

# **INSTRUCTIVO EXTERNO**

## ***EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD***

**Versión [2.0]**

**Coordinación General Técnica de Certificaciones  
Dirección Técnica de Registro Sanitario, Notificación Sanitaria Obligatoria y  
Autorizaciones**

**19 de Diciembre, 2025**

LA AGENCIA NACIONAL DE REGULACIÓN, CONTROL Y VIGILANCIA SANITARIA SE RESERVA EL DERECHO DE ESTE DOCUMENTO, EL CUAL NO DEBE SER USADO PARA OTRO PROPÓSITO DISTINTO AL PREVISTO EN EL MISMO, DOCUMENTOS IMPRESOS O FOTOCOPIADOS SON COPIAS NO CONTROLADAS, VERIFICAR SIEMPRE CON LA ÚLTIMA VERSIÓN VIGENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL.

INSTRUCTIVO EXTERNO EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD	CÓDIGO	IE-B.3.2.1-MB-01
	VERSIÓN	2.0
	Página 3 de 9	

#### CONTROL DE CAMBIOS

Versión	Descripción	Fecha de actualización
1.0	Emisión de documento original	Noviembre 2019
2.0	Principales modificaciones realizadas: <ul style="list-style-type: none"><li>a. Actualizaciones conforme lo establecido en la Resolución ARCSA-DE-2024-049-DASP a través de la cual se emite la “<i>Normativa Técnica Sanitaria Sustitutiva para la obtención del registro sanitario, control y vigilancia de productos biológicos de uso humano</i>” (publicada en Suplemento del Registro Oficial Nro. 726 del 21-ene.-2025);</li><li>b. Inclusión de la sección 3.2 para Acrónimos;</li><li>c. Actualización de los anexos por corrección tipográficas; y</li><li>d. Actualización del instructivo y anexos con la nueva imagen gubernamental.</li></ul>	Diciembre 2025

LA AGENCIA NACIONAL DE REGULACIÓN, CONTROL Y VIGILANCIA SANITARIA SE RESERVA EL DERECHO DE ESTE DOCUMENTO, EL CUAL NO DEBE SER USADO PARA OTRO PROPÓSITO DISTINTO AL PREVISTO EN EL MISMO, DOCUMENTOS IMPRESOS O FOTOCOPIADOS SON COPIAS NO CONTROLADAS, VERIFICAR SIEMPRE CON LA ÚLTIMA VERSIÓN VIGENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

INSTRUCTIVO EXTERNO EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD	CÓDIGO	IE-B.3.2.1-MB-01
	VERSIÓN	2.0
	Página 4 de 9	

## CONTENIDO

1. OBJETIVO .....	5
2. CONSIDERACIONES GENERALES.....	5
3. DEFINICIONES Y ACRÓNIMOS .....	5
4. INSTRUCCIONES.....	8
5. ANEXOS.....	9

LA AGENCIA NACIONAL DE REGULACIÓN, CONTROL Y VIGILANCIA SANITARIA SE RESERVA EL DERECHO DE ESTE DOCUMENTO, EL CUAL NO DEBE SER USADO PARA OTRO PROPÓSITO DISTINTO AL PREVISTO EN EL MISMO, DOCUMENTOS IMPRESOS O FOTOCOPIADOS SON COPIAS NO CONTROLADAS, VERIFICAR SIEMPRE CON LA ÚLTIMA VERSIÓN VIGENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

INSTRUCTIVO EXTERNO EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD	CÓDIGO	IE-B.3.2.1-MB-01
	VERSIÓN	2.0
	Página 5 de 9	

## 1. OBJETIVO

Proporcionar los lineamientos para la evaluación de la inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas para uso humano derivadas de la biotecnología y de anticuerpos monoclonales destinados a uso clínico in vivo.

## 2. CONSIDERACIONES GENERALES

2.1. El presente instructivo se sustenta en la siguiente base legal:

- La Ley Orgánica de Salud (publicada en el Suplemento del Registro Oficial 423, del 22-dic.-2006) (última modificación: 16-may.-2023), o documento que la sustituya o modifique; y
- La Resolución ARCSA-DE-2024-049-DASP mediante la cual se emite la “*Normativa Técnica Sanitaria Sustitutiva para la obtención del registro sanitario, control y vigilancia de productos biológicos de uso humano*” (publicada en Suplemento del Registro Oficial Nro. 726 del 21-ene.-2025).

2.2. Para la elaboración del presente instructivo se emplearon como referencias internacionales:

- Guía para la evaluación de la inmunogenicidad de proteínas terapéuticas del Comité de Medicamentos de Uso Humano (sus siglas en inglés CHMP), 2017;
- Evaluación de la inmunogenicidad de los productos de proteína terapéutica de la Agencia Reguladora de Estados Unidos Food and Drug Administration, 2014;
- Directriz sobre la evaluación de la inmunogenicidad de anticuerpos monoclonales destinados a uso clínico in vivo del Comité de Medicamentos de Uso Humano (CHMP), EMA/CHMP/BMWP/86289/2010, fecha de publicación 01-dic.-2012; y
- Recomendaciones para la evaluación de Productos Bioterapéuticos Similares (PBS), Documento Técnico No. 7 de la Red Panamericana de Armonización de la Reglamentación Farmacéutica, 2011.

## 3. DEFINICIONES Y ACRÓNIMOS

3.1. Para la aplicación del presente instructivo se utilizarán las siguientes definiciones:

**Anticuerpo:** Proteína perteneciente a la fracción de las gammaglobulinas: inmunoglobulina (Ig) formada o secretada por los linfocitos B y las células plasmáticas en respuesta a un estímulo antigénico, que según la teoría de selección clonal es muy específica contra éstos. Los anticuerpos se pueden dividir en dos tipos principales, anticuerpos monoclonales y policlonales, según las diferencias clave en sus métodos de fabricación.

INSTRUCTIVO EXTERNO EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD	CÓDIGO	IE-B.3.2.1-MB-01
	VERSIÓN	2.0
	Página 6 de 9	

**Anticuerpos monoclonales:** Son preparados de una inmunoglobulina o un fragmento de inmunoglobulina, con especificidad definida, producidos por un único clon de células. Pueden conjugarse con otras sustancias, incluso para el marcado radiactivo. Pueden obtenerse a partir de linfocitos B inmortalizados que se clonan y expanden como líneas celulares continuas o a partir de líneas celulares de ADN.

**Antígeno:** Denominación para cualquier sustancia (xenógena, alógena, isógena o autógena) con grupos químicamente característicos, que el organismo considera extraña y que posee la capacidad de desencadenar una respuesta inmunitaria. Es también la denominación de sustancias con capacidad de desencadenar una reacción inmunitaria (reacción antígeno - anticuerpo), pero sin capacidad inmunógena.

**Epítipo:** Los epítipos o determinantes antigénicos son cada uno de los sitios discretos de una macromolécula que son reconocidos individualmente por un anticuerpo específico o por un TCR específico. Son las regiones inmunológicamente activas de un inmunógeno (las que se unen de hecho a un receptor de linfocitos o a un Ac libre).

**Estudio clínico:** Es cualquier investigación que se realice en seres humanos con intención de descubrir o verificar los efectos clínicos, farmacológicos y/o cualquier otro efecto farmacodinámico de producto(s) en investigación y/o identificar cualquier reacción adversa a producto(s) de investigación y/o para estudiar la absorción, distribución, metabolismo y excreción de producto(s) en investigación, con el objeto de comprobar su seguridad y/o eficacia. Los términos ensayo clínico y estudio clínico son sinónimos.

**Estudio no clínico:** Pruebas que se realizan en una etapa de desarrollo del producto biológico, para lo cual se emplean animales y/o células o tejidos. No implica pruebas en humanos. El objetivo principal de los estudios no clínicos es determinar la seguridad de un producto biológico. Los estudios no clínicos investigarán cualquier efecto dañino del producto biológico en el cuerpo debido a la farmacología del mismo.

**Gestión de riesgos de calidad (sus siglas en inglés QRM):** Proceso sistemático para la evaluación, control, comunicación y revisión de los riesgos para la calidad del producto a lo largo del ciclo de vida del producto.

**Haplotipo:** Es un conjunto de variaciones del ADN, o polimorfismos, que tienden a ser heredados juntos. Haplotipo se puede referir a una combinación de alelos o a un conjunto de polimorfismos de nucleótido sencillo (SNPs) que se encuentran en el mismo cromosoma.

**Inmunogenicidad:** Es la capacidad que tiene un producto biológico para producir una inmunorespuesta, por ejemplo: el desarrollo de anticuerpos específicos, una respuesta mediada por linfocitos T o una reacción alérgica o anafiláctica. El cual puede neutralizar el

INSTRUCTIVO EXTERNO EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD	CÓDIGO	IE-B.3.2.1-MB-01
	VERSIÓN	2.0
	Página 7 de 9	

biológico de la misma medicación afectando la misma respuesta clínica, afectando negativamente al tratamiento subsecuente o puede causar reacciones adversas potencialmente fatales tales como autoinmunidad.

**Plazo:** Se entenderá por plazo a los días calendario, es decir se contará todos los días de la semana incluidos sábados, domingos y feriados.

**Principio activo o Ingrediente Farmacéutico Activo:** Es cualquier sustancia o mezcla de sustancias utilizada en un medicamento, para ejercer actividad farmacológica u otros efectos directos en el diagnóstico, cura, atenuación, tratamiento o prevención de enfermedades o para tener un efecto directo en la restauración, corrección o modificación de las funciones fisiológicas en el humano. También denominado como principio activo.

**Producto biológico de referencia:** Es aquel producto biológico que ha sido autorizado por una autoridad reguladora sobre la base de un expediente o dossier completo con datos completos sobre estudios clínicos y no clínicos. El producto biológico de referencia es el utilizado como comparador en los estudios de comparabilidad directa con el producto biosimilar, a fin de demostrar similitud en términos de calidad, seguridad y eficacia.

**Producto biológico de uso humano:** Producto terminado derivado de organismos o células vivas o sus partes. Se puede obtener de fuentes tales como tejidos o células, componentes de la sangre humana o animal (como antitoxinas y otro tipo de anticuerpos, citoquinas, factores de crecimiento, hormonas y factores de coagulación), virus, microorganismos y productos derivados de ellos como las toxinas. Estos productos son obtenidos con métodos que comprenden, pero no se limitan a cultivo de células de origen humano o animal, cultivo y propagación de microorganismos y virus, procesamiento a partir de tejidos o fluidos biológicos humanos o animales, transgénesis, técnicas de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) recombinante, y técnicas de hibridoma.

Se consideran como productos biológicos de uso humano a los siguientes:

- Vacunas;
- Hemoderivados;
- Productos biotecnológicos y biosimilares;
- Productos alérgenos de origen biológico;
- Sueros inmunes;
- Medicamentos de terapia avanzada de fabricación industrial; y,
- Otros que la Autoridad Sanitaria determine, previo al cumplimiento de los requisitos establecidos para su categorización.

Para fines de este instructivo se utilizará indistintamente los términos “producto biológico” o “producto biológico de uso humano”.

INSTRUCTIVO EXTERNO EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD	CÓDIGO	IE-B.3.2.1-MB-01
	VERSIÓN	2.0
	Página 8 de 9	

**Producto biotecnológico:** Se consideran aquellos productos de origen biológico de tipo proteico obtenidos por procesos biotecnológicos (ingeniería genética), u obtenidos por medio de técnicas de combinación de ácidos nucleicos del ADN recombinante, tecnología de hibridomas o líneas celulares continuas transformadas, expresadas en tejidos animales o en formas de vida microbiana, incluyendo a los anticuerpos monoclonales, enzimas, hormonas, citoquinas. En su mayoría estos productos son empleados en terapias de enfermedades crónicas.

**Producto biosimilar:** Producto biotecnológico que ha demostrado mediante el ejercicio de comparabilidad que es similar en términos de calidad, seguridad y eficacia al producto biológico de referencia.

**Término:** Se entenderá por término a los días hábiles o laborables.

**3.2.** Para la aplicación del presente instructivo se establecen los siguientes acrónimos:

- **ADA:** Anticuerpo antifármaco.
- **ARCSA o Agencia:** Se refiere a la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria – ARCSA, Doctor Leopoldo Izquieta Pérez.
- **ARN:** Autoridad de Regulación Nacional.
- **CHMP:** Comité de Medicamentos de Uso Humano.
- **CLB:** Unión a ligandos competitivos.
- **GM-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.
- **HLA:** Antígeno Leucocitario Humano.
- **HSA:** Albúmina sérica humana.
- **IIRMI:** Impurezas moduladoras de la respuesta inmunitaria innata.
- **mAb:** Anticuerpo monoclonal.
- **MHC:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad.
- **NAb:** Anticuerpo neutralizante.
- **PD:** Farmacodinamia.
- **PEG:** Polietilenglicol.
- **PK:** Farmacocinética.
- **SPR:** Resonancia de Plasmones Superficiales.
- **Th:** Células T auxiliares.
- **TNF:** Factor de necrosis tumoral.

#### 4. INSTRUCCIONES

Siempre se debe investigar la inmunogenicidad de los productos biotecnológicos antes de su autorización de comercialización (registro sanitario). Aunque se haya demostrado que la eficacia y

LA AGENCIA NACIONAL DE REGULACIÓN, CONTROL Y VIGILANCIA SANITARIA SE RESERVA EL DERECHO DE ESTE DOCUMENTO, EL CUAL NO DEBE SER USADO PARA OTRO PROPÓSITO DISTINTO AL PREVISTO EN EL MISMO, DOCUMENTOS IMPRESOS O FOTOCOPIADOS SON COPIAS NO CONTROLADAS, VERIFICAR SIEMPRE CON LA ÚLTIMA VERSIÓN VIGENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

INSTRUCTIVO EXTERNO EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD	CÓDIGO	IE-B.3.2.1-MB-01
	VERSIÓN	2.0
	Página 9 de 9	

la seguridad de un producto biosimilar y un producto biológico de referencia son similares, su inmunogenicidad puede seguir siendo diferente.

En la respuesta inmunitaria a un producto biotecnológico influyen muchos factores, tales como la naturaleza del ingrediente farmacéutico activo, las impurezas relacionadas con el producto y con el proceso, los excipientes y la estabilidad del producto, la vía de administración, la dosificación y los factores relacionados con el paciente, la enfermedad o el tratamiento.

La inmunogenicidad de un producto biotecnológico siempre se debe investigar en seres humanos ya que los datos obtenidos de animales generalmente no son predictivos de la respuesta inmunitaria en las personas.

Para la evaluación de la inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas el solicitante de registro sanitario e investigadores involucrados en el desarrollo de proteínas terapéuticas para uso humano deben seguir los lineamientos descritos en el **Anexo 1. Guía para la evaluación de la inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas.**

Para la evaluación de la inmunogenicidad de anticuerpos monoclonales destinados a uso clínico in vivo el solicitante de registro sanitario e investigadores involucrados deben seguir los lineamientos descritos en el **Anexo 2. Guía para la evaluación de la inmunogenicidad de anticuerpos monoclonales destinados a uso clínico in vivo.**

## 5. ANEXOS

**ANEXO 1.** Guía para la evaluación de la inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas GE-B.3.2.1-MB-01-01.

**ANEXO 2.** Guía para la evaluación de la inmunogenicidad de anticuerpos monoclonales destinados a uso clínico in vivo GE-B.3.2.1-MB-01-02.



# **ANEXO 1: GUÍA DE USUARIO**

## **GUÍA PARA LA EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE LAS PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS**

**Versión [2.0]**

**19 de Diciembre, 2025**

LA AGENCIA NACIONAL DE REGULACIÓN, CONTROL Y VIGILANCIA SANITARIA SE RESERVA EL DERECHO DE ESTE DOCUMENTO, EL CUAL NO DEBE SER USADO PARA OTRO PROPÓSITO DISTINTO AL PREVISTO EN EL MISMO, DOCUMENTOS IMPRESOS O FOTOCOPIADOS SON COPIAS NO CONTROLADAS, VERIFICAR SIEMPRE CON LA ÚLTIMA VERSIÓN VIGENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL.



ANEXO 1  
GUÍA PARA LA EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE LAS PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS

## CONTENIDO

1. OBJETIVO.....	2
2. INSTRUCCIONES .....	2

## 1. OBJETIVO

Proporcionar lineamientos a los solicitantes o titulares del registro sanitario e investigadores involucrados en el desarrollo de proteínas terapéuticas para uso humano.

## 2. INSTRUCCIONES

Los principios generales adoptados y explicados en este documento se aplican principalmente al desarrollo de una respuesta inmunitaria no deseada contra una proteína terapéutica purificada en pacientes y a su evaluación sistemática. La guía se aplica a proteínas y polipéptidos, sus derivados, y productos de los que forman parte, como los conjugados. Estas proteínas y polipéptidos son producidos principalmente por sistemas de expresión recombinantes o no recombinantes. A lo largo de esta guía, se utiliza el término “proteína terapéutica”. Esta guía no aplica a los factores de coagulación, vacunas, o preparaciones heterogéneas de inmunoglobulina, tales como inmunoglobulinas humanas purificadas a partir de plasma.

Para la evaluación de la inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas el solicitante o titular del registro sanitario e investigadores involucrados en el desarrollo de proteínas terapéuticas para uso humano deben seguir los siguientes lineamientos:

### 2.1. FACTORES QUE PUEDEN INFLUIR EN EL DESARROLLO DE UNA RESPUESTA INMUNE CONTRA UNA PROTEÍNA TERAPÉUTICA

#### 2.1.1. Factores relacionados con el paciente y la enfermedad

##### a. Factores genéticos que modulan la respuesta inmunitaria

Los factores genéticos pueden influir en las respuestas inmunitarias a una proteína terapéutica y conducir a la variabilidad entre pacientes. La variación genética en el nivel de las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (sus siglas en inglés MHC) y receptores de células T modificará el reconocimiento inmunitario, mientras que la variación genética en el nivel de los factores moduladores, tales como citoquinas y receptores de citoquinas, puede influir en la evolución y la intensidad de la respuesta.

##### b. Factores genéticos relacionados con un defecto genético

Cuando se utiliza la proteína terapéutica para la sustitución de una proteína endógena en el que el paciente es deficiente, parcialmente deficiente, o portador de una forma modificada de la contraparte natural, el antígeno fisiológico puede representar un neo-antígeno y el sistema inmunitario interpretará la proteína terapéutica como extraña o no propia.

**c. Factores relacionados con la edad**

Los datos sobre la inmunogenicidad de un grupo de edad no necesariamente pueden extrapolarse a otros, ya que la respuesta inmunitaria a las proteínas terapéuticas puede verse afectada por la edad del paciente. En la población pediátrica, se observan diferentes grados de maduración del sistema inmunitario según la edad, por lo que cabe esperar respuestas inmunitarias discrepantes ante un producto biológico.

Si el producto está indicado para la población pediátrica, generalmente se espera que los estudios clínicos sean llevados a cabo los grupos de edad pertinentes. Si está indicado para personas mayores, debe considerarse la posibilidad de una respuesta inmunitaria potencialmente alterada.

**d. Factores relacionados con la enfermedad**

Una enfermedad subyacente de un paciente puede ser un factor importante en el contexto del desarrollo de una respuesta inmunitaria no deseada. Los pacientes con sistemas inmunitarios activados (por ejemplo: aquellos que sufren de infecciones crónicas, alergias y enfermedades autoinmunes/autoinflamatorias), pueden ser más propensos a desarrollar respuestas inmunitarias a las proteínas terapéuticas. En otras condiciones (por ejemplo: malnutrición, una enfermedad maligna avanzada, enfermedad avanzada por VIH, insuficiencia orgánica), una respuesta inmune podría ser menos probable que ocurra debido a un sistema inmunitario deteriorado.

Para algunos productos, se ha reportado que el desarrollo de una respuesta de anticuerpos puede variar para diferentes indicaciones terapéuticas o diferentes etapas de la enfermedad. Las respuestas de anticuerpos también pueden modificarse en respuesta a infecciones víricas concomitantes.

**e. Tratamiento concomitante**

Las terapias concomitantes pueden disminuir o aumentar el riesgo de una respuesta inmunitaria a una proteína terapéutica. Por lo general, se reduce la reacción inmunitaria contra una proteína terapéutica cuando los agentes inmunosupresores se usan de forma concomitante. Sin embargo, una respuesta inmunitaria contra un producto terapéutico es el resultado de muchos factores, por ejemplo: exposición previa o concomitante a radiación o factores ambientales; por lo tanto, las conclusiones sobre el impacto potencial de la administración simultánea de medicación inmunomoduladora no son sencillas. También deben considerarse los tratamientos previos que pueden influir en la respuesta inmunitaria a una proteína terapéutica y puede tener un impacto en el sistema inmunológico. Si los ensayos clínicos de un producto con una sustancia activa nueva se llevan a cabo en combinación con inmunosupresores, la autorización para el uso del fármaco proteico en monoterapia debe ir acompañado de datos clínicos suficientes sobre su perfil de inmunogenicidad en ausencia de agentes inmunosupresores.

**f. Factores relacionados con el tratamiento**

La respuesta inmunitaria a una proteína terapéutica puede estar influenciada por la dosis, programa de dosificación y vía de administración. Los productos administrados por vía intravenosa pueden ser menos inmunogénicos que los fármacos administrados por vía subcutánea o intramuscular. La administración por inhalación, intradérmica y ocular también pueden mejorar la respuesta inmunitaria hacia la proteína terapéutica.

El tratamiento a corto plazo es por lo general menos probable que se asocie con una respuesta inmunitaria perjudicial que el tratamiento a largo plazo. La re-exposición después de un largo periodo sin tratamiento puede asociarse a una respuesta inmunitaria mejorada.

**g. Anticuerpos preexistentes**

Anticuerpos pre-existentes (sus siglas en inglés pre-ABS) son anticuerpos endógenos que son específicos o de reacción cruzada frente a epítopos de proteínas o glicanos superpuestos con epítopos de proteínas terapéuticas. Los anticuerpos preexistentes pueden resultar de la exposición previa a proteínas similares o relacionadas, pero también se encuentran en pacientes sin tratamiento previo. El origen exacto generalmente se desconoce.

**2.1.2. Factores relacionados con el producto**

Existen factores específicos de los productos que pueden aumentar o disminuir el potencial de una respuesta inmunitaria 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.

**a. Origen del producto (humano o externo)**

Se esperan respuestas inmunitarias a proteínas no humanas (es decir externas) y, pueden ser anticipadas para proteínas humanas endógenas. Además, las discrepancias entre la secuencia de la proteína endógena del paciente y la secuencia de la proteína terapéutica, causadas por polimorfismos que ocurren naturalmente, son un factor de riesgo para el desarrollo de respuestas inmunitarias a la proteína terapéutica. Sin embargo, la velocidad de desarrollo de la respuesta, su intensidad (título) y la 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 y materiales con actividad adyuvante; y la actividad inmunomoduladora inherente del producto (**ver sección 2.1.2 literal f.**). Por ejemplo, la exposición ambiental a proteínas bacterianas, tanto comensales como patógenas, presentes en la piel o en el intestino, puede predisponer a la generación de respuestas inmunitarias cuando tales proteínas bacterianas (tanto recombinantes como derivadas naturalmente) son usadas como terapéuticos.

En el caso de proteínas que se derivan de fuentes naturales, pueden desarrollarse anticuerpos no sólo contra la proteína terapéutica deseada, sino contra otros componentes proteicos externos potencialmente presentes en el producto. Inclusive, tales proteínas externas pueden contener regiones de homología hacia proteínas humanas endógenas. La capacidad de una proteína externa 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 inmunitaria 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.

En el caso de 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 inmunitarias 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. De hecho, algunos anticuerpos humanos desarrollados mediante la técnica de presentación de fagos pueden generar respuestas de anticuerpos antifármacos (sus siglas en inglés ADA) significativas.

Además, nuevos formatos estructurales, como las proteínas de fusión, anticuerpos bioespecíficos o multiespecíficos (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 inmunitarias, dado que dichas estructuras nuevas pueden crear neoantígenos o exponer epítopos crípticos. Asimismo, las mutaciones de sitios específicos en regiones constantes pueden crear nuevos alotipos 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 epítopo(s) objetivo.

#### *Recomendaciones*

Todos los productos de proteínas terapéuticas deben ser evaluados por su contenido y las respuestas inmunitarias dirigidas a los componentes del producto, incluyendo proteínas y componentes no proteicos. Debe realizarse una evaluación de riesgos de las posibles respuestas inmunitarias a dichas impurezas relacionadas con el proceso y el producto, y diseñarse un programa de pruebas basado en esta evaluación. Las proteínas exógenas destinadas a uso terapéutico deben evaluarse para detectar regiones moleculares con alta homología con proteínas humanas endógenas. Cuando existan tales homologías, además de la evaluación de anticuerpos contra la proteína humana exógena, debe realizarse una evaluación de anticuerpos contra la proteína humana homóloga.

ANEXO 1  
GUÍA PARA LA EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE LAS PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS

En el desarrollo de ensayos para evaluar la inmunogenicidad de nuevos productos relacionados con anticuerpos, se deben incorporar controles apropiados en los ensayos para determinar si la respuesta ADA es direccionada contra epítomos nuevos.

**b. Estructura Molecular Primaria / Modificaciones postraduccionales**

La secuencia primaria, la estructura de orden superior, la especie de origen 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 potencialmente inmunogénicas en proteínas que, por lo demás, están relativamente conservadas entre humanos y animales. En algunos casos, epítomos no humanos pueden inducir la respuesta de células T o promover la generación de epítomos humorales (anticuerpos) frente a secuencias humanas conservadas. Es importante señalar que las proteínas terapéuticas de origen humano pueden provocar respuestas inmunitarias en subgrupos de pacientes con haplotipos de Antígeno Leucocitario Humano (sus siglas en inglés HLA) distintos, así como en pacientes cuya secuencia de aminoácidos de la proteína endógena difiere de aquella de la proteína terapéutica, incluso por polimorfismos de un solo nucleótido.

Es probable que análisis avanzados adicionales de la secuencia primaria detecten epítomos de unión a HLA de la clase II en proteínas humanas no polimórficas. Tales epítomos pueden provocar y activar células T reguladores, que promueven la autotolerancia, o por el contrario, activar células T auxiliares (sus siglas en inglés Th) cuando la tolerancia inmunitaria a la proteína endógena no es robusta. Sin embargo, si se considera apropiado, la modificación de la secuencia primaria para eliminar epítomos inmunogénicos de linfocitos Th o añadir epítomos tolerogénicos de linfocitos T debe realizarse con precaución, ya que estas modificaciones pueden alterar atributos críticos de la calidad del producto, como la agregación, la desamidación y la oxidación, y por lo tanto, afectar su estabilidad e inmunogenicidad. En consecuencia, tras dichas modificaciones, se debe realizar evaluaciones y pruebas extensivas de los atributos críticos del producto. 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 neoantígenos formados en la región de unión y pueden luego extenderse a segmentos conservados de la molécula. Las proteínas de fusión formadas por una proteína exógena y una endógena son de particular cuidado por la capacidad de la proteína exógena 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 neoepítomos. Estos epítomos 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.

Las modificaciones químicas de las proteínas terapéuticas, tales como la oxidación, la desaminación, la modificación con aldehídos y la desiminación, pueden provocar respuestas inmunitarias, por ejemplo: al modificar la secuencia primaria, causar formación de agregados o alterar el procesamiento y la presencia 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 en entornos inflamatorios y pueden causar pérdida de la actividad, así como provocar respuestas inmunitarias. La evaluación de la proteína terapéutica en el contexto del entorno in vivo a los que se dirigen puede revelar la susceptibilidad a tales modificaciones químicas. La susceptibilidad a las modificaciones de las proteínas terapéuticas y por lo tanto la posibilidad de pérdida de la actividad o la inducción a respuestas inmunitarias in vivo, deben estimular la reflexión en torno a una ingeniería cuidadosa de las proteínas.

### *Recomendaciones*

Debe prestarse especial atención a las secuencias primarias elegidas para el desarrollo de productos proteicos terapéuticos en general, y especialmente a las contrapartes de proteínas endógenas en dichos productos, dados los potenciales polimorfismos de las proteínas endógenas a través de las poblaciones humanas.

La respuesta de los anticuerpos antifármacos a las moléculas de fusión o a las versiones modificadas de proteínas terapéuticas debe basarse en ensayos capaces de determinar la reactividad tanto a la molécula completa como a sus componentes individuales. Las respuestas inmunitarias dirigidas al producto proteico intacto, pero que no reaccionan con ninguna de las proteínas asociadas por separado, podrían estar dirigidas a nuevos epítomos en la región de fusión.

La evaluación de proteínas terapéuticas en el entorno 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 desamidación) que resultan en la pérdida de la eficacia o inducción de respuestas inmunitarias. Esta información puede facilitar la ingeniería del producto para aumentar su estabilidad ante tales circunstancias de estrés. Los patrocinadores deben considerar obtener esta información en las primeras etapas del diseño y desarrollo del producto.

### **c. Estructura Cuaternaria: Agregados de Productos y medición de agregados**

Los agregados proteicos están definidos como cualquier especie de proteína autoasociada, siendo el monómero la subunidad funcional y/o de origen natural más pequeña. Los agregados se clasifican además según cinco características: tamaño, reversibilidad/disociación, conformación, modificación química y morfología. Se reconoce desde hace más de medio siglo, que los agregados cuyo rango de tamaño va desde un dímero hasta cientos de micrometros, tienen un potencial de provocar respuestas inmunitarias a proteínas terapéuticas. 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, que provoca una activación eficiente de estas células; la mejora de la captación, el procesamiento y la presentación de antígenos; y la activación de señales de peligro inmunoestimuladoras. Estos mecanismos pueden mejorar el reclutamiento de células T auxiliares necesarias para la generación de anticuerpos IgG de alta afinidad con cambio de isotipo, la respuesta de anticuerpos asociada con mayor frecuencia a la neutralización de la eficacia del producto



Las potenciales consecuencias clínicas de las respuestas inmunitarias inducidas por los agregados proteicos pueden depender, en gran medida, de la pérdida de la preservación de epítomos nativos en el agregado. Algunos anticuerpos generados por agregados que contienen proteína nativa 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 contra proteínas desnaturalizadas/degradadas se unen únicamente a material agregado, pero no a monómeros de proteínas nativas, como en el caso de las preparaciones recientes de inmunoglobulina humana intravenosa. Se ha demostrado que las respuestas a los agregados que contienen epítomos degradados causan anafilaxia, pero no inhiben o neutralizan la actividad de la proteína nativa.

Se carece de información crítica sobre los tipos y cantidades de agregados que se requieren para generar respuestas inmunitarias frente a cualquier proteína terapéutica, aunque hay evidencia de que agregados de altos pesos moleculares y partículas son más potentes para provocar tales respuestas que los agregados de pesos moleculares más bajos. Los agregados que se forman y las cantidades que de manera eficiente provocan una respuesta inmunitaria, también pueden diferir entre distintos productos y en diversos escenarios clínicos. Además, 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 inmunitarias. Así mismo, ha sido reconocido que partículas subvisibles 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. 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).

#### *Recomendaciones*

Es fundamental 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 sección 2.1.2 literal g**) y el sistema de envase/cierre (**ver sección 2.1.2 literal h**) que minimice la agregación durante el almacenamiento. Es particularmente importante que la fecha de caducidad del producto tome en cuenta cualquier aumento en los agregados proteicos asociados con la desnaturalización o degradación de las proteínas 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 el grado de riesgo clínico que dichas especies representan.

Debe hacerse una evaluación del rango y los niveles de partículas subvisibles (2 a 10 micras) presentes en la proteína terapéutica al inicio y durante el tiempo de almacenamiento. Actualmente existen varios métodos calificados para evaluar el contenido de partículas subvisibles que estén en ese rango de tamaño. 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 de la proteína terapéutica y desarrollar estrategias de control y mitigación con base en esa evaluación, según sea necesario.

#### **d. Glicosilación / Pegilación**

La glicosilación puede modular fuertemente la inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas. Si bien las glicoformas exógenas, como los azúcares xenogénicos de mamíferos o los azúcares vegetales, pueden desencadenar intensas respuestas inmunitarias, tanto innatas como 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 epítopos inmunogénicos. Se ha encontrado que la pegilación de las proteínas terapéuticas disminuye su inmunogenicidad vía mecanismos similares, aunque se ha reconocido que las respuestas inmunitarias al polietilenglicol (PEG) en sí mismas causan pérdida de la eficacia del producto y consecuencias adversas de seguridad. También se ha encontrado que Anticuerpos anti-PEG reaccionan de manera cruzada entre productos pegilados.

#### *Recomendaciones*

Para las proteínas que normalmente están glicosiladas, se recomienda el uso de un sistema de producción de sustrato celular y métodos de fabricación apropiados que glicosilen el producto proteico terapéutico de manera no inmunogénica.

Para los productos proteicos terapéuticos pegilados, el ensayo ADA debe ser capaz de detectar tanto los anticuerpos antiproteína como los anticuerpos contra el grupo PEG. El mismo principio puede aplicarse a modificaciones en las que los productos proteicos terapéuticos no están pegilados, sino modificados con otras entidades de alto peso molecular, por ejemplo: hidroxietilalmidón.

#### **e. Impurezas con actividad coadyuvante**

La actividad adyuvante puede surgir a través de múltiples mecanismos, incluyendo la presencia de impurezas relacionadas con microbios o células huésped presentes en las proteínas terapéuticas. Estas impurezas moduladoras de la respuesta inmunitaria innata (sus siglas en inglés IIRMI), incluyendo el liposacárido,  $\beta$ -glucan y la flagelina, la proteína del grupo de alta movilidad B1 (sus siglas en inglés) y los ácidos nucleicos ejercen una actividad inmunoestimulante al unirse a receptores tipo Toll u otros receptores de reconocimiento de patrones presentes en linfocitos B, células dendríticas y otras poblaciones de células presentadoras de antígenos, y al activar la señalización a través de estos. Esta señalización promueve la maduración de las células presentadoras de antígenos o estimula directamente la producción de anticuerpos por los linfocitos B.

##### *Recomendaciones*

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.

Los ensayos para evaluar los tipos de IIRMI presentes deben adaptarse al sustrato celular correspondiente. Dado que incluso concentraciones mínimas de IIRMI pueden modificar la inmunogenicidad de un producto proteico terapéutico, los ensayos utilizados para detectarlos deben tener la sensibilidad suficiente para evaluar niveles que puedan desencadenar respuestas inmunitarias clínicamente relevantes. Si se utilizan biomarcadores para detectar y comparar la presencia de IIRMI, estos deben adaptarse a las IIRMI que podrían estar presentes en el producto. Algunos ejemplos de biomarcadores podrían ser la liberación de citocinas y la activación de factores de transcripción en poblaciones celulares específicas.

#### **f. Propiedades inmunomoduladoras de las proteínas terapéuticas**

La actividad inmunomoduladora de cualquier proteína terapéutica influye de manera crítica no solo en la respuesta inmunitaria dirigida hacia sí misma, sino en las respuestas dirigidas a otras proteínas terapéuticas coadministradas con proteínas endógenas o incluso moléculas de fármacos pequeños, y puede ser impredecible. Por ejemplo: el interferón alfa, la interleuquina 2 y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (sus siglas en inglés GM-CSF), 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 inmunosupresoras pueden en general inhibir la regulación de las respuestas inmunes, aumentando la posibilidad de infecciones serias. Sin embargo, no todas las proteínas terapéuticas inmunosupresoras suprimen las respuestas hacia sí mismas. Por ejemplo: los anticuerpos monoclonales contra integrinas y el factor de necrosis tumoral (sus siglas en inglés TNF) tienden a ser inmunogénicos. Por lo tanto, la inmunogenicidad a tales proteínas terapéuticas debe evaluarse empíricamente.

### *Recomendaciones*

Las propiedades inmunomoduladoras de las proteínas terapéuticas, sus efectos en las respuestas inmunitarias hacia sí mismas y su capacidad de inducir autoinmunidad deben ser monitoreadas desde las primeras etapas de desarrollo del producto.

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

### **g. Formulación**

Los componentes de la formulación se escogen principalmente por su capacidad de preservar la conformación nativa de la proteína terapéutica durante el almacenamiento, previniendo la desnaturalización debida a las interacciones hidrofóbicas, así como al prevenir la degradación química, incluyendo la truncación, oxidación, y desamidación. Los excipientes proteicos de gran tamaño presentes en la formulación, como la albúmina sérica humana (sus siglas en inglés 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 subóptimas de almacenamiento. 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 de la proteína terapéutica.

La formulación también puede afectar la inmunogenicidad del producto al alterar el espectro de lixiviables del sistema de envase - cierre. Se ha demostrado que los lixiviables de los tapones de caucho poseen actividad adyuvante inmunológica, como se demostró en un experimento en animales. 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.

### *Recomendaciones*

Los excipientes deben evaluarse por su potencial para prevenir la desnaturalización y degradación de los productos proteicos terapéuticos durante el almacenamiento. Las interacciones entre los excipientes y las proteínas terapéuticas deben evaluarse cuidadosamente, especialmente en lo que respecta a la co-agregación o la formación de aductos proteína-excipiente.

La estabilidad de los excipientes debe considerarse de manera cuidadosa al establecer la vida útil del producto. Se deben realizar análisis exhaustivos de las sustancias lixiviables y extraíbles

para evaluar la capacidad de los materiales de cierre del envase para interactuar con el producto proteico terapéutico y modificarlo. Se debe llevar a cabo una evaluación de riesgos y desarrollar estrategias de control y mitigación de riesgos según corresponda.

#### **h. 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 alterar la calidad del producto y su inmunogenicidad. A continuación se presentan otras consideraciones sobre el sistema envase-cierre relevantes para la inmunogenicidad.

- La interacción entre el vidrio y el aire puede desnaturalizar las proteínas y provocar su agregación en jeringas y viales de vidrio.
- Se sabe que los viales de vidrio se deslaminan o degradan a pH más altos y con formulaciones de citrato, lo cual potencialmente crea partículas de vidrio recubiertas de proteínas, que pueden aumentar la inmunogenicidad de la proteína terapéutica.
- Los componentes de la jeringa recubiertos de aceite de silicona, proveen un entorno químico y estructural en el cual las proteínas pueden desnaturalizarse y agregarse.
- Deben realizarse estudios de estabilidad en uso adecuados para confirmar que las condiciones necesarias para mantener la calidad del producto y prevenir su degradación están debidamente definidas.
- Materiales lixiviados del sistema de envase-cierre pueden ser una fuente de materiales que aumentan la inmunogenicidad, tanto al modificar químicamente la proteína terapéutica o al tener una actividad coadyuvante inmunológica directa, que incluye lo siguiente:
  - Compuestos orgánicos con actividad inmunomoduladora pueden ser eluidos del sistema de envase-cierre mediante formulaciones que contienen polisorbato: se encontró un compuesto orgánico lixiviable involucrado en la vulcanización en producto formulado con polisorbato cuando las superficies del tapón no estaban recubiertas de teflón.
  - 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; 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 copurificó con el producto.

#### *Recomendaciones*

Siempre que sea posible, el solicitante debe obtener información detallada sobre la descripción de todas las materias primas utilizadas en la fabricación de los sistemas envase-cierre de sus productos. Asimismo, los solicitantes deben realizar análisis de laboratorio exhaustivos sobre las sustancias extraíbles y los lixiviables, usando múltiples técnicas analíticas para evaluar los

atributos del sistema envase-cierre que podrían interactuar con la proteína terapéutica y 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.

#### **i. Custodia del producto**

Los productos con su sistema de cierre de los empaques primarios establecidos, deben someterse a pruebas de estabilidad según 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.

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.

Es crítico que la cadena de suministro sea segura. El transporte y almacenamiento con control de temperatura adecuado son de suma importancia para preservar la calidad del producto. Por ejemplo: el almacenamiento de una proteína alfa, bajo condiciones inapropiadas por parte de proveedores no autorizados se asoció con altos niveles de agregados y aplasia pura de células rojas mediada por anticuerpos.

#### *Recomendaciones*

Se recomienda que el prospecto para el paciente identifique explícitamente las condiciones de almacenamiento y manipulación apropiadas del producto. La instrucción adecuada al paciente por parte de los profesionales sanitarios es fundamental para garantizar la calidad del producto y minimizar los efectos adversos durante su almacenamiento y manipulación. Debe garantizarse el transporte y almacenamiento a temperatura controlada.

## **2.2. POTENCIALES CONSECUENCIAS CLÍNICAS DE LA INMUNOGENICIDAD**

El propósito de investigar la inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas es entender las consecuencias clínicas; es decir, consecuencias para la farmacocinética (PK), la farmacodinámica (PD), eficacia y seguridad. Entre los factores que determinan si los anticuerpos contra una proteína terapéutica tendrán consecuencias clínicas se incluye, por ejemplo: el epítipo reconocido por el



anticuerpo y la afinidad y la clase del anticuerpo. Además, la capacidad de los inmunocomplejos para activar el complemento puede tener un impacto en el resultado clínico.

### **2.2.1. Consecuencias sobre la Eficacia**

Los anticuerpos antifármacos (ADAs) pueden afectar a la eficacia de una proteína terapéutica, ya sea por interferir con la interacción farmacodinámica entre la proteína terapéutica y su objetivo o mediante la alteración de su perfil farmacocinético. Cuando un ADA se une al sitio activo de una proteína terapéutica o cerca del él, o induce cambios conformacionales, la unión de la proteína terapéutica a los receptores pertinentes pueden ser inhibidos. Estos ADAs se denominan generalmente como anticuerpos neutralizantes.

Los ADAs pueden cambiar la exposición de la proteína terapéutica, ya sea aumentando o disminuyendo el aclaramiento de la proteína terapéutica. Cuando la exposición se reduce debido a un mayor aclaramiento, o se incrementa, estos ADAs se denominan generalmente anticuerpos aclarantes o de mantenimiento, respectivamente. Los ADAs inducidos contra una proteína terapéutica puede tener propiedades tanto neutralizantes y de aclaramiento de mantenimiento.

Por lo general, se espera que los anticuerpos no neutralizantes y los anticuerpos no aclarantes estén asociados con menos consecuencias clínicas relacionadas con la eficacia. Los efectos de ADAs en proteínas terapéuticas pueden variar desde la ausencia total de la eficacia hasta su completa pérdida.

La exposición previa a proteínas similares o relacionadas, que dé lugar a una reactividad preexistente, puede modificar la respuesta a una nueva proteína terapéutica (afecta la farmacocinética, la eficacia o la seguridad).

Las consecuencias de estos anticuerpos podrían ser graves, por ejemplo: para los pacientes que reciben productos de sustitución como factores de coagulación sanguínea o terapia de reemplazo enzimático, ya que los anticuerpos previos podrían reaccionar de forma cruzada con el nuevo producto proteico, anulando su efecto. Por lo tanto, debe considerarse la posible reactividad cruzada con anticuerpos preexistentes.

### **2.2.2. Consecuencias sobre 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. Por lo tanto, debe mantenerse un alto grado de sospecha ante eventos clínicos que puedan originarse por dichas respuestas, incluso si la evaluación inicial del riesgo sugiere un riesgo menor de inmunogenicidad. El solicitante deberá justificar el paradigma de pruebas de inmunogenicidad propuesto, basándose en consideraciones específicas del producto y del paciente. En las siguientes secciones se describen algunas de las más importantes preocupaciones sobre seguridad asociadas a la inmunogenicidad:

#### a. Anafilaxia

La anafilaxia es una reacción alérgica aguda y grave caracterizada por ciertas manifestaciones clínicas. La definición actualmente aceptada se basa en criterios de diagnóstico clínico y no especifica un mecanismo inmunológico particular. Históricamente, la definición de anafilaxia involucra 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 abarcar todos los potenciales eventos adversos de interés, se recomienda identificar todos los casos que cumplan con los criterios clínicos de anafilaxia, independientemente de la fisiopatología presunta. Información adicional como la evaluación de la histamina y de la triptasa sérica, 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 antifármaco (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 sigue siendo de interés porque la anafilaxia con confirmación de la participación IgE, tiene ciertas implicaciones pronósticas para exposiciones repetidas y también para potenciales opciones terapéuticas de mitigación.

#### b. Síndrome de liberación de citoquinas

El síndrome de liberación de citoquinas es un complejo sintomático causado por la rápida liberación de citoquinas proinflamatorias por células inmunitarias diana. Aunque el síndrome de liberación de citoquinas no está directamente relacionado con la inmunogenicidad, la manifestación clínica de dicho síndrome se puede sobreponer a la anafilaxia y otras reacciones adversas inmunológicamente relacionadas. Distinguir este conjunto de síntomas de estos 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 linfocitos T). Se debe realizar una evaluación basada en el riesgo, centrada en el mecanismo de acción del producto proteico terapéutico, así como en los resultados de las evaluaciones en animales e in vitro, para determinar la necesidad de medir los niveles de citocinas antes y después de la administración en la fase inicial del desarrollo clínico. En caso de un evento adverso clínico, dicha evaluación puede proporcionar evidencia para respaldar el diagnóstico clínico del síndrome de liberación de citocinas y ayudar a distinguir esta entidad de otras reacciones medicamentosas agudas (por ejemplo, anafilaxia).



### c. 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 reacciones relacionadas con la administración”. Aunque el término implica cierta relación temporal, no está bien definido y pueden abarcar un amplio rango de eventos clínicos, incluida la anafilaxia 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, se exhorta a los solicitantes utilizar una terminología más descriptiva siempre que sea posible, indicando el momento de aparición, la duración y los signos y síntomas específicos observados tras la administración de un producto proteico terapéutico, y a proporcionar datos de estudios mecanísticos que puedan facilitar una estrategia de mitigación.

### d. Reacciones no agudas

La anafilaxia, el síndrome de liberación de citoquinas y otras reacciones agudas están relacionadas temporalmente con la administración de proteínas terapéuticas. La hipersensibilidad retardada (por ejemplo: la enfermedad del suero) y las respuestas inmunitarias secundarias a la formación de inmunocomplejos tienen típicamente una manifestación subaguda. Como resultado, la asociación entre la administración de la proteína terapéutica y reacciones no agudas, puede ser más difícil de establecer y la evaluación del mecanismo subyacente probablemente requiera el análisis de inmunocomplejos circulantes y activación del complemento. Los signos clínicos pueden incluir fiebre de aparición tardía, erupción cutánea, artralgia, mialgia, hematuria, proteinuria, serositis, complicaciones del sistema nervioso central y anemia hemolítica, en presencia de una respuesta de anticuerpos activa al producto proteico terapéutico. Cuando se sospecha una reacción de este tipo, la determinación de inmunocomplejos circulantes en las pruebas de laboratorio puede ayudar a confirmar el diagnóstico. La necesidad y los detalles de estas pruebas dependerán de cada caso particular y deben consultarse con el departamento responsable de la revisión de la proteína terapéutica.

### e. Reactividad cruzada a proteínas endógenas

Un ADA puede tener consecuencias graves si reacciona de forma cruzada e inhibe un homólogo endógeno no redundante del producto proteico terapéutico o proteínas relacionadas. Si la proteína endógena es redundante en cuanto a la función biológica, la inhibición de las proteínas terapéuticas y endógenas no pueden producir un síndrome clínico evidente hasta que el sistema se estrese, porque no todas las funciones biológicas de una proteína endógena pueden ser conocidas o completamente caracterizadas. Incluso, las consecuencias a largo plazo del uso de tales anticuerpos pueden no ser conocidos. Una consecuencia adicional de la reactividad cruzada con proteínas endógenas resulta en respuestas de anticuerpos a una proteína terapéutica cuyo homólogo endógeno 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.

Para las proteínas terapéuticas con homólogos endógenos 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 el homólogo endógeno, 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 de reacción cruzada con el homólogo endógeno del producto de la proteína terapéutica.

### 2.3. EVALUACIÓN NO CLÍNICA DE LA INMUNOGENICIDAD Y SUS CONSECUENCIAS

Las proteínas terapéuticas muestran las diferencias entre especies en la mayoría de los casos. Por lo tanto, proteínas humanizadas deben ser reconocidas como proteínas extrañas por los animales. Por esta razón, la capacidad de predicción de los estudios con animales para la evaluación de la inmunogenicidad en los seres humanos se considera bajo. Normalmente no se requieren estudios no clínicos *in vitro* o *in vivo* destinados a predecir la inmunogenicidad en humanos. Sin embargo, consideraciones en curso se deben dar para la utilización de las tecnologías emergentes, que podrían ser utilizadas como herramientas durante el desarrollo o para una primera estimación del riesgo de inmunogenicidad clínica. Los ensayos *in vitro* basados en células inmunitarias innatas y adaptativas podrían ser útiles en la revelación de las respuestas mediadas por células.

Las preocupaciones sobre la inmunogenicidad pueden surgir de la presencia de impurezas o contaminantes. Es preferible confiar en procesos de purificación para eliminar las impurezas y los contaminantes en lugar de establecer un programa de pruebas preclínicas para su evaluación. Se espera que los estudios clínicos en los que la inmunogenicidad es evaluada se suministren con material suficientemente representativo del producto biológico que se comercializará.

La medición de anticuerpos antifármacos en los estudios en animales puede ser necesaria como parte de los estudios de toxicidad de dosis repetidas, con el fin de ayudar en la interpretación de estos estudios (como se indica en la guía “ICH S6 (R1) Guía armonizada tripartita sobre la evaluación de seguridad preclínica de productos farmacéuticos derivados de biotecnología”). Cuando la medición de ADA no es parte del protocolo de estudio, las muestras de sangre deben ser tomadas y almacenadas para las evaluaciones futuras cuando sea necesario para ayudar en la interpretación de los resultados del estudio. Los ensayos utilizados deben ser validados. En estudios toxicológicos, donde usualmente las concentraciones más altas de proteína terapéutica están presentes en las muestras, la interferencia de la proteína terapéutica en los ensayos de ADA necesita ser considerada. En general, no hay necesidad de evaluar la inmunogenicidad en estudios de toxicidad de una sola dosis. Sin embargo, para un estudio de farmacocinética de dosis única la medición de ADA podría ser relevante.

Una respuesta inmune a una proteína terapéutica que representa un homólogo de una proteína endógena puede resultar en la reactividad cruzada, dirigida a la proteína endógena en los casos en que la proteína endógena todavía se produce. Por lo general, los riesgos de seguridad serían predecibles, basado en que no sería necesario el conocimiento existente sobre las funciones biológicas de los estudios de proteínas endógenas y animales para confirmar estos riesgos de seguridad. Solo en caso de falta de conocimiento suficiente, y si las consideraciones teóricas sugieren un riesgo para la seguridad, se podrían considerar estudios de inmunización animal con la proteína terapéutica o su homólogo animal para obtener información sobre las posibles consecuencias de una respuesta inmunitaria no deseada. Cualquier experiencia relevante sobre las consecuencias de la inducción de una respuesta inmunitaria a la proteína endógena o su ausencia/disfunción en modelos animales debe incluirse en el resumen integrado de inmunogenicidad.

Deben considerarse tanto la respuesta inmunitaria humoral como la celular. Las respuestas celulares pueden ser relevantes cuando se sospecha que los efectos farmacodinámicos o adversos están mediados por células inmunitarias, por ejemplo, cuando se produce una hipersensibilidad retardada o cuando se sospecha una respuesta de linfocitos T citotóxicos.

En el desarrollo de productos biosimilares, no se recomienda comparar la respuesta de anticuerpos antifármacos al biosimilar y al producto de referencia en un modelo animal como parte del estudio de comparabilidad, debido a su baja capacidad predictiva del potencial inmunogénico en humanos. Sin embargo, en raras ocasiones, cuando se requiere un estudio toxicológico o farmacocinético, podría ser necesario medir los ADA para facilitar la interpretación de los resultados.

#### **2.4. Desarrollo de ensayos para detectar y medir las respuestas inmunológicas en los seres humanos**

Desarrollar una estrategia de análisis integrada y pertinente al plan de tratamiento previsto es fundamental para dilucidar la relevancia clínica de datos de inmunogenicidad. Los ensayos y las estrategias de ensayo para la evaluación de las respuestas inmunitarias deben seleccionarse o desarrollarse antes del desarrollo clínico. Si bien la mayor parte del esfuerzo suele centrarse en la detección y caracterización de anticuerpos, dado que esto a menudo se relaciona con la seguridad

y la eficacia clínicas, las respuestas mediadas por células también son importantes y los solicitantes deben considerar su evaluación, cuando corresponda.

Aunque los ensayos se perfeccionarán durante el desarrollo del producto y se reevaluará su idoneidad en función de su uso, se espera que el solicitante proporcione toda la información necesaria y los datos completos de validación del ensayo para su evaluación como parte de la solicitud de registro sanitario.

#### 2.4.1. Estrategia y ensayos de anticuerpos

Se espera una estrategia adecuada que incluya el uso de métodos sensibles y válidos para la evaluación de la inmunogenicidad. Generalmente, se debe emplear un enfoque en varias etapas. Esto incluye un ensayo de cribado para la identificación de muestras/pacientes positivos para anticuerpos, un procedimiento para confirmar la presencia de anticuerpos y determinar su especificidad, seguido de ensayos funcionales para evaluar la capacidad neutralizante de los anticuerpos. Cualquier desviación de este concepto debe justificarse debidamente y discutirse con las autoridades reguladoras antes de la presentación de la solicitud de registro sanitario. Todos los ensayos clave (cribado, confirmatorio, anticuerpos neutralizantes) deben validarse para el uso previsto. En algunos casos, puede ser necesario analizar las muestras para detectar reactividad cruzada con otros productos basados en la misma proteína y la proteína endógena, si esto tiene implicaciones para la eficacia y seguridad clínicas.

Las tecnologías para la medición de anticuerpos evolucionan rápidamente, lo cual debe tenerse en cuenta al seleccionar el ensayo. Además, se requieren ensayos para medir la concentración del producto y evaluar su relevancia clínica, como ensayos para biomarcadores relevantes o mediciones farmacocinéticas, para evaluar el impacto clínico de los anticuerpos inducidos, en caso de que se detecten (**ver sección 2.8**). Si se inducen anticuerpos en los pacientes, se debe evaluar la cinética de su desarrollo, así como la duración y la magnitud de la respuesta, ya que puede correlacionarse con consecuencias clínicas. En estos casos, las muestras de suero o plasma deben caracterizarse en términos de nivel de anticuerpos (título), capacidad neutralizante y otros criterios, determinados individualmente según el producto biológico, el tipo de pacientes tratados, el objetivo del estudio, los síntomas clínicos y otros factores. La caracterización adicional, si fuera necesaria, debe incluir, por ejemplo, la clase y subclase (isotipo), la afinidad y la especificidad del anticuerpo; además, los ensayos utilizados deben estar validados para su propósito.

##### a. Ensayos de cribado o screening

Los ensayos de cribado son el primer paso en la evaluación de la inmunogenicidad. Deben ser sensibles y capaces de detectar todos los anticuerpos clínicamente relevantes (incluyendo las subclases IgM e IgG) inducidos contra el producto en todos los pacientes con anticuerpos positivos. Una baja tasa de falso positivo es aceptable (preferentemente 5%), pero resultados de falsos negativos son inaceptables.

El screening se realiza utilizando inmunoensayos que se basan en una variedad de formatos y sistemas de detección (**ver sección 2.8**). Todos los procedimientos de screening se basan en la

detección de la interacción antígeno-anticuerpo (unión), pero pueden diferir en sus principios científicos/técnicos subyacentes. Estos ensayos están configurados para tener suficiente rendimiento y automatización adecuada, cada ensayo tiene sus propios atributos y limitaciones inherentes que deben tenerse en cuenta (**ver sección 2.7; sección 2.8**). Los ensayos necesitan ser desarrollados, optimizados, seleccionados y validados de acuerdo con su uso previsto. Cuando se selecciona el ensayo de screening, todas las cuestiones metodológicas y factores de interferencia que puedan afectar a la prueba deben tenerse en cuenta. Por ejemplo: los ensayos de ELISA de unión directa, con antígeno directamente inmovilizado en las superficies de los pocillos de placa, es a menudo el enfoque de ensayo más simple, pero puede estar asociado con una incidencia muy alta de falsos positivos. También pueden estar asociados con una alta incidencia de falsos negativos para las muestras que contienen anticuerpos de baja afinidad. A menudo es necesario considerar otros ensayos adecuados, por ejemplo: ensayos de puente, ensayos basados en electroquimioluminiscencia o métodos de Resonancia de Plasmones Superficiales teniendo en cuenta sus imitaciones. El enmascaramiento de epítomos puede dar resultados falsos negativos en algunos ensayos de cribado y una estrategia para evitar esto puede ser necesario (por ejemplo: mediante el etiquetado de reactivos de detección que utilizan procedimientos que evitan el enmascaramiento de epítomo(s) especiales).

Los reactivos de ensayo (por ejemplo: reactivos de bloqueo) deben ser considerados cuidadosamente. Reactivos de bloqueo como BSA y la leche contienen glicanos no humanos que a veces se encuentran en las proteínas producidas en células de animales no humanas. Por lo tanto, los anticuerpos contra estos glicanos pueden pasarse por alto.

Las muestras (normalmente de suero o plasma) contienen sustancias que pueden interferir con los ensayos, por ejemplo: efectos de matriz que producen resultados falsos positivos o negativos y/o evaluación incorrecta del contenido de anticuerpos. Los ejemplos incluyen componentes del complemento o receptores del complemento, proteína de unión a manosa, receptores de Fc, moléculas diana solubles, y factores reumatoides. La influencia de este tipo de componentes de la matriz en los resultados del ensayo debe ser considerada y evaluada como parte de la validación del método. Para mitigar la influencia potencial deben implementarse medidas correctivas y el enfoque elegido debe justificarse, especialmente si hay limitaciones de los métodos respectivos. Además, la proteína terapéutica residual (fármaco) presente en la sangre de los pacientes puede formar complejos con anticuerpos inducidos y, por lo tanto, reducir la cantidad de anticuerpos detectables mediante ensayos. Esta interferencia puede afectar los ensayos de manera diferente, dependiendo del formato o tipo de ensayo y las características del anticuerpo y debe abordarse durante la validación del método. Si se produce dicha interferencia de drogas, puede evitarse / resolverse mediante el uso de una serie de enfoques, por ejemplo: disociando los inmunocomplejos con ácido, eliminando el exceso de fármaco por adsorción en fase sólida, utilizando largos tiempos de incubación y/o utilizando un ensayo que permite una dilución de muestra suficiente para evitar este problema. A veces, puede ser posible eliminar el fármaco o el objetivo de la muestra usando lectinas o anticuerpos xenogénicos. Tales enfoques deben ser validados por su efectividad y demostrarse que no tienen un impacto negativo en los resultados del análisis. En algunos casos, la interferencia de la proteína terapéutica residual puede superarse separando adecuadamente el tiempo entre la administración del producto y el muestreo para la

evaluación de anticuerpos, es decir, permitiendo que el producto se elimine de la circulación antes del muestreo. Este último enfoque no debe comprometer la detección de anticuerpos o el tratamiento del paciente. En cualquier caso, el solicitante debe demostrar que la tolerancia del ensayo a la terapéutica excede los niveles de la proteína terapéutica en las muestras para la prueba de ADA. Debido a limitaciones técnicas, no siempre es posible desarrollar ensayos completamente tolerantes. Si esto ocurre, debe emplearse el mejor ensayo posible y el enfoque adoptado debe estar debidamente justificado.

#### **b. Los ensayos para confirmar la presencia de anticuerpos**

Se espera que los ensayos de confirmación ratifiquen los resultados positivos y la eliminación de resultados positivos falsos acorde al screening inicial. Para la selección del ensayo debe tenerse en cuenta las limitaciones y las características del ensayo de cribado. Un enfoque común para la confirmación de anticuerpos es la adición de un exceso de antígeno a la muestra seguido de una comparación de muestras enriquecidas y no enriquecido en el ensayo de selección. Esto debe resultar en la inhibición de la unión inicial de los anticuerpos al antígeno y en una reducción de la señal positiva para verdaderos positivos en la muestra enriquecida.

Los anticuerpos presentes en las muestras positivas confirmadas necesitan ser examinados para determinar el título y la especificidad para la proteína terapéutica. Se ha demostrado que los anticuerpos pueden ser inducidos también contra otras sustancias, como los componentes relacionados con el producto y relacionados con el proceso (por ejemplo: proteínas de la célula huésped). En tales casos, se espera que ensayos de anticuerpos contra estas impurezas sean también desarrolladas y validadas para las pruebas de las muestras de pacientes, aunque los niveles de las impurezas deben mantenerse al mínimo para evitar tales respuestas inmunitarias.

#### **c. Los ensayos de neutralización**

La capacidad de neutralización de anticuerpos presentes en las muestras positivas necesita ser analizado como parte de la evaluación de la inmunogenicidad ya que esto a menudo se correlaciona con respuestas clínicas disminuidas para producto biológico. La desviación de este concepto necesita una justificación sólida. En tales casos, es recomendable buscar asesoramiento regulatorio. Los anticuerpos neutralizantes (NAbs) inhiben la actividad biológica de una proteína terapéutica mediante la unión a epítipo(s) dentro o cerca del sitio activo(s) de la molécula o causando cambios conformacionales. Debido a que los anticuerpos neutralizantes pueden desencadenar efectos clínicos, se esperan métodos *in vitro* específicos y sensibles para la detección. Dos tipos de ensayos NAb se utilizan principalmente - ensayos basados en células y ensayos no basados en células.

Se recomienda la selección de un ensayo que responda bien al producto biológico y sea tolerante a la proteína terapéutica residual. Los bioensayos utilizados para las pruebas de potencia a menudo se pueden adaptar para evaluar anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, pueden requerir de refinación con el fin de lograr un rendimiento óptimo para medir la capacidad de neutralización de anticuerpos.



La comprensión del modo de acción, el objetivo y las vías efectoras de la terapéutica son críticas para la identificación de un formato de ensayo NAb adecuado. Adicionalmente, el riesgo de desarrollar anticuerpos neutralizantes y el impacto en las secuelas clínicas también deben tenerse en cuenta.

Mientras que los ensayos basados en células a menudo se emplean para terapias agonísticas, los ensayos de unión a ligandos competitivos (CLB) no basados en células a menudo se consideran para moléculas antagonistas con dianas humorales. Para productos que ejercen su actividad solo a través de la unión directa a otras moléculas (por ejemplo: algunos anticuerpos monoclonales), los ensayos CLB u otras alternativas pueden ser adecuadas. Sin embargo, cuando estos se utilizan se debe demostrar que reflejen capacidad / potencial neutralizante de una manera apropiada. Para los antagonistas tales como anticuerpos terapéuticos monoclonales con funciones efectoras para la eficacia clínica, ensayos basados en células se recomiendan como el mecanismo de acción no se puede reflejar adecuadamente en un ensayo de CLB no basados en células.

Para la evaluación de NAb, a menudo se elige una concentración única de la sustancia biológica para el ensayo y se evalúa la dilución de cada muestra para determinar su efecto inhibitorio sobre la respuesta del ensayo. Esto permite determinar una respuesta de dosis neutralizante y calcular la capacidad neutralizante ("título") para cada muestra. En cuanto a la detección, se debe mostrar durante la validación del método que la neutralización está realmente relacionada con los anticuerpos y no debido a otros componentes inhibitorios en la matriz de la muestra. Se pueden considerar enfoques para mostrar especificidad, como el agotamiento de anticuerpos o el uso de estímulos alternativos (si el ensayo responde a múltiples estímulos). Cabe señalar que la actividad neutralizante no se correlaciona necesariamente con la unión del anticuerpo, es decir, las muestras que contienen cantidades significativas o altas de anticuerpos de unión pueden no neutralizar la actividad biológica, mientras que las muestras que contienen cantidades más bajas de anticuerpos de unión pueden neutralizar cantidades variables de la droga (dependiente de la muestra). Esto puede depender del producto, pero debe determinarse a través de estudios.

#### **d. Estrategia de evaluación de la inmunogenicidad - diseño e interpretación**

Estudios de inmunogenicidad deben ser diseñados con cuidado y de forma prospectiva para asegurar que todos los procedimientos esenciales están en su lugar antes del comienzo de la evaluación clínica. Esto incluye la selección, la evaluación y caracterización de los ensayos, la identificación de puntos de muestreo apropiados incluyendo muestras de referencia para la determinación de anticuerpos preexistentes, los volúmenes de muestra adecuados y muestra de procesamiento / almacenamiento y selección de métodos estadísticos para el análisis de datos. Esto se aplica a los ensayos utilizados para medir y caracterizar anticuerpos y métodos empleados para la evaluación de las respuestas clínicas a los anticuerpos si se inducen. Gran parte de esto debe ser establecido sobre una base caso por caso, teniendo en cuenta los productos, los pacientes y los parámetros clínicos esperados.

#### 2.4.2. Controles y reactivos del ensayo

La identificación y/o desarrollo de controles positivos y negativos apropiados es crucial ya que son esenciales para la validación del ensayo. Ellos están íntimamente asociados con la interpretación del ensayo y para distinguir las muestras positivas de anticuerpos de las muestras negativas de anticuerpos. Para todos los controles, los datos de caracterización que muestran sus propiedades y funcionalidad para el uso previsto deben proporcionarse como parte de la solicitud de registro sanitario. Esto es especialmente importante para los controles positivos, que en muchos casos son anticuerpos animales y se unen a diferentes epítomos, por ejemplo: en caso de biosimilares pueden diferir.

Idealmente, un control positivo de anticuerpo debe ser una preparación humana con un contenido de anticuerpos significativo que está disponible en cantidad suficiente para su uso continuado. Sin embargo, suficiente suero humano a menudo no está disponible para servir como una preparación de control positivo. En tales casos, pueden ser utilizados anticuerpos recombinantes humanos contra la proteína, si están disponibles, o suero animal generado contra el producto como una referencia. Esto también es aplicable a los productos biosimilares. Sin embargo, el uso de anticuerpos animales es más limitado que los anticuerpos humanos, por ejemplo: en procedimientos inmunoquímicos, debido a las diferencias de especies. Adicionalmente, si el ensayo implica el uso de un reactivo de inmunoglobulina anti-humana, el ensayo no responderá de forma confiable a los anticuerpos no humanos y la respuesta en todos los ensayos puede diferir en las características de las respuestas a los anticuerpos humanos en muestras humanas.

El uso del control positivo para estimar los niveles de anticuerpos para los datos obtenidos para muestras con ensayos de unión en unidades de masa es problemático ya que la inmunoglobulina presente en los estándares y las muestras es heterogénea en estructura, especificidad y avidéz. Por lo tanto, se deben explorar otras opciones, por ejemplo: para reportar datos de inmunoensayo como un título basado en un procedimiento estándar para calcular este valor. Sin embargo, la sensibilidad del ensayo y los datos para experimentos de adición de recuperación deben ser presentados de forma cuantitativa. Los anticuerpos de control positivo para ensayos de neutralización deben tener actividad neutralizante significativa, pero puede ser también útil incluir una preparación del anticuerpo no neutralizante en ensayos, por lo menos en estudios de validación, si está disponible. La capacidad de neutralización de los anticuerpos en cada muestra es difícil de definir en unidades de masa y, normalmente, se determina un umbral para la actividad neutralizante del ensayo. Tales umbrales (cerca del límite de detección mínimo) deben ser debidamente justificados y validados para asegurar que todas las muestras NAb positivas se detectan. El uso de la muestra de dilución o título requerido para neutralizar la actividad biológica del producto también es una opción.

Para ambos ensayos los de cribado y los NAb, un panel de materiales de referencia que contienen diferentes cantidades de anticuerpos (baja, media y controles de alta calidad) son útiles para la caracterización / validación de ensayos ya que actúan como indicadores de rendimiento del ensayo. Esto debe incluir uno o más preparados con bajo contenido del anticuerpo (cerca del límite de detección mínimo) y que contiene anticuerpos de baja avidéz, si es posible.



Se necesitan controles negativos para establecer las líneas base del ensayo y caracterizar / validar los ensayos. La línea base del ensayo para individuos normales (sanos) se determina claramente con bastante facilidad midiendo la respuesta del ensayo usando muestras derivadas de un número apropiado de tales individuos y analizándolas para proporcionar un valor de fondo estadísticamente válido. Sin embargo, esto puede no ser representativo de la respuesta inicial de las muestras derivadas de la población de pacientes, que por lo tanto necesitaría establecerse por separado, utilizando muestras de pretratamiento de pacientes o pacientes con enfermedad sin tratamiento previo. En general, los ensayos deben validarse utilizando la misma matriz que las muestras a analizar.

Las muestras de algunas personas/pacientes pueden contener anticuerpos preexistentes (pretratamiento) o posiblemente otras sustancias que producen respuestas positivas significativas en los ensayos, por lo que es necesario evaluar a los pacientes para garantizar que los datos posteriores al tratamiento puedan interpretarse correctamente en términos de tratamiento de anticuerpos emergentes.

Los reactivos utilizados en los ensayos deben calificarse y deben cumplir con los criterios de aceptación, al menos para los más importantes. Deben almacenarse adecuadamente (lío-filizados o congelados a una temperatura adecuada) y caracterizarse.

#### **2.4.3. La validación del ensayo e interpretación de los resultados**

Los ensayos usados para el análisis de ADAs y NABs de las muestras de los pacientes necesitan ser validados para el fin previsto y los datos de validación deben ser proporcionados como parte de la solicitud de registro sanitario. (Para la validación puede revisarse la Guía sobre la validación de métodos bioanalíticos (EMA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1). Si bien el desarrollo y la validación de los ensayos es un proceso continuo, todos los datos de inmunogenicidad clínica a considerar para una solicitud de registro sanitario deben haberse obtenido utilizando ensayos validados. Se deben realizar estudios de validación para establecer que los ensayos muestran respuestas lineales apropiadas y dependientes de la concentración a analitos relevantes, así como la precisión, precisión, sensibilidad, especificidad y robustez apropiadas. La inclusión de datos que respalden la dilución mínima requerida de las muestras es importante. Se debe considerar el uso de un laboratorio central para realizar los ensayos para evitar la variabilidad entre laboratorios, que es un problema tanto para las pruebas previas a la solicitud de registro sanitario como para las posteriores a la aprobación. Los ensayos también deben validarse para mostrar que los efectos de la matriz causados por reactivos o sustancias presentes en las muestras o la interferencia de fármacos no afectan negativamente los resultados obtenidos. Esto normalmente se aborda mediante investigaciones de "recuperación" realizadas al observar los efectos de tales sustancias presentes en la matriz sobre la respuesta obtenida en su ausencia. Esto necesita ser investigado para el rango completo de diluciones de muestras, que se utilizarán en ensayos, y, al menos en algunos casos, limita las diluciones, que pueden evaluarse de manera válida.

Es esencial establecer criterios claros para decidir cómo las muestras se considerarán positivas o negativas, y también cómo se confirmarán los resultados positivos. El enfoque adoptado debe

estar justificado por los datos. Un procedimiento común para establecer un punto de corte positivo para los inmunoensayos es establecer el fondo del ensayo utilizando muestras de controles sanos normales o individuos enfermos. Se podría utilizar un enfoque estadístico para establecer el valor de corte del ensayo, donde esté justificado. Alternativamente, se pueden usar datos reales (por ejemplo, valor doble fondo) para determinar cuál se considerará el resultado positivo más bajo. Para las muestras positivas de anticuerpos, se debe determinar un título utilizando un enfoque estándar e informando el recíproco de la dilución más alta a la que la muestra da un resultado positivo. Otra opción es informar en unidades de masa utilizando un control positivo de anticuerpos, pero esto presenta limitaciones.

#### **2.4.4. Ensayos para la inmunogenicidad comparativa**

Siempre se necesitan estudios de inmunogenicidad comparativa en el desarrollo de biosimilares, pero rara vez para un cambio del proceso de fabricación de un producto biológico dado. Las pruebas de inmunogenicidad del biosimilar y el producto de referencia deben realizarse dentro del ejercicio de comparabilidad del biosimilar utilizando el mismo formato de ensayo y programa de muestreo. El ensayo debe ser capaz de detectar anticuerpos contra todos los epítomos de moléculas biosimilares y las de referencia. Si se utilizan ensayos separados para el biosimilar y el producto de referencia, este enfoque de ensayo de dos antígenos requiere una validación cuidadosa para excluir cualquier sesgo debido a diferencias en la sensibilidad y la tolerancia al fármaco. La demostración de una incidencia similar de ADA y una buena concordancia entre los ensayos proporciona una buena evidencia de una inmunogenicidad comparable.

Alternativamente, el solicitante puede usar un enfoque de ensayo único en el que la molécula biosimilar se usa como antígeno. En principio, este formato de ensayo debe ser capaz de detectar todos los anticuerpos del producto biosimilar, pero no necesariamente todos los anticuerpos del producto de referencia. El hallazgo de que el biosimilar es más inmunogénico debe desencadenar una investigación de la causa raíz de la diferencia, incluidos los problemas metodológicos.

Independientemente del enfoque utilizado para la evaluación de inmunogenicidad de un producto biosimilar frente al producto de referencia, se recomienda que los ensayos se validen de forma cruzada utilizando ambos antígenos, controles positivos de anticuerpos y preferiblemente muestras clínicas para demostrar un rendimiento similar.

Las mismas consideraciones sobre la metodología del ensayo se aplican cuando se requieren estudios comparativos de inmunogenicidad para la comparación de dos versiones de una proteína terapéutica en el contexto de un cambio de fabricación de un producto dado.

#### **2.4.5. Evaluación de la inmunogenicidad de proteínas conjugadas y proteínas de fusión**

Se espera la obtención de una respuesta de anticuerpos con múltiples especificidades y afinidad variable hacia diferentes epítomos que resultan en diversos grados de impacto clínico para las nuevas moléculas biotecnológicas, tales como proteínas de fusión modificadas y proteínas conjugadas químicamente. La evaluación de esta respuesta, en particular, la caracterización de la especificidad de los anticuerpos inducidos es desafiante y puede requerir múltiples ensayos para

medir las respuestas inmunes a diversos restos. Alternativamente, se puede utilizar una estrategia basada en el principio de inhibición competitiva del ensayo confirmatorio para diseccionar las especificidades de los anticuerpos para restos individuales. Por ejemplo, para una proteína pegilada, la estrategia de evaluación comprendería un ensayo de detección que utiliza la prueba terapéutica pegilada y la prueba de cualquier muestra positiva que use la fracción terapéutica completa, la proteína no pegilada y el resto de polietilenglicol (PEG) en un ensayo confirmatorio.

#### 2.4.6. Caracterización de anticuerpos frente a una proteína terapéutica

Normalmente, se requiere la incidencia y el título, la persistencia y la capacidad neutralizante de los ADA. En ciertas circunstancias, puede ser factible caracterizar aún más la respuesta de ADA, por ejemplo, en caso de reacciones anafilactoides y el seguimiento de la madurez de la respuesta inmune emergente. En estos casos, la determinación del isotipo y las subclases de IgG o incluso la reactividad de las células T pueden ser útiles. La reactividad cruzada de los ADAs con proteínas endógenas relevantes debe investigarse si se sospecha una autoinmunidad emergente.

### 2.5. Inmunogenicidad y desarrollo Clínico

Las pruebas de inmunogenicidad deben incluirse en todos los ensayos clínicos farmacocinéticos, farmacodinámicos, de seguridad y eficacia fundamentales de un producto biológico dirigido a poblaciones de pacientes que no han sido expuestos al producto previamente. El objetivo de los estudios de inmunogenicidad es detectar y caracterizar una respuesta inmune al producto e investigar las correlaciones entre los ADAs, por un lado, y la farmacocinética y la dinámica, así como la eficacia y la seguridad, por otro lado. Por lo tanto, la evaluación de la inmunogenicidad debe incluirse en la planificación de los ensayos clínicos fundamentales, incluida la sincronización del muestreo de ADA y biomarcadores relevantes, si están disponibles, así como la evaluación de la eficacia y la seguridad (**ver sección 2.7**). Los estudios clínicos especiales de inmunogenicidad son generalmente no necesarios.

#### 2.5.1. Fundamentación del programa de muestreo y cinética de la respuesta de anticuerpos

La inmunogenicidad debe probarse sistemáticamente en pacientes mediante muestreo repetitivo programado de rutina, así como de manera sintomática con muestras adicionales, cuando se sospeche la aparición de una respuesta inmune no deseada. Varios factores relacionados con el producto influirán en el desarrollo de una respuesta inmune contra una proteína terapéutica (**ver sección 2.1**). Por lo tanto, el programa de muestreo para la detección de una respuesta inmune debe adaptarse y aplicarse individualmente para cada producto, también teniendo en cuenta su farmacocinética (por ejemplo: eliminación de la vida media) y la tolerancia al fármaco de los ensayos de ADA. Las muestras de referencia siempre deben recogerse.

Los solicitantes deben usar una terminología generalmente aceptada al describir la cinética de la respuesta ADA y los posibles efectos adversos mediados por el sistema inmunitario, teniendo en cuenta la experiencia de productos comparables y publicaciones científicas y reguladoras relevantes (**ver sección 2.7**). Durante el tratamiento, se deben tomar muestras antes de la

ANEXO 1  
GUÍA PARA LA EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE LAS PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS

administración del producto, ya que los niveles residuales de la sustancia activa en la muestra pueden interferir con el ensayo (**ver sección 2.4**).

La frecuencia del muestreo y el momento y el alcance de los análisis también dependerán de la evaluación del riesgo de un medicamento en particular (como se describe en el resumen del programa de inmunogenicidad (**ver sección 2.7**)). Los horarios de muestreo deben diseñarse para distinguir a los pacientes que son transitoriamente positivos de los pacientes que desarrollan una respuesta de anticuerpos persistente. El período de muestreo posterior al tratamiento debe ser lo suficientemente largo como para permitir conclusiones sobre la persistencia de la respuesta inmune desencadenada por la proteína terapéutica y descubrir una reacción inmune que fue suprimida por la misma proteína terapéutica. El tiempo para la(s) muestra(s) posterior al tratamiento está determinado por la vida media de la proteína y la tolerancia al fármaco del ensayo ADA.

Es necesario un muestreo más frecuente en la fase temprana del tratamiento, donde los pacientes tienen mayor riesgo de desarrollar un ADA. El seguimiento a largo plazo de la inmunogenicidad con muestras menos frecuentes proporciona información adicional sobre la evolución y las consecuencias de la inmunogenicidad. En caso de tratamiento crónico continuo, los datos de inmunogenicidad para un año de tratamiento normalmente deberían estar disponibles con autorización previa, pero es posible un seguimiento más corto con una justificación adecuada.

La inmunogenicidad asociada con el tratamiento intermitente debe considerarse sobre la base de una evaluación de riesgos, por ejemplo: experiencia de otros productos similares, riesgos asociados con potencial inmunogenicidad, efecto de refuerzo y persistencia o aparición de anticuerpos después de la exposición.

Si el producto tiene diferentes vías de administración, los solicitantes deben justificar su enfoque con respecto a la evaluación de inmunogenicidad para cada ruta en el momento de la solicitud de registro sanitario (**ver sección 2.7**).

El riesgo de efectos adversos mediados por el sistema inmunitario debe describirse en los capítulos relevantes del Resumen de características del producto de manera concisa y teniendo en cuenta el hecho de que una comparación de resultados de diferentes fuentes o por diferentes ensayos no es confiable. La viabilidad y las posibilidades para el monitoreo de rutina de la inmunogenicidad, incluida la utilidad de las mediciones de concentración de drogas, también deben incluirse en la ficha técnica, si corresponde.

### 2.5.2. Consecuencias sobre la farmacocinética del producto

Los ADAs pueden influir en la farmacocinética, especialmente en la fase de eliminación. Los anticuerpos no neutralizantes "unidos", a veces también pueden modular en lugar de solo disminuir, la eficacia de un producto, por ejemplo: prolongando la vida media. Un cambio en la farmacocinética puede ser una indicación temprana de la formación de anticuerpos. Por lo tanto, se recomienda a los solicitantes que incorporen muestras concomitantes tanto para la farmacocinética como para la inmunogenicidad en todos los estudios de dosis repetidas.

### 2.5.3. Impacto de la inmunogenicidad de seguridad y eficacia

La presencia de ADAs puede o no tener consecuencias clínicas (**ver sección 2.2**). Es esencial que el desarrollo clínico se base en un análisis de riesgos potenciales y las posibilidades para detectarlos y mitigarlos. La planificación del análisis de los efectos adversos mediados por el sistema inmunitario debe basarse en el análisis de riesgos, incluida la experiencia previa del producto (clase), la presencia de estructuras potencialmente inmunogénicas en la población de proteínas y pacientes (**ver sección 2.7**).

Los pacientes con ADA preexistentes pueden exhibir un perfil de eficacia y seguridad diferente y deben analizarse como un subgrupo cuando sea posible. El plan de análisis debe definir complejos de síntomas que puedan estar asociados con hipersensibilidad aguda o retardada y autoinmunidad, así como con la pérdida de eficacia (**ver sección 2.7**). Los posibles efectos adversos inmunológicos deben abordarse en el plan de gestión de riesgos (**ver sección 2.6**).

Cuando se han demostrado los ADA, puede ser útil una caracterización adicional más allá del título y la capacidad neutralizante de los anticuerpos, por ejemplo: clase de inmunoglobulina en caso de hipersensibilidad aguda. También es posible realizar una tipificación adicional de ADA clínicamente importantes o determinar un nivel de "umbral" de ADA más allá del cual haya un impacto significativo en la eficacia y/o seguridad

### 2.5.4. Aspectos metodológicos para evaluar la inmunogenicidad relativa como parte de un ejercicio comparabilidad

Se requieren estudios comparativos de inmunogenicidad comparativa en el desarrollo de productos biosimilares y también puede ser necesario después de los cambios en el proceso de fabricación de un producto dado para comparar las versiones anteriores y posteriores al cambio del producto (**ver sección 2.4.4**). Cuando se realizan cambios en el proceso de fabricación de un producto individual, el ejercicio de comparabilidad es un proceso gradual (ver guía ICH Q5E). Si las pruebas fisicoquímicas y biológicas iniciales indican una diferencia entre las versiones anteriores y posteriores al cambio del producto, se deben considerar las posibles consecuencias para la seguridad y la eficacia, incluida la inmunogenicidad alterada. El tipo de estudios de inmunogenicidad, si es necesario, debe justificarse en función de la(s) diferencia(s) observada(s), vía de administración, curva dosis-respuesta y ventana terapéutica, el impacto clínico potencial y el conocimiento adquirido con este producto y clase de producto (Ver ICH Q5E). La evaluación de la inmunogenicidad como parte de un ensayo clínico para un ejercicio de comparabilidad en el contexto de un cambio de fabricación debe incluir preferiblemente un estudio directo del producto previo y posterior al cambio. En ambos escenarios, el desarrollo biosimilar y un cambio en el proceso de fabricación, la población objetivo del estudio de eficacia, seguridad e inmunogenicidad debe ser sensible a las diferencias en la inmunogenicidad y sus consecuencias y ser representativa de la población o poblaciones para las cuales el producto es indicado. En situaciones de alto riesgo, las muestras deben analizarse de forma continua.

La investigación de la inmunogenicidad debe integrarse con las pruebas de farmacocinética, seguridad y eficacia. Las diferencias en la inmunogenicidad cuestionarán la comparabilidad de un biosimilar y su producto de referencia, así como de las versiones nuevas y antiguas de un producto aprobado, y es requerido un análisis exhaustivo de la causa raíz. Pueden ser aceptables diferencias

menores en la inmunogenicidad sin correlación a nivel de calidad y sin impacto negativo en la eficacia clínica (reducción o pérdida de eficacia) y seguridad. La evaluación del impacto clínico de una diferencia observada en la inmunogenicidad puede ser un desafío debido al tamaño limitado de la muestra y la duración del seguimiento. Si el impacto clínico de la diferencia observada es incierto, por ejemplo: Debido a la rareza del posible efecto adverso grave o la lenta evolución de una respuesta inmune, puede ser necesaria una estrategia específica de gestión de riesgos y una actualización del plan de gestión de riesgos (**ver sección 2.6**).

### 2.5.5. Gestión de la inmunogenicidad

Una reacción inmune perjudicial para una proteína terapéutica no siempre se puede evitar a pesar de los esfuerzos realizados por los solicitantes para seleccionar compuestos que tienen un potencial inmunogénico bajo (**ver sección 2.3**). En tales casos, el solicitante debe, si es posible, explorar las posibilidades de reducir el impacto adverso de la inmunogenicidad observada durante el desarrollo clínico. En algunos casos, co-medicación o antiinflamatoria inmunosupresora puede prevenir de manera significativa o reducir los efectos adversos inmunológicos. En algunos casos, como con factores de coagulación, puede ser posible volver a establecer la tolerancia inmunológica por regímenes de tolerización, por ejemplo mediante la administración de dosis mayores de la proteína terapéutica. Tales regímenes terapéuticos deben ser documentados por estudios clínicos.

## 2.6. Farmacovigilancia

Como parte de la solicitud de registro sanitario, el solicitante debe presentar un plan de gestión de riesgos (RMP), que incluya especificaciones de seguridad del producto, plan de farmacovigilancia y plan de minimización de riesgos, de acuerdo a la "*Normativa Técnica Sanitaria Sustitutiva para el Funcionamiento del Sistema Nacional de Farmacovigilancia (SNFV)*", o el instrumento que la sustituya, y de conformidad con la Guía ICH E2E (Farmacovigilancia). Se debe considerar la inmunogenicidad para la sección de especificación de seguridad del plan de gestión de riesgos de proteínas terapéuticas y, si se incluye, se debe evaluar la necesidad de actividades de farmacovigilancia adicionales. Para los cambios en el proceso de fabricación, las implicaciones de este cambio en el potencial inmunogénico podrían tener que abordarse en el plan de gestión de riesgos. Una vez más, debe enfatizarse que la evaluación de la inmunogenicidad es un enfoque multidisciplinario, en el mejor de los casos, brindando aportes de expertos clínicos, no clínicos y de calidad.

La extensión de los datos sobre inmunogenicidad que pueden y deben obtenerse durante el programa de desarrollo clínico de una proteína terapéutica antes de la aprobación depende de la tasa de eventos y el riesgo asociado impulsado tanto por el potencial inmunogénico de la proteína en la(s) población(es) de pacientes a ser tratados y la rareza de la enfermedad. Por lo tanto, la disponibilidad de datos sobre inmunogenicidad en el momento de la autorización de comercialización (registro sanitario) podría ser limitada. Además, el conocimiento obtenido para la clase de producto y/o el producto de referencia (en el caso del desarrollo biosimilar) debe evaluarse completamente en las secciones relevantes del resumen de seguridad clínica con base en la evidencia disponible con conclusiones apropiadas extraídas sobre si un producto puede presentar



un riesgo tan importante (potencial). Si este es el caso, la inmunogenicidad debe incluirse en el plan de gestión de riesgos como un riesgo potencial o identificado o como un área de información faltante. La inmunogenicidad siempre debe estar relacionada con la consecuencia clínica. Si no surge una preocupación o incertidumbre particular de la evaluación, no se requiere la inclusión por defecto de la inmunogenicidad como un riesgo potencial o como un área de información faltante. Dentro del plan de farmacovigilancia del plan de gestión de riesgos, se debe analizar y evaluar la necesidad de actividades de farmacovigilancia adicionales. En caso de que se consideren necesarios estudios adicionales sobre inmunogenicidad, el diseño más adecuado debe evaluarse en función del objetivo del estudio. En este momento, los ADA y los niveles mínimos no se miden habitualmente en la práctica clínica. Por lo tanto, para obtener datos adicionales sobre la incidencia y títulos de ADA y niveles mínimos, podrían ser necesarios ensayos clínicos adicionales o extensiones de ensayos clínicos en curso en la fase posterior a la autorización. Tal prueba también podría ser necesaria durante el desarrollo del biosimilar en caso de que se recopilen datos de inmunogenicidad adicionales de manera comparativa en la fase posterior a la autorización.

El seguimiento de pacientes tratados con una proteína terapéutica durante la práctica clínica habitual, por ejemplo: mediante registros de pacientes, y se ha demostrado que la recopilación de sospechas de reacciones adversas notificadas espontáneamente es una herramienta valiosa para recopilar datos sobre la seguridad de estos productos. Estas herramientas de farmacovigilancia también se pueden usar para la identificación de eventos adversos relacionados con la inmunogenicidad, por ejemplo: reacciones relacionadas con la perfusión y aplasia pura de glóbulos rojos con eritropoyetinas. En base a los datos de estas fuentes, es importante concluir sobre posibles respuestas inmunes no deseadas basadas en señales sospechosas de seguridad y/o (pérdida de) eficacia, incluidos los cambios en los biomarcadores relevantes, que deben discutirse en el plan de gestión de riesgos.

Si se incluye la inmunogenicidad en la sección de especificaciones de seguridad del plan de gestión de riesgos, se debe discutir la necesidad de actividades adicionales de minimización de riesgos y, si se considera necesario, se deben describir estas actividades. Las actividades de minimización de riesgos de rutina relacionadas con la inmunogenicidad podrían, entre otras, consistir en una guía en el resumen de las características del producto sobre cómo medir los ADA y los niveles mínimos y cómo tratar los ADA de desarrollo y los eventos adversos relacionados.

La identificación del producto y el número de lote sospechoso de causar una reacción adversa, la trazabilidad, es importante para las proteínas terapéuticas. Esto es especialmente importante para los eventos adversos relacionados con la inmunogenicidad, ya sea que se detecten mediante farmacovigilancia de rutina y/o actividades de farmacovigilancia adicionales. Deben tomarse las medidas apropiadas para mejorar la trazabilidad, en particular la recopilación de la marca y el número de lote.

## 2.7. Resumen del programa de inmunogenicidad

Tanto la planificación y la evaluación de los estudios de inmunogenicidad de un producto biológico son ejercicios multidisciplinarios. Los datos que son relevantes para la evaluación de la inmunogenicidad se dispersan a numerosos lugares de la solicitud de autorización de

comercialización (registro sanitario). Por lo tanto, se recomienda que el solicitante incluya un resumen integral de la inmunogenicidad en la solicitud, incluyendo una evaluación de riesgo para apoyar el programa seleccionado de inmunogenicidad. El resumen debe ser conciso y contener enlaces a los capítulos correspondientes de la solicitud. El resumen con la evaluación de riesgos puede evolucionar a través del ciclo de vida del producto y puede ser utilizado para soportar aplicaciones en diferentes etapas de desarrollo del producto.

La evaluación del riesgo puede sugerir un bajo riesgo de efectos adversos inmunomediados. Sin embargo, se espera que la inmunogenicidad se estudie con ensayos validados según el esquema en el **ver sección 2.8**.

La evaluación de riesgos puede tener un impacto en la caracterización adicional de la respuesta inmune (por ejemplo, mapeo de isótopos y epítomos), la frecuencia de muestreo, el momento del análisis y la selección de la población objetivo. El resumen debe incluir los siguientes temas cuando sean aplicables:

### **Análisis de los factores de riesgo**

1. La experiencia previa del producto/la clase de producto
  - a. ¿El producto tiene un equivalente endógeno?
  - b. ¿Los modelos animales proporcionan datos útiles de las consecuencias potenciales de inmunogenicidad. (Por ejemplo, eliminación de una proteína endógena)?
  - c. ¿Existen sitios antigénicos conocidos de la molécula?
  - d. Los intentos para reducir la inmunogenicidad del producto antes y durante los ensayos clínicos.
2. Aspectos físico-químicos y estructurales
  - a. ¿Hay estructuras potencialmente inmunogénicas nuevas, por ejemplo: secuencias que son ajenas al humano?
  - b. Estructura de expresión y el perfil postraducciona, por ejemplo: patrones de glucosilación / glucanos no humanos.
  - c. Estabilidad e impurezas (por ejemplo, presencia de agregados (como partículas visibles o sub-visibles).
  - d. Formulaci3n y envasado, por ejemplo: impurezas potenciales y lixiviables.
3. ¿La vía y/o el modo de administraci3n generan inquietudes o preocupaci3n?
4. El paciente y los factores relacionados con la enfermedad
  - a. Estado de la tolerancia inmunol3gica
    - i. Es propenso a reacciones autoinmunes.
    - ii. Falta de tolerancia inmunol3gica, por ejemplo: defectos en los genes que codifican proteínas end3genas.
    - iii. Terapia inmunomoduladora concomitante.
  - b. Inmunidad preexistente
    - i. Anticuerpos “naturales”.
    - ii. Anticuerpos debido a terapia previa con sustancias relacionadas.



## El programa inmunogenicidad basado en el riesgo

5. Estrategia de ensayo
  - a. Justificación de la elección de los ensayos de:
    - i. Cribado, confirmación y titulación.
    - ii. Neutralizar.
    - iii. Otras, por ejemplo: clase o subclase de inmunoglobulina.
  - b. Especificidad y sensibilidad de los ensayos seleccionados en el contexto del producto en particular
    - i. Selección del o los controles positivos.
    - ii. Determinación del límite de positividad para ADA.
  - c. Fármaco y tolerancia objetiva del ensayo.
  - d. Matriz de interferencia en diferentes poblaciones.
6. Enfoque de la inmunogenicidad en los ensayos clínicos
  - a. Toma de muestras para pruebas de inmunogenicidad
  - b. Justificación de la duración del seguimiento
    - i. En tratamiento.
    - ii. Fuera del tratamiento, post-exposición.
  - c. Farmacocinética
    - i. Posible interferencia de ADA en los ensayos de concentración del producto.
    - ii. Niveles mínimos de fármaco en relación con la tolerancia a fármacos del ensayo ADA.
  - d. Farmacodinamia, los ensayos de eficacia y seguridad
    - i. ¿Cómo el programa pretende revelar la incidencia, la persistencia y la importancia clínica de los posibles ADA?
    - ii. Hipersensibilidad, autoinmunidad, pérdida de eficacia
      1. Definiciones y complejos sintomáticos.
      2. Análisis de las correlaciones clínicas de ADAs.
7. ¿Cómo la evaluación de riesgos influyó en el programa de inmunogenicidad?

## Resultados de inmunogenicidad

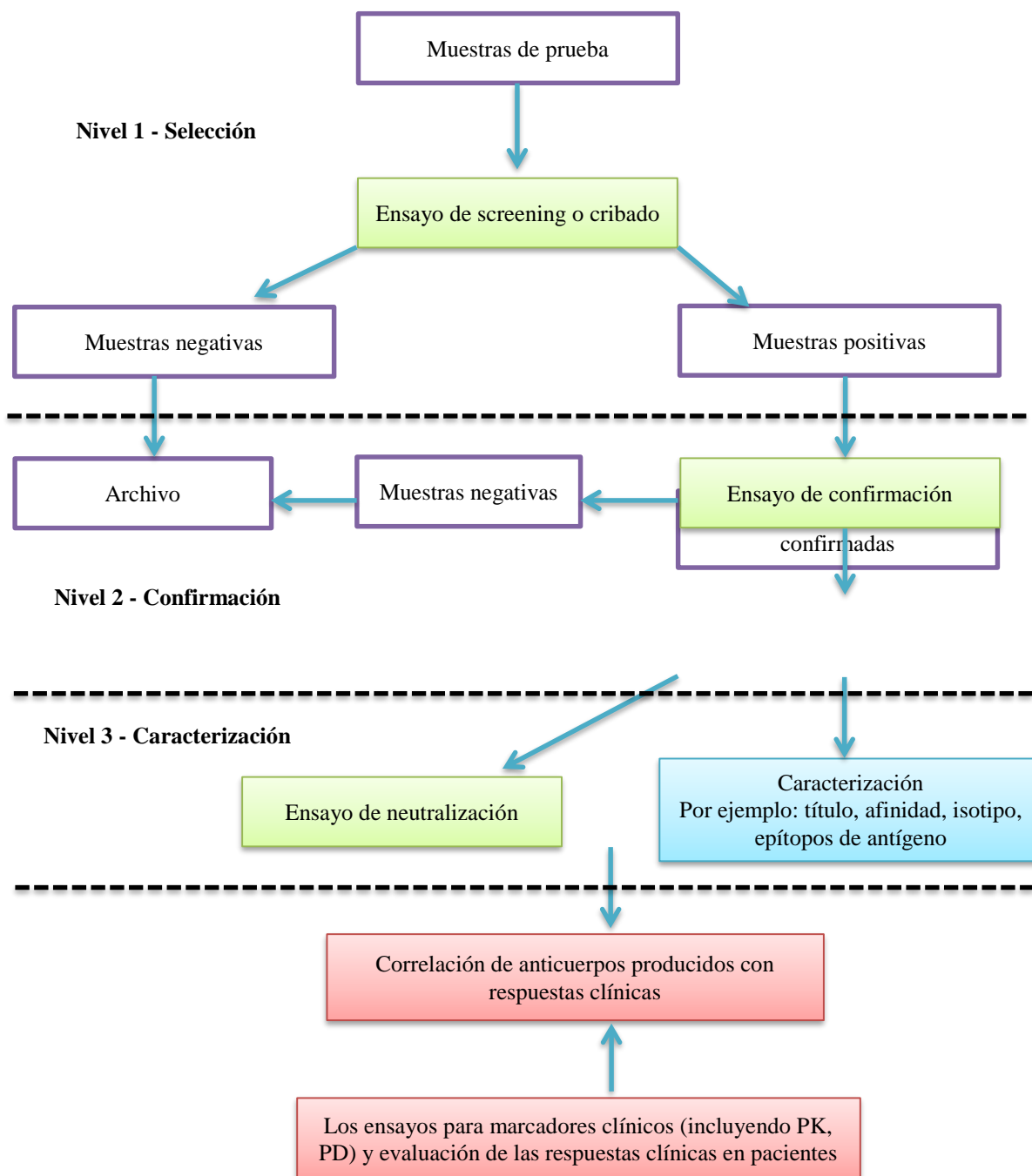
8. Inmunogenicidad en ensayos clínicos (inmunogenicidad relativa en caso de cambios de fabricación y biosimilares)
  - a. Incidencia (Relativa) de ADAs, incluyendo ADAs neutralizantes.
  - b. Títulos (relativos) y persistencia en el tiempo.
  - c. La caracterización adicional si es apropiado, por ejemplo: clases de inmunoglobulina, la reactividad cruzada con proteínas terapéuticas o endógenos relacionados.
  - d. Impacto (Relativo) de ADAs sobre la farmacocinética, farmacodinamia, eficacia y seguridad.
  - e. Impacto de anticuerpos preexistentes en la farmacocinética, farmacodinámica, eficacia y seguridad.

## Conclusiones sobre el riesgo(s) de la inmunogenicidad

9. Impacto de la inmunogenicidad en la relación beneficio/riesgo
10. Herramientas para administrar el riesgo
  - a. Identificación de los grupos de riesgo.
  - b. ¿Existe un nivel o tipo de inmunogenicidad seguro?
  - c. Premedicación, medicación concomitante.
  - d. Desinmunización.
  - e. Herramientas de detección y mitigación de riesgos.
11. ¿Cómo relacionar los eventos adversos con la inmunogenicidad post-comercialización (plan de gestión de riesgos)?

ANEXO 1  
GUÍA PARA LA EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE LAS PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS

## 2.8. Ejemplo de una estrategia para la evaluación de inmunogenicidad



## **ANEXO 2: GUÍA DE USUARIO**

### **GUÍA PARA LA EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES DESTINADOS A USO CLÍNICO IN VIVO**

**Versión [2.0]**

***19 de Diciembre, 2025***

LA AGENCIA NACIONAL DE REGULACIÓN, CONTROL Y VIGILANCIA SANITARIA SE RESERVA EL DERECHO DE ESTE DOCUMENTO, EL CUAL NO DEBE SER USADO PARA OTRO PROPÓSITO DISTINTO AL PREVISTO EN EL MISMO, DOCUMENTOS IMPRESOS O FOTOCOPIADOS SON COPIAS NO CONTROLADAS, VERIFICAR SIEMPRE CON LA ÚLTIMA VERSIÓN VIGENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL.



ANEXO 2  
GUÍA PARA LA EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES DESTINADOS A USO CLÍNICO IN VIVO

## CONTENIDO

1. OBJETIVO.....	2
2. INSTRUCCIONES .....	2

## 1. OBJETIVO

Proporcionar los lineamientos para la evaluación sistemática de una respuesta inmunitaria no deseada contra un anticuerpo monoclonal (mAb) terapéutico o de diagnóstico in vivo en los receptores.

## 2. INSTRUCCIONES

La guía aplica a los anticuerpos monoclonales, sus derivados, y productos de los que forman parte; por ejemplo: conjugados y proteínas de fusión ligadas a la región Fc. Está dirigida a productos en fase final de desarrollo (por ejemplo: en estado de aplicación del registro sanitario). Sin embargo, muchos de los principios son relevantes para las fases más tempranas del desarrollo.

Para la evaluación de la inmunogenicidad de anticuerpos monoclonales destinados a uso clínico in vivo, el solicitante de registro sanitario e investigadores deben seguir los siguientes lineamientos:

### 2.1. Problemas experimentados con ensayos de cribado y de confirmación utilizados en la evaluación de la inmunogenicidad de mAbs

#### 2.1.1. Los ensayos para la detección de anticuerpos

En principio, cualquier formato de inmunoensayo se puede utilizar para medir los anticuerpos contra anticuerpos monoclonales. Sin embargo, los ensayos utilizados para detectar anticuerpos contra mAbs son a menudo más problemáticos, difíciles y pueden ser técnicamente desafiantes. Muchos formatos de ensayo convencionales implican el uso de reactivos antiinmunoglobulina, como anticuerpos contra las inmunoglobulinas, proteína A o proteína G, pero estos son inadecuados para su uso en la detección de anticuerpos contra mAbs ya que muy a menudo se unen al producto en sí. Así, por ejemplo: ELISA simples y ensayos de radioinmunoprecipitación generalmente no son adecuados para uso con mAbs a menos que estén adaptados para superar este problema. Por lo tanto, los diferentes enfoques de ensayo tienen que ser desarrollados para mAb. Un enfoque común es utilizar el formato de “puente”, por ejemplo: para las pruebas ELISA o ensayos de electroquimioluminiscencia, que no requieren reactivos antiinmunoglobulina y así se puede aplicar directamente a los estudios con mAbs. En algunos casos, este procedimiento puede ser menos sensibles que otros métodos de inmunoensayo y puede requerir esfuerzo de desarrollo considerable para producir un ensayo adecuado. También no detectará de manera eficiente anticuerpos IgG que se pueden producir en algunos casos. Otra opción es utilizar la técnica de Resonancia de Plasmones Superficiales (sus siglas en inglés SPR). Esta técnica no requiere reactivos antiinmunoglobulina para la detección de anticuerpos contra mAbs. Es un procedimiento en tiempo real y es por lo tanto rápido y también detecta anticuerpos rápidamente de disociación que se pueden perder por otros métodos. Sin embargo, como técnica de Resonancia de Plasmones Superficiales simplemente detecta la unión con el chip recubierto se necesita proteínas que se confirme que la señal es causada por anticuerpos. Puede ser menos sensible que otros métodos para la detección de anticuerpos de alta afinidad y, en ausencia de sistemas de muestreo automatizados puede tener un rendimiento bajo.

Las muestras (normalmente de suero o plasma) pueden contener sustancias que interfieren con los ensayos, por ejemplo: efectos de matriz que producen resultados positivos o negativos falsos y/o evaluación incorrecta de contenido de anticuerpos. Ejemplos bien conocidos de tales sustancias interferentes son componentes del complemento, proteína de unión a manosa, receptores de Fc, moléculas diana solubles, receptor del complemento 1 y factores reumatoides, pero otras sustancias que incluyen el producto en sí también puede causar problemas. Los ensayos a menudo necesitan ser “a medida” para reducir artefactos y alcanzar los niveles de señal de fondo aceptables, sensibilidad y especificidad. Los solicitantes deben justificar la idoneidad del enfoque elegido, teniendo plenamente en cuenta las limitaciones de cada método.

### **2.1.2. La presencia de producto de mAb en muestras para análisis**

Los productos de mAb intactos tienen vidas medias relativamente largas y persisten en circulación durante largos períodos. Incluso los fragmentos pueden persistir en la sangre durante varios días. Esto puede causar problemas significativos en la detección de respuestas de anticuerpos debido a la presencia de producto de mAb en las muestras recogidas para la evaluación de anticuerpos. Esto normalmente resulta en una estimación artefactualmente baja de contenido de anticuerpos de las muestras afectadas y puede ser tan pronunciada como para causar resultados falsos negativos. Se han propuesto varios enfoques para superar este problema. Una posibilidad es retrasar la toma de muestras hasta que los niveles de producto de mAb hayan disminuido lo suficiente como para no causar problemas. Esto se ha considerado para resolver el problema con algunos productos de mAb, pero requiere una evaluación cuidadosa, en virtud que tiene el potencial de no detectar la inmunogenicidad, ya que los anticuerpos inducidos pueden haber disminuido a niveles indetectables para el momento en que se toman las muestras. Otro enfoque es utilizar una metodología que sea menos afectada por el problema. Algunos inmunoensayos basados en electroquimioluminiscencia parecen mucho menos afectados por producto residual en las muestras que otros métodos, incluyendo ELISAs de puente convencionales. Un procedimiento comúnmente descrito para tratar con el problema es incluir una etapa de disociación antígeno-anticuerpo preliminar en el diseño de ensayo de manera que cualquier complejo presente se interrumpa antes de detectar anticuerpos. Varias versiones de ensayos que incluyen incubaciones de ácido, a veces junto con la separación por afinidad de producto se han descrito para esto, pero deben ser evaluados con cuidado para demostrar que los pasos adicionales no invalidan el ensayo. Una última posibilidad es diluir muestras de modo que el producto residual presente es insuficiente para interferir con el ensayo. Este enfoque necesita cuidado ya que puede resultar en una evaluación de falsos negativos de la inmunogenicidad si el ensayo no es suficientemente sensible para detectar anticuerpos en las muestras diluidas. En algunos casos puede ser necesario someter a ensayo las muestras para la cantidad de mAb residual. En muchos casos, el desarrollo, la validación y las pruebas de métodos anti-mAB, utilizan una combinación de los tres enfoques para reducir la interferencia del producto.



### 2.1.3. Los ensayos confirmatorios

Los ensayos de confirmación pueden sufrir de los mismos problemas que los ensayos de cribado. Es importante seleccionar un ensayo confirmatorio apropiado tomando en consideración las características del ensayo de cribado. El uso de Proteína A y Proteína G puede ser apropiado en ensayos de confirmación para demostrar que la respuesta positiva se debe a una inmunoglobulina; sin embargo, existen otros métodos para este fin.

### 2.1.4. Controles

La generación de suero de control positivo es en general un problema crítico para los estudios de inmunogenicidad de mAbs. El suero de control positivo elegido o anticuerpo purificado es importante para el monitoreo de la sensibilidad del ensayo y especificidad. Si sueros humanos no están disponibles (como es posible durante las primeras fases de desarrollo de productos) entonces el uso de sueros animales es la única opción. La elección de especies para esto tiene consecuencias importantes. Los primates no humanos producen respuestas significativas anti-CDR y anti-marco contra mAbs humanos o humanizados, que pueden imitar estrechamente las respuestas humanas y pueden ser un control positivo apropiado. Sin embargo, las especies no primates generalmente producen anticuerpos principalmente contra las regiones constantes del mAb, que es diferente a las respuestas humanas. El uso de un antisuero anti-idiotípico o mAb puede, en algunos casos, proporcionar un control positivo útil. La selección de controles negativos apropiados es importante. Para los ensayos confirmatorios, se pueden usar muestras con un mAb irrelevante para confirmar la especificidad.

## 2.2. Evaluación de la capacidad de neutralización de anticuerpos inducidos contra mAbs

Los mAbs ejercen su acción por diversos mecanismos van desde la simple unión a antígeno, que solo media el efecto clínico, a la unión al antígeno y la mediación de uno o más mecanismos inmunobiológicos que se combinan para producir la respuesta clínica global. Por lo tanto, aunque una unión sencilla puede parecer ser el único mecanismo operativo para lograr la eficacia clínica, otros efectos pueden también desempeñar un papel en esto. En algunos casos múltiples funciones del mAb pueden estar involucrados en un aditivo o de manera sinérgica para producir un efecto clínico combinado general y esto puede ser difícil de diseccionar experimentalmente para permitir una comprensión clara de cómo el mAb media su potencia clínica. Por lo tanto, si se utilizan anticuerpos monoclonales intactos, se debe tener cuidado de no asumir que los efectos inmunobiológicos mediados por la región Fc del producto no están involucrados en la eficacia clínica, incluso cuando se considera una unión de antígeno simple a ser el principal modo de acción. En este sentido, el uso de un ensayo basado en células para la medición de la neutralización tiene una ventaja. En tales casos una caracterización biológica exhaustiva del mAb debe llevarse a cabo, utilizando ensayos biológicos e inmunológicos adecuados. Después de esto, las propiedades del mAb necesitan ser evaluadas para permitir la selección de una estrategia de ensayo de neutralización apropiada.

Los anticuerpos que neutralizan la actividad biológica de los productos biológicos pueden disminuir la eficacia clínica del producto. Se espera normalmente que la capacidad neutralizante de cualquier anticuerpo inducido sea medida. Cualquier desviación de esta necesidad debe justificarse. Para la mayoría de los productos biológicos, el ensayo de anticuerpos neutralizantes más apropiado es un bioensayo que mide la neutralización de la bioactividad del producto por anticuerpos. Sin embargo, la naturaleza del modo de acción clínico de los mAbs implica que los anticuerpos inducidos que bloquean la unión del mAb a la diana son aquellos que se asocian principalmente con una eficacia clínica reducida. Por lo tanto, los ensayos competitivos de unión pueden ser los ensayos neutralizantes de elección para mAbs en lugar de los bioensayos clásicos. Esto distingue a los mAbs de otras clases de productos biológicos con respecto a la evaluación de inmunogenicidad.

### **2.3. Gestión del riesgo de inmunogenicidad de los anticuerpos monoclonales.**

#### **2.3.1. Identificación del riesgo**

La inmunogenicidad de mAbs es compleja y hay un número de factores a menudo mal entendidos que hacen que sea difícil predecir con certeza si un anticuerpo monoclonal terapéutico o de diagnóstico es probable que provoque una respuesta inmune clínicamente relevante. Se han desarrollado enfoques no clínicos in vitro destinados a identificar epítomos de células T, pero estos tienen una capacidad limitada para predecir la inmunogenicidad de un agente terapéutico en humanos. Sin embargo, tales procedimientos pueden ser útiles para seleccionar moléculas candidatas para un mayor desarrollo.

Los aspectos estándar de inmunogenicidad como se describe en la guía para la evaluación de la inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas deben llevarse a cabo para cada nuevo mAb terapéutico, teniendo en cuenta sus características, la naturaleza del uso previsto y la indicación terapéutica.

Los datos preliminares de inmunogenicidad de los primeros estudios clínicos pueden proporcionar información que puede ser útil para planificar estudios posteriores, por ejemplo: explorar el desempeño de los ensayos bioanalíticos, la detección de anticuerpos preexistentes u otros factores que podrían confundir el reconocimiento de anticuerpos emergentes del tratamiento contra los mAbs. Según una estrategia de identificación y evaluación de riesgos como se describe más adelante, el programa estándar de pruebas de inmunogenicidad puede reducirse con una justificación exhaustiva, o puede ser necesario intensificarlo, dependiendo del nivel de riesgo identificado. El solicitante siempre debe presentar una identificación exhaustiva del riesgo que tenga en cuenta la naturaleza del producto junto con su uso previsto.

#### **a) El conocimiento previo**

El conocimiento disponible o la falta de conocimiento acerca de otros mAbs similares (por ejemplo: de la misma clase objetivo, expresada en el mismo sistema de expresión) es una consideración importante. La percepción de riesgo puede ser mayor si la metodología sea

para detectar anticuerpos contra mAbs o para detectar consecuencias clínicas (por ejemplo: concentración mínima de mAb, parámetros PD y respuesta al tratamiento mAb) de anticuerpos contra mAbs no es suficientemente sensible. En tales casos, puede ser necesario considerar un monitoreo más extenso de la dinámica de respuesta anti-mAb en relación con el resultado terapéutico.

**b) Estructura del anticuerpo monoclonal**

En principio, se pueden producir anticuerpos contra diversos epítopos presentes en diferentes partes de la molécula de mAb, por ejemplo: regiones variables o constantes. Para heterólogos, por ejemplo: secuencia de roedores o mAbs quiméricos, el reconocimiento del anticuerpo como extraño es la base principal para la inmunidad mediada por anticuerpos y los anticuerpos pueden ser provocados contra cualquier parte de la molécula. Con los mAbs de secuencia humana o humanizada, la respuesta inmune es predominantemente antiidiotípica (ya que las regiones determinantes de complementariedad tienen una secuencia hipervariable), lo que claramente puede comprometer las respuestas clínicas al mAb. Sin embargo, en algunos casos, se pueden inducir anticuerpos contra la región constante de mAb humanos o humanizados y esto puede afectar las funciones efectoras del mAb con posibles consecuencias sobre la respuesta clínica. Hay menos experiencia clínica con construcciones emergentes basadas en mAb y esto puede aumentar la percepción de riesgo. Se debe prestar especial atención a los productos de próxima generación, por ejemplo: mAbs biespecíficos o fragmentos de mAb y su capacidad para exponer determinantes antigénicos ocultos.

Los patrones de glicosilación alterados pueden disminuir o aumentar las propiedades inmunogénicas de la molécula (por ejemplo: cambio en el blindaje de la estructura de la proteína). Patrones de glicosilación no típicos, por ejemplo: tal como se encuentra al adoptar sistemas de expresión completamente nuevos; puede introducir un mayor riesgo de inmunogenicidad en comparación con los sistemas de expresión más comúnmente utilizados.

Otros factores que influyen en la inmunogenicidad incluyen impurezas derivadas del proceso de producción y otros atributos de calidad. Por lo tanto, el enfoque analítico y clínico para evaluar, caracterizar y potencialmente mitigar tales riesgos potenciales puede ser más extenso, y el riesgo relacionado con la calidad del producto debe identificarse adecuadamente.

Por ejemplo, un mAb contra un objetivo donde existe una experiencia previa sustancial, pero que se produce usando un sistema de expresión novedoso, puede tener un riesgo bajo percibido en cuanto a su mecanismo de acción, pero un riesgo mayor en cuanto al impacto potencial de impurezas donde poca experiencia existe con respecto a sus efectos sobre la seguridad.

**c) Mecanismo de acción**

El modo de acción del mAb (por ejemplo: Citolítico, apoptótico), y especialmente la naturaleza de la molécula diana (por ejemplo: Inmunodepresión, inmunoestimulante), debe caracterizarse adecuadamente e investigarse exhaustivamente. Las respuestas de anticuerpos contra mAbs que se dirigen al idiotipo de un mAb generalmente dan como resultado una eficacia disminuida. Del mismo modo, el impacto de los anticuerpos contra los mAbs que reconocen regiones alotípicas u otras regiones debe considerarse con cuidado, ya que la formación de complejos inmunes puede provocar efectos no deseados en los receptores.

Los efectos indirectos de los anticuerpos inducidos por los mAb también pueden ser importantes, por ejemplo: es posible que los mAb que atacan a las moléculas involucradas en las cascadas de señalización puedan inducir anticuerpos que entrecruzan las moléculas diana de una manera agonista, lo que puede conducir a una mayor activación del sistema inmune y posiblemente a los síndromes de liberación de citocinas. Esto puede ser difícil de predecir a nivel del paciente individual. Para los mAbs agonistas o para los mAbs donde el entrecruzamiento podría, por consideraciones teóricas, conducir a la inmunoactivación, los solicitantes deben considerar la observación cuidadosa de los pacientes en los primeros ensayos clínicos para ver si ocurren tales eventos.

**d) Factores clínicos**

La inmunogenicidad está significativamente influenciada por factores clínicos. La inmunogenicidad para los mAb puede estar relacionada con la edad, por ejemplo: el recambio proteico es diferente en niños en comparación con adultos y esto puede dar lugar a diferencias en la inmunogenicidad observada, por ejemplo: para anticuerpos utilizados en el tratamiento de la artritis juvenil en comparación con la artritis reumatoide a dosis comparables. La exposición previa a anticuerpos monoclonales similares o relacionados también puede influir en la inmunogenicidad. Los anticuerpos terapéuticos utilizados con esquemas de dosificación intermitente tienen una mayor probabilidad de inducir inmunogenicidad que cuando se utilizan en un esquema de dosificación programada y repetida.

Si los anticuerpos contra un mAb tienen efectos clínicamente significativos depende del sitio de unión del anticuerpo, la afinidad del anticuerpo por el mAb y el título de los anticuerpos que se desarrollan. Los anticuerpos contra los mAb pueden aparecer de manera transitoria y luego desaparecer durante el tratamiento o, alternativamente, persistir durante todo el tratamiento o durante más tiempo. Para algunas terapias de mAb, el desarrollo de anticuerpos no tiene consecuencias clínicas adversas aparentes, pero para otras reduce la eficacia o está asociado con eventos adversos relacionados con la terapia.

### 2.3.2. Evaluación del riesgo

Numerosos factores contribuyen a la generación de una respuesta inmune contra un mAb y éstos necesitan una consideración como parte de la evaluación de riesgos.

Los factores que afectan la incidencia y la gravedad de una respuesta inmune contra un mAb (factores de riesgo relacionados con el producto, el proceso y el paciente/enfermedad) pueden formar la base de un enfoque en el que dichos factores de riesgo se comparan con la disponibilidad y la viabilidad de la evaluación del riesgo (o identificación) y estrategias de mitigación. La identificación de riesgos, basada en los factores discutidos anteriormente, conduce a una evaluación que integra los riesgos individuales en el contexto clínico y un programa de inmunogenicidad diseñado adecuadamente como parte del desarrollo clínico. La evaluación del riesgo requiere un enfoque multidisciplinario que tenga en cuenta todos los riesgos identificados (por ejemplo: relacionados con la estrategia de control de calidad del producto, incluida la formulación del producto, la justificación de los límites de aceptación para las variantes relacionadas con el producto y las impurezas relacionadas con el proceso). Esto también implica que la evaluación general del riesgo debe estar vinculada a cualquier ejercicio de comparabilidad que se realice potencialmente durante el desarrollo, en caso de que se produzcan cambios en el mAb utilizado en las diferentes etapas del desarrollo del producto.

Un aspecto fundamental de la evaluación de riesgos es, por lo tanto, la evaluación de la tasa de ocurrencia y las consecuencias clínicas de una respuesta inmune no deseada, y si estas consecuencias pueden prevenirse, medirse adecuadamente y/o tratarse médicamente. Dependiendo del riesgo identificado y las medidas disponibles para monitorear y mitigar ese riesgo, el programa de pruebas de inmunogenicidad puede ser menor o mayor que el descrito en la guía general (Guía para la evaluación de la inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas). En cualquier caso, los solicitantes deben justificar y discutir su enfoque.

Dependiendo de la clase y subclase del mAb (que afecta las funciones inmunobiológicas, por ejemplo: la unión a los receptores Fc) o el mecanismo de acción, los productos de mAb individuales pueden no tener las mismas consecuencias clínicas asociadas con una respuesta inmune no deseada. Por ejemplo: los mAbs pueden neutralizarse mediante anticuerpos, lo que resulta en una eficacia reducida o puede provocar eventos adversos, como reacciones a la infusión y/o formación de complejos inmunes. Tales reacciones de infusión pueden ser graves, pero (a diferencia de las reacciones de hipersensibilidad alérgica) pueden manejarse con medidas clínicas apropiadas, como el uso de medicamentos previos. Asimismo, en caso de pérdida de eficacia, la disponibilidad de otros mAbs o proteínas terapéuticas relacionadas como opciones de tratamiento alternativas puede ser un factor importante para una estrategia de mitigación de riesgos. Como principio rector general, se deben presentar datos suficientes para estimar la gravedad, la tasa de ocurrencia y la detectabilidad de los riesgos al momento de solicitar un registro sanitario.

Es posible que estos riesgos tengan que ser respaldados por la vigilancia y el monitoreo posteriores a la comercialización, según sea necesario. Como punto de partida, las siguientes consideraciones pueden ser útiles para la evaluación y mitigación de riesgos:

- a) Una estratificación de riesgos basada en los principios de identificación de riesgos, integrada con factores relacionados con el producto como, por ejemplo: identificación de motivos inmunogénicos intrínsecos, perfil fisicoquímico que incluye agregados u otras variantes relacionadas con el producto o procesos, información del desarrollo de la formulación, por ejemplo: solubilidad a pH fisiológico, ubicación del antígeno objetivo, etc.
- b) Ensayo los detalles de rendimiento, especialmente el grado en que la sensibilidad del formato de ensayo del anticuerpo mAb seleccionado se ve comprometida por el producto circulante residual.
- c) En caso de deficiencias inevitables en el ensayo, la disponibilidad de medidas que pueden complementar la monitorización de anticuerpos mAb, por ejemplo: Mediciones PD o parámetros PK.
- d) La disponibilidad de ensayos que detectan respuestas inmunes tempranas (por ejemplo: medición temprana de mAbs de unión, medición de IgM para detectar respuestas inmunes tempranas).
- e) La vulnerabilidad de la población de pacientes; índice terapéutico; estado autoinmune, uso de medicación inmunosupresora, etc.
- f) En el contexto oncológico, la pérdida de respuesta puede ser más difícil de detectar que en otras condiciones clínicas, ya que puede ser difícil relacionar la progresión tumoral con el desarrollo de anticuerpos; la progresión de la enfermedad y la consiguiente pérdida de respuesta a la terapia generalmente se observa en prácticamente todos los pacientes después de un cierto tiempo, y puede ser difícil distinguir esto de los efectos mediados por los anticuerpos. Por lo tanto, una medición más intensa puede tener lugar durante los ensayos clínicos para estimar qué esperar en un entorno posterior a la autorización, especialmente cuando hay alternativas terapéuticas disponibles.
- g) Para la administración del mAb en el hogar o en la clínica: el tratamiento con mAb en la clínica puede ofrecer ventajas para la mitigación inmediata de las reacciones a la infusión o la anafilaxia en caso de que ocurran, pero el uso en el hogar de los mAbs administrados por vía subcutánea puede ofrecer ventajas para la atención del paciente. Por lo tanto, los solicitantes tendrán que sopesar el riesgo de respuestas inmunes no deseadas y sus consecuencias contra el uso clínico previsto. Por ejemplo, los mAbs con una alta incidencia de reacciones después del uso subcutáneo pueden ser menos adecuados para uso doméstico.
- h) Disponibilidad de tratamientos alternativos o procedimientos de diagnóstico en caso de pérdida de eficacia o inducción de reacciones de infusión o anafilaxia.

### 2.3.3. Seguimiento y mitigación de riesgos

Siguiendo este enfoque de identificación y evaluación de riesgos, los solicitantes deben planificar cuidadosamente este concepto temprano en el desarrollo del producto, y volver a revisarlo y actualizarlo regularmente durante el desarrollo del producto y todo el ciclo de vida



ANEXO 2

GUÍA PARA LA EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES DESTINADOS A USO CLÍNICO IN VIVO

del producto mAb a medida que se disponga de nuevos datos. Al comienzo del desarrollo clínico, los solicitantes pueden, por ejemplo, tener que asignar un nivel de riesgo más alto al mAb, aunque el mecanismo de acción per se no necesariamente sugiere un riesgo más alto, si otros factores lo hacen necesario. El nivel de riesgo puede, dependiendo de los resultados de ensayos clínicos más grandes, necesitar ser reconsiderado después de los ensayos. En el momento de la solicitud de registro sanitario, los solicitantes deben justificar y discutir a fondo su concepto general para el diseño y el alcance de las pruebas de inmunogenicidad utilizadas durante su programa de desarrollo.

Para los productos que se afirma que exhiben una ventaja particular con respecto al potencial inmunogénico (por ejemplo: una afirmación en el Resumen de las Características del Producto), generalmente se requieren datos apropiados para respaldar esto. Dependiendo del resultado de la evaluación de riesgos, en algunos casos pueden ser necesarias pruebas más detalladas y adicionales durante los ensayos clínicos. Por ejemplo, en algunos casos, las pruebas de IgE antes de la administración clínica deben considerarse para los pacientes si el mAb contiene estructuras de carbohidratos no humanos, por ejemplo: Galactosa- $\alpha$ -1,3-galactosa, para prevenir la anafilaxia severa. Otra instancia en la que se debe considerar el desarrollo de pruebas de IgE es donde la incidencia de reacciones alérgicas fue alta en la primera administración durante el desarrollo clínico temprano del producto. Si bien la medición de los niveles de las subclases de IgG u otras clases de Ig como la IgA, normalmente no son un requisito estándar para la evaluación de inmunogenicidad de los mAbs, pueden ser necesarios como parte de dicho enfoque cuando se han identificado ciertos riesgos (por ejemplo, aplicación nasal). Sin embargo, generalmente se requiere la determinación de la capacidad neutralizante y de mAbs transitorios versus persistentes mediante muestreo repetido.

La frecuencia y el momento de la toma de muestras y el análisis pueden variar según el nivel de riesgo relativo identificado. Para mAbs de menor riesgo, puede ser posible reducir la frecuencia de muestreo en etapas posteriores del desarrollo, siempre que no se hayan observado eventos adversos o una eficacia reducida. No obstante, el almacenamiento de muestras debe realizarse de forma rutinaria durante todo el programa de desarrollo. Tal enfoque debe estar debidamente justificado. Para los mAbs en los que se determina un riesgo mayor, el muestreo puede ser más frecuente durante todo el desarrollo clínico. En esta situación, puede ser aconsejable analizar muestras en tiempo real. Puede ser necesario durante el desarrollo clínico medir los niveles de anticuerpos, PK, marcadores PD, eficacia y seguridad simultáneamente y durante un período de tratamientos repetidos. Esto permite la evaluación de la importancia clínica del desarrollo de anticuerpos, y también si el efecto del anticuerpo cambia con el tiempo, lo que podría ocurrir como resultado del aumento en el título y/o el cambio de isotipo / maduración de la afinidad de la respuesta de anticuerpos. Los anticuerpos anti-mAb no neutralizantes pueden afectar indirectamente la eficacia al unirse al producto de mAb y afectar sus propiedades farmacocinéticas. Por lo tanto, la medición de los parámetros PK puede ser una ayuda potencial cuando se planifica cómo medir una respuesta de anticuerpos anti-mAb.

La información derivada de los ensayos se puede utilizar para la gestión de riesgos. Por ejemplo, cuando la identificación y evaluación de riesgos ha concluido que se requiere la identificación



ANEXO 2

GUÍA PARA LA EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES DESTINADOS A USO CLÍNICO IN VIVO

temprana de una respuesta inmune y permite la posibilidad de suspender el tratamiento con el mAb, el desarrollo de anticuerpos IgM de baja afinidad puede ser un indicador de una respuesta inmune temprana y medir la IgM las respuestas podrían ayudar en la identificación temprana de pacientes que tienen una respuesta inmune. Asimismo, la detección de anticuerpos de unión no neutralizantes puede ser una indicación temprana del desarrollo posterior de anticuerpos neutralizantes.

Las estrategias de mitigación de riesgos podrían incluir, por ejemplo, estudiar cómo manejar eficazmente a los pacientes que muestran una respuesta inmune, por ejemplo: si los horarios de dosificación pueden intensificarse sin comprometer la seguridad del paciente, etc. Sin embargo, las consideraciones de viabilidad deberán tenerse en cuenta como parte de esto.

Al presentar una solicitud de registro sanitario, se recomienda que los solicitantes presenten un resumen integrado de su estrategia sobre identificación, caracterización, seguimiento, minimización y mitigación de riesgos. Este enfoque basado en el riesgo también debería haberse tenido en cuenta para el plan de gestión de riesgos, donde se explique cómo se abordarán los riesgos potenciales o la información faltante tras la autorización.