescencia electroquímica.

3.1.2 Ensayos para el establecimiento de la especificidad y confirmación de anticuerpos positivos: Diferentes ensayos pueden ser usados para este propósito y se requiere un número de muestras pequeño para el análisis. Para confirmar la especificidad, es aconsejable seleccionar un ensayo basado en una exposición diferente científica/técnicamente, respecto al ensayo de tamizaje. Pueden ser usados los inmunoensayos competitivos y los ensayos de resonancia de plasmón superficial. Los inmunoensayos analíticos como immunoblot y el análisis de radioinmunoprecipitación ofrecen la ventaja que pueden ser usados para preservar la especificidad de los anticuerpos reportados, así como la confirmación de la positividad del anticuerpo.

3.1.3. Ensayo de neutralización: Los bioensayos tienen que ser seleccionados usando una aproximación basada en el producto. Por lo general, una sola concentración de los biológicos es seleccionada para el ensayo y las diluciones de cada muestra evaluadas, a nivel del efecto inhibitorio de la respuesta analizada. Esto permite a una respuesta de dosis de neutralización para ser determinada y calcular la capacidad neutralizante la capacidad ("título") para cada muestra. En algunos casos los bioensayos neutralizantes, pueden ser usados directamente como ensayos 'confirmatorios' después del tamizaje, pero esto debe ser determinado caso a caso.

3.1.4. Ensayos para la evaluación de la respuesta inmune mediada por células: La estrategia para evaluar respuestas mediadas por células inmunes inducidas por biológicos, es

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

generalmente menos clara que para respuestas humorales. Los ensayos tienen que ser desarrollados o seleccionados caso a caso. En la mayoría de los casos, el desarrollo de una respuesta de IgG madura implica una participación de la respuesta de células T ayudantes. Los ejemplos de los ensayos para detectar/evaluar la respuesta mediada por células son ensayos de estimulación/proliferación de células T y métodos de producción/liberación de citoquinas (por ejemplo, IL2, IL4, IFN-g). Estos implican el uso de preparaciones de células T co-cultivadas con otros tipos de células, por ejemplo, con células dendríticas.

Procedimientos como el Elispot y la citometría de flujo son usados en estos ensayos. En algunos casos pueden ser útiles los estudios donde se evalúa la respuesta inmune mediada por célula. Los ensayos para células B de memoria (y algunas veces para células T de memoria) pueden aportar información útil sobre la naturaleza de la respuesta inmune y pueden contribuir a la predicción de desarrollo de problemas de inmunogenicidad. Los estudios que usan péptidos o proteínas de gran longitud (dependiendo de los ensayos y del objetivo de los ensayos) y metodologías como el Elispot, pueden ser usados para estos estudios. En algunos casos investigaciones más complejas de inmunidad mediada por célula, por ejemplo, que impliquen el estudio de células T reguladoras, pueden ser valiosas. La necesidad de tales investigaciones debe ser decidida caso a caso dependiendo de los objetivos y del propósito de los estudios.

3.2. Características de los ensayos

Los ensayos tienen que ser seleccionados, optimizados y analizados según el objetivo del uso de la proteína. La importancia y las exigencias de características del ensayo, dependen del uso. Por ejemplo, un ensayo de gran sensibilidad puede no ser requerido si no es necesario para la detección de anticuerpos inducidos por un producto biológico en particular en pacientes que están recibiendo terapia. El desarrollo de ensayos innecesariamente sensibles para tales anticuerpos sería inadecuado sobre todo si esta sensibilidad sólo puede ser alcanzada sacrificando otras características deseables como son, la especificidad y la robustez.

La adopción del ensayo más simple y conveniente para todas las exigencias, es normalmente un acercamiento válido al ensayo de tamizaje (en particular cuando el alto rendimiento es importante). Sin embargo, es necesario asegurar que esto no compromete otras etapas de la evaluación de la inmunogenicidad. Por ejemplo, el ELISA directo, con un antígeno directamente inmovilizado sobre la superficie del plato, es frecuentemente el ensayo más simple, pero puede ser asociado con una muy alta incidencia de falsos positivos. En tales casos, es necesario adoptar un ensayo más complejo, por ejemplo, la electroquimioluminiscencia- ECL o métodos como la resonancia de plasmón superficial- SPR, a fin de limitar los falsos positivos. Se pueden encontrar resultados falsos negativos en los ensayos de tamizaje, debido al enmascaramiento de epítopes; puede usarse una estrategia que implique el uso de ensayos que evitan el enmascaramiento específico del epítopo particular.

3.3. Estandarización, materiales de referencia y ensayos de validación

Es imprescindible para todos los ensayos un anticuerpo positivo como material/control de estándar/referencia, para demostrar la respuesta de ensayo y puede ser usado para fines de calibración. De ser posible debería ser una preparación humana con un contenido significativo de un anticuerpo que está disponible en la cantidad suficiente para un empleo rutinario. Debería ser almacenado de manera apropiada (normalmente liofilizado) y bien caracterizado. Los preparativos de referencia para los bioensayos de neutralización deberían tener una actividad de neutralización significativa, pero es también útil incluir una preparación de anticuerpo no neutralizante, al menos en los estudios de validación. Sin embargo, en varios casos, una suficiente cantidad de antisuero humano no puede estar disponible para permitir una preparación de referencia apropiada. En tales casos, la combinación o mezcla de muestras, es por lo general, el mejor acercamiento evitando además problemas relacionados con las características específicas de una muestra de un solo donante.

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

En caso que el suero humano no esté disponible en las cantidades requeridas, aún como una mezcla de varias muestras, el empleo de un suero de animal de referencia es la única opción realista. Sin embargo, éste tiene que ser seleccionado con cuidado y su uso es más limitado que para preparaciones de referencia de origen humano; por ejemplo, procedimientos inmunohistoquímicos, que implican el empleo de un reactivo tipo inmunoglobulina anti-humana, no responderá de manera confiable a anticuerpos no humanos y las respuestas en todos los ensayos puede ser diferente en sus características de aquellas respuestas a anticuerpos humanos en muestras humanas.

La calibración de inmunoensayos es problemática dado que la inmunoglobulina presente en estándares y muestras es heterogénea en estructura, especificidad y avidéz. Esto hace que la comparación directa válida entre muestras y materiales de referencia, sea muy difícil. Esto implica que la calibración de tales ensayos debería ser realizada usando un acercamiento aceptable, válido, claramente descrito. Frecuentemente la mejor opción, está en reportar los datos del inmunoensayo como un título basado en un procedimiento estándar que permita calcular este valor.

Los ensayos biológicos para evaluar la capacidad de neutralización de anticuerpos deberían ser calibrados usando preparados o muestras de referencia, si están disponibles. Esto permite la expresión de la actividad neutralizante en términos de unidades significativas de actividad biológica del producto/preparación y también proporciona información relevante para la validación del ensayo. Si dichos estándares no están disponibles, tienen que ser establecidas preparaciones propias (in-house). En muchos casos es útil expresar la capacidad de neutralización de las muestras en términos del volumen de muestra requerida para neutralizar una actividad biológica del producto, por ejemplo, en mL de suero / IU del biológico.

Es también muy útil preparar un panel de materiales de referencia que contienen diferentes cantidades de anticuerpos y anticuerpos con características diferentes, que pueden ser usadas para caracterizar/validar ensayos y que pueden servir como indicadores de funcionamiento del ensayo. De ser posible, se debería incluir uno o varios preparativos con un contenido bajo del anticuerpo (cerca del límite de detección mínimo) y anticuerpos de baja avidéz.

Los estándares/controles negativos son necesarios para establecer líneas de base para caracterizar/validar los ensayos. La línea de base del ensayo para individuos normales (sanos) debe ser fácilmente determinada por la medición de respuesta al ensayo, usando muestras obtenidas de un número apropiado de individuos y analizando si se obtiene un valor estadísticamente válido como *background*. Sin embargo, este resultado puede no representar la respuesta de base del ensayo con muestras obtenidas de la población de pacientes, que por lo tanto tendrían que ser establecidas separadamente, usando muestras pre-tratamiento de pacientes, o de alguna otra población válida y relevante. En cualquier caso, las muestras de algún individuo/paciente pueden contener anticuerpos pre-existentes (pre-tratamiento) o posiblemente otras sustancias que producen respuestas significativas positivas en los ensayos, por lo cual la selección de pacientes es necesaria para asegurar que los datos de post-tratamiento pueden ser interpretados correctamente.

Los reactivos usados en estos ensayos necesitan ser cualificados y aceptados con ciertas especificaciones, al menos para los que son considerados como más importantes.

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

REFERENCIAS

- "Guidance for Industry: Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products", emitida en agosto de 2014 por las siguientes entidades: Center for Drug Evaluation and Research (CDER) y Center for Biologics Evaluation and Research (CBER) de la Agencia Sanitaria de Estados Unidos, Food And Drug Administration –FDA-, adscrita al U.S. Department of Health and Human Services.
- "Guideline on Immunogenicity Assessment of Biotechnology-Derived Therapeutic Proteins" emitida en diciembre de 2007 por el Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) de la Agencia Sanitaria Europea, European Medicines Agency -EMA- (Documento Ref. EMEA/CHMP/BMWP/14327/2006).
- Bachmann, M. F., U. H. Rohrer, et al. (1993). "The influence of antigen organization on B cell responsiveness." *Science* 262(5138): 1448-1451.
- Bachmann, M. F. and R. M. Zinkernagel (1997). "Neutralizing antiviral B cell responses." *Annu Rev Immunol* 15: 235-270.
- Baert, F., M. Noman, et al. (2003). "Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease." *N Engl J Med* 348(7): 601-608.
- Barandun, S., P. Kistler, et al. (1962). "Intravenous administration of human gamma-globulin." *Vox Sang* 7: 157-174.
- Barbosa, M. D. and E. Celis (2007). "Immunogenicity of protein therapeutics and the interplay between tolerance and antibody responses." *Drug Discov Today* 12(15-16): 674-681.
- Bee, J. S., S. A. Nelson, et al. (2009). "Precipitation of a monoclonal antibody by soluble tungsten." *J Pharm Sci* 98(9): 3290-3301.
- Bellomi, F., C. Scagnolari, et al. (2003). "Fate of neutralizing and binding antibodies to IFN beta in MS patients treated with IFN beta for 6 years." *J Neurol Sci* 215(1-2): 3-8.
- Berkowitz, S. A. (2006). "Role of analytical ultracentrifugation in assessing the aggregation of protein biopharmaceuticals." *AAPS J* 8(3): E590-605.
- Bonfield, T. L., D. Russell, et al. (2002). "Autoantibodies against granulocyte macrophage colony-stimulating factor are diagnostic for pulmonary alveolar proteinosis." *Am J Respir Cell Mol Biol* 27(4): 481-486.
- Boven, K., S. Stryker, et al. (2005). "The increased incidence of pure red cell aplasia with an Eprex formulation in uncoated rubber stopper syringes." *Kidney Int* 67(6): 2346-2353.
- Braun, A. and J. Alsenz (1997). "Development and use of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for the detection of protein aggregates in interferon-alpha (IFN-alpha) formulations." *Pharm Res* 14(10): 1394-1400.
- Bretthauer, R. K. and F. J. Castellino (1999). "Glycosylation of Pichia pastoris-derived proteins." *Biotechnol Appl Biochem* 30 (Pt 3): 193-200.
- Brooks, D. A., J. J. Hopwood, et al. (1998). "Immune response to enzyme replacement therapy: clinical signs of hypersensitivity reactions and altered enzyme distribution in a high titre rat model." *Biochim Biophys Acta* 1407(2): 163-172.
- Bukhari, N., L. Torres, et al. (2011). "Axonal regrowth after spinal cord injury via chondroitinase and the tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin system." *J Neurosci* 31(42): 14931-14943.
- Chung, C. H., B. Mirakhur, et al. (2008). "Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose." *N Engl J Med* 358(11): 1109-1117.
- Cleland, J. L., M. F. Powell, et al. (1993). "The development of stable protein formulations: a close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation." *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 10(4): 307-377.
- Cole, K. S., J. D. Steckbeck, et al. (2004). "Removal of N-linked glycosylation sites in the V1 region of simian immunodeficiency virus gp120 results in redirection of B-cell responses to V3." *J Virol* 78(3): 1525-1539.
- Colombel, J. F., W. J. Sandborn, et al. (2010). "Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease." *N Engl J Med* 362(15): 1383-1395.
- Cuenca, A. G., J. L. Wynn, et al. (2013). "Role of innate immunity in neonatal infection." *Am J Perinatol* 30(2): 105-112.

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

- Dalum, I., M. R. Jensen, et al. (1997). "Induction of cross-reactive antibodies against a self protein by immunization with a modified self protein containing a foreign T helper epitope." *Mol Immunol* 34(16-17): 1113-1120.
- De Groot, A. S., L. Moise, et al. (2008). "Activation of natural regulatory T cells by IgG Fc-derived peptide "Tregitopes"." *Blood* 112(8): 3303-3311.
- Demeule, B., R. Gurny, et al. (2006). "Where disease pathogenesis meets protein formulation: renal deposition of immunoglobulin aggregates." *Eur J Pharm Biopharm* 62(2): 121-130.
- Dharnidharka, V. R., C. Takemoto, et al. (1998). "Membranous glomerulonephritis and nephrosis post factor IX infusions in hemophilia B." *Pediatr Nephrol* 12(8): 654-657.
- Dintzis, R. Z., M. Okajima, et al. (1989). "The immunogenicity of soluble haptened polymers is determined by molecular mass and hapten valence." *J Immunol* 143(4): 1239-1244.
- Disis, M. L., V. Goodell, et al. (2004). "Humoral epitope-spreading following immunization with a HER-2/neu peptide based vaccine in cancer patients." *J Clin Immunol* 24(5): 571-578.
- Donnelly, R. P., H. Dickensheets, et al. (2011). "Interferon-lambda and therapy for chronic hepatitis C virus infection." *Trends Immunol* 32(9): 443-450.
- Duff, E. G. o. P. O. C. T. C. P. G. W. (2006). Expert Group on Phase One Clinical Trials: Final Report. G. W. Duff.
- Ellis, E. F. and C. S. Henney (1969). "Adverse reactions following administration of human gamma globulin." *J Allergy* 43(1): 45-54.
- Eon-Duval, A., H. Broly, et al. (2012). "Quality attributes of recombinant therapeutic proteins: an assessment of impact on safety and efficacy as part of a quality by design development approach." *Biotechnol Prog* 28(3): 608-622.
- Findlay, L., D. Eastwood, et al. (2011). "Comparison of novel methods for predicting the risk of pro-inflammatory clinical infusion reactions during monoclonal antibody therapy." *J Immunol Methods* 371(1-2): 134-142.
- Fotiou, F., S. Aravind, et al. (2009). "Impact of illegal trade on the quality of epoetin alfa in Thailand." *Clin Ther* 31(2): 336-346.
- Fradkin, A. H., J. F. Carpenter, et al. (2011). "Glass particles as an adjuvant: a model for adverse immunogenicity of therapeutic proteins." *J Pharm Sci* 100(11): 4953-4964.
- Franzke, A., D. Peest, et al. (1999). "Autoimmunity resulting from cytokine treatment predicts long-term survival in patients with metastatic renal cell cancer." *J Clin Oncol* 17(2): 529-533.
- Gamarra, R. M., S. D. McGraw, et al. (2006). "Serum sickness-like reactions in patients receiving intravenous infliximab." *J Emerg Med* 30(1): 41-44.
- Gamble, C. N. (1966). "The role of soluble aggregates in the primary immune response of mice to human gamma globulin." *Int Arch Allergy Appl Immunol* 30(5): 446-455.
- Garay, R. P., R. El-Gewely, et al. (2012). "Antibodies against polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with PEG-conjugated agents." *Expert Opin Drug Deliv* 9(11): 1319-1323.
- Garces, S., J. Demengeot, et al. (2013). "The immunogenicity of anti-TNF therapy in immunemediated inflammatory diseases: a systematic review of the literature with a meta-analysis." *Ann Rheum Dis* 72(12): 1947-1955.
- Ghaderi, D., R. E. Taylor, et al. (2010). "Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins." *Nat Biotechnol* 28(8): 863-867.
- Gogas, H., J. Ioannovich, et al. (2006). "Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon." *N Engl J Med* 354(7): 709-718.
- Gomord, V. and L. Faye (2004). "Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants." *Curr Opin Plant Biol* 7(2): 171-181.
- Gonzalez, M. L. and F. J. Waxman (2000). "Glomerular deposition of immune complexes made with IgG2a monoclonal antibodies." *J Immunol* 164(2): 1071-1077.
- Goodnow, C. C. (1992). "Transgenic mice and analysis of B-cell tolerance." *Annu Rev Immunol* 10: 489-518.

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

- Goronzy, J. J. and C. M. Weyand (2013). "Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines." *Nat Immunol* 14(5): 428-436.
- Goto, S., H. Goto, et al. (2009). "Serum sickness with an elevated level of human anti-chimeric antibody following treatment with rituximab in a child with chronic immune thrombocytopenic purpura." *Int J Hematol* 89(3): 305-309.
- Gross, P. C. and M. Zeppezauer (2010). "Infrared spectroscopy for biopharmaceutical protein analysis." *J Pharm Biomed Anal* 53(1): 29-36.
- Hamilton, J. A. (2008). "Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity." *Nat Rev Immunol* 8(7): 533-544.
- Haribhai, D., D. Engle, et al. (2003). "A threshold for central T cell tolerance to an inducible serum protein." *J Immunol* 170(6): 3007-3014.
- Harris, J. M., N. E. Martin, et al. (2001). "Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics." *Clin Pharmacokinet* 40(7): 539-551.
- Hellmich, B., E. Csernok, et al. (2002). "Autoantibodies against granulocyte colony-stimulating factor in Felty's syndrome and neutropenic systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum* 46(9): 2384-2391.
- Hellwig, K., S. Schimrigk, et al. (2008). "Allergic and nonallergic delayed infusion reactions during natalizumab therapy." *Arch Neurol* 65(5): 656-658.
- Hermeling, S., D. J. Crommelin, et al. (2004). "Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins." *Pharm Res* 21(6): 897-903.
- Hintermann, E., M. Holdener, et al. (2011). "Epitope spreading of the anti-CYP2D6 antibody response in patients with autoimmune hepatitis and in the CYP2D6 mouse model." *J Autoimmun* 37(3): 242-253.
- Hoffmann, S., S. Cepok, et al. (2008). "HLA-DRB1*0401 and HLA-DRB1*0408 are strongly associated with the development of antibodies against interferon-beta therapy in multiple sclerosis." *Am J Hum Genet* 83(2): 219-227.
- Hsu, D. H., J. D. Shi, et al. (1999). "A humanized anti-CD3 antibody, HuM291, with low mitogenic activity, mediates complete and reversible T-cell depletion in chimpanzees." *Transplantation* 68(4): 545-554.
- Huang, L., J. Lu, et al. (2005). "In vivo deamidation characterization of monoclonal antibody by LC/MS/MS." *Anal Chem* 77(5): 1432-1439.
- Hunley, T. E., D. Corzo, et al. (2004). "Nephrotic syndrome complicating alpha-glucosidase replacement therapy for Pompe disease." *Pediatrics* 114(4): e532-535.
- Inada, Y., M. Furukawa, et al. (1995). "Biomedical and biotechnological applications of PEGand PM-modified proteins." *Trends Biotechnol* 13(3): 86-91.
- Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2010). "Regulation of adaptive immunity by the innate immune system." *Science* 327(5963): 291-295.
- Jefferis, R. and M. P. Lefranc (2009). "Human immunoglobulin allotypes: possible implications for immunogenicity." *MAbs* 1(4): 332-338.
- Joubert, M. K., M. Hokom, et al. (2012). "Highly aggregated antibody therapeutics can enhance the in vitro innate and late-stage T-cell immune responses." *J Biol Chem* 287(30): 25266-25279.
- Kessler, C. M. and T. L. Ortel (2009). "Recent developments in topical thrombins." *Thromb Haemost* 102(1): 15-24.
- Kimchi-Sarfaty, C., T. Schiller, et al. (2013). "Building better drugs: developing and regulating engineered therapeutic proteins." *Trends Pharmacol Sci* 34(10): 534-548.
- Koren, E. (2002). "From characterization of antibodies to prediction of immunogenicity." *Dev Biol (Basel)* 109: 87-95.
- Koren, E., H. W. Smith, et al. (2008). "Recommendations on risk-based strategies for detection and characterization of antibodies against biotechnology products." *J Immunol Methods* 333(1-2): 1-9.
- Kwissa, M., H. I. Nakaya, et al. (2012). "Distinct TLR adjuvants differentially stimulate systemic and local innate immune responses in nonhuman primates." *Blood* 119(9): 2044-2055.
- Lee, J. K. and P. Vadas (2011). "Anaphylaxis: mechanisms and management." *Clin Exp Allergy* 41(7): 923-938.

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

- LeMaoult, J., P. Szabo, et al. (1997). "Effect of age on humoral immunity, selection of the B-cell repertoire and B-cell development." *Immunol Rev* 160: 115-126.
- Li, J., C. Yang, et al. (2001). "Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin." *Blood* 98(12): 3241-3248.
- Liu, Y., H. Reidler, et al. (2011). "A double antigen bridging immunogenicity ELISA for the detection of antibodies to polyethylene glycol polymers." *J Pharmacol Toxicol Methods* 64(3): 238-245.
- Macdougall, I. C., S. D. Roger, et al. (2012). "Antibody-mediated pure red cell aplasia in chronic kidney disease patients receiving erythropoiesis-stimulating agents: new insights." *Kidney Int* 81(8): 727-732.
- Mahler, H. C. and W. Jiskoot (2012). *Analysis of Aggregates and Particles in Protein Pharmaceuticals*.
- Makrygiannakis, D., E. af Klint, et al. (2006). "Citrullination is an inflammation-dependent process." *Ann Rheum Dis* 65(9): 1219-1222.
- Marszal, E. and E. Fowler (2012). "Workshop on predictive science of the immunogenicity aspects of particles in biopharmaceutical products." *J Pharm Sci* 101(10): 3555-3559.
- Mendelsohn, N. J., Y. H. Messinger, et al. (2009). "Elimination of antibodies to recombinant enzyme in Pompe's disease." *N Engl J Med* 360(2): 194-195.
- Messinger, Y. H., N. J. Mendelsohn, et al. (2012). "Successful immune tolerance induction to enzyme replacement therapy in CRIM-negative infantile Pompe disease." *Genet Med* 14(1): 135-142.
- Miller, L. L., E. L. Korn, et al. (1999). "Abrogation of the hematological and biological activities of the interleukin-3/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor fusion protein PIXY321 by neutralizing anti-PIXY321 antibodies in cancer patients receiving high-dose carboplatin." *Blood* 93(10): 3250-3258.
- Mueller, R., A. Karle, et al. (2009). "Evaluation of the immuno-stimulatory potential of stopper extractables and leachables by using dendritic cells as readout." *J Pharm Sci* 98(10): 3548-3561.
- Murphy, K. (2011). *The Humoral Immune Response*. Janeway's Immunobiology. New York, Garland Science Publishing. 8th: 367-408.
- Narhi, L. O., J. Schmit, et al. (2012). "Classification of protein aggregates." *J Pharm Sci* 101(2): 493-498.
- Norman, D. J., F. Vincenti, et al. (2000). "Phase I trial of HuM291, a humanized anti-CD3 antibody, in patients receiving renal allografts from living donors." *Transplantation* 70(12): 1707-1712.
- Pandey, G. S., C. Yanover, et al. (2013). "Polymorphisms in the F8 gene and MHC-II variants as risk factors for the development of inhibitory anti-factor VIII antibodies during the treatment of hemophilia a: a computational assessment." *PLoS Comput Biol* 9(5): e1003066.
- Pandey, G. S., C. Yanover, et al. (2013). "Endogenous factor VIII synthesis from the intron 22-inverted F8 locus may modulate the immunogenicity of replacement therapy for hemophilia A." *Nat Med* 19(10): 1318-1324.
- PrabhuDas, M., B. Adkins, et al. (2011). "Challenges in infant immunity: implications for responses to infection and vaccines." *Nat Immunol* 12(3): 189-194.
- Ragnhammar, P., H. J. Friesen, et al. (1994). "Induction of anti-recombinant human granulocytemacrophage colony-stimulating factor (Escherichia coli-derived) antibodies and clinical effects in nonimmunocompromised patients." *Blood* 84(12): 4078-4087.
- Rhee, E. G., J. N. Blattman, et al. (2011). "Multiple innate immune pathways contribute to the immunogenicity of recombinant adenovirus vaccine vectors." *J Virol* 85(1): 315-323.
- Roda, B., A. Zattoni, et al. (2009). "Field-flow fractionation in bioanalysis: A review of recent trends." *Anal Chim Acta* 635(2): 132-143.
- Romer, P. S., S. Berr, et al. (2011). "Preculture of PBMCs at high cell density increases sensitivity of T-cell responses, revealing cytokine release by CD28 superagonist TGN1412." *Blood* 118(26): 6772-6782

Continuación de la resolución "Por la cual se expide la "Guía de Evaluación de la Inmunogenicidad para los Medicamentos Biológicos" y se dictan otras disposiciones"

- Rosenberg, A. S. and A. Worobec (2004). "A Risk-Based Approach to Immunogenicity Concerns of Therapeutic Protein Products, Part 2: Considering Host-Specific and Product-Specific Factors Impacting Immunogenicity." BioPharm International.
- Rosenberg, A. S. and A. Worobec (2005). "A Risk-Based Approach to Immunogenicity Concerns of Therapeutic Protein Products, Part 3: Effects of Manufacturing Changes in Immunogenicity and the Utility of Animal Immunogenicity Studies." BioPharm International.
- Sampson, H. A., A. Munoz-Furlong, et al. (2006). "Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report--Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium." J Allergy Clin Immunol 117(2): 391-397.
- Schellekens, H., W. E. Hennink, et al. (2013). "The immunogenicity of polyethylene glycol: facts and fiction." Pharm Res 30(7): 1729-1734.
- Seidl, A., O. Hainzl, et al. (2012). "Tungsten-induced denaturation and aggregation of epoetin alfa during primary packaging as a cause of immunogenicity." Pharm Res 29(6): 1454-1467.
- Seong, S. Y. and P. Matzinger (2004). "Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses." Nat Rev Immunol 4(6): 469-478.
- Shire, S. J., Z. Shahrokhi, et al. (2004). "Challenges in the development of high protein concentration formulations." J Pharm Sci 93(6): 1390-1402.
- Simons, F. E. (2010). "Anaphylaxis." J Allergy Clin Immunol 125(2 Suppl 2): S161-181.
- Singh, S. K. (2011). "Impact of product-related factors on immunogenicity of biotherapeutics." J Pharm Sci 100(2): 354-387.
- Stanley, E., G. J. Lieschke, et al. (1994). "Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology." Proc Natl Acad Sci U S A 91(12): 5592-5596.
- Stebbings, R., D. Eastwood, et al. (2013). "After TGN1412: recent developments in cytokine release assays." J Immunotoxicol 10(1): 75-82.
- Stebbings, R., L. Findlay, et al. (2007). "'Cytokine storm' in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics." J Immunol 179(5): 3325-3331.
- Tatarewicz, S. M., X. Wei, et al. (2007). "Development of a maturing T-cell-mediated immune response in patients with idiopathic Parkinson's disease receiving r-metHuGDNF via continuous intraputamenal infusion." J Clin Immunol 27(6): 620-627.
- Tovey, M. G. and C. Lallemand (2010). Adjuvant Activity of Cytokines. Methods in Molecular Biology. G. Davies, Springer Science.
- Verthelyi, D. and V. Wang (2010). "Trace levels of innate immune response modulating impurities (IIRMI)s synergize to break tolerance to therapeutic proteins." PLoS One 5(12): e15252.
- Viel, K. R., A. Ameri, et al. (2009). "Inhibitors of factor VIII in black patients with hemophilia." N Engl J Med 360(16): 1618-1627.
- Wakankar, A. A. and R. T. Borchardt (2006). "Formulation considerations for proteins susceptible to asparagine deamidation and aspartate isomerization." J Pharm Sci 95(11): 2321-2336.
- Wang, J., J. Lozier, et al. (2008). "Neutralizing antibodies to therapeutic enzymes: considerations for testing, prevention and treatment." Nat Biotechnol 26(8): 901-908.
- Weber, C. A., P. J. Mehta, et al. (2009). "T cell epitope: friend or foe? Immunogenicity of biologics in context." Adv Drug Deliv Rev 61(11): 965-976.
- Wei, X., J. M. Decker, et al. (2003). "Antibody neutralization and escape by HIV-1." Nature 422(6929): 307-312.
- Weigle, W. O. (1980). "Analysis of autoimmunity through experimental models of thyroiditis and allergic encephalomyelitis." Adv Immunol 30: 159-273.