

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 023 587**

51 Int. Cl.:

**A61P 43/00** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2021 PCT/US2021/063641**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2022 WO22132982**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2021 E 21854946 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2025 EP 4262859**

54 Título: **Métodos para fabricar terapias biológicas**

30 Prioridad:

**16.12.2020 US 202063126274 P**  
**09.09.2021 US 202163242395 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.06.2025**

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.00%)**  
**One Amgen Center Drive**  
**Thousand Oaks, California 91320, US**

72 Inventor/es:

**JOH, NATHAN;**  
**JOUBERT, MARISA K.;**  
**KLEEMANN, GERD RICHARD;**  
**TOKUDA, JOSHUA M.;**  
**RIEDER, NOEL J.;**  
**NARHI, LINDA OWERS;**  
**ZHANG, ZHONGQI y**  
**ZHANG, YUNLONG**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 3 023 587 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Métodos para fabricar terapias biológicas

### 5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EE. UU. n.º 63/126.274, presentada el 16 de diciembre de 2020, titulada "Métodos para fabricar terapias biológicas", y la Solicitud Provisional de EE. UU. n.º 63/242.395, presentada el 9 de septiembre de 2021, titulada "Métodos para fabricar terapias biológicas".

### 10 CAMPO

Las realizaciones aquí se refieren a métodos para fabricar terapias biológicas, y a niveles de atributos moleculares en terapias biológicas.

### 15 ANTECEDENTES

La estructura o química nativa de las moléculas biológicas (tales como proteínas terapéuticas) se adapta o se altera en respuesta a cambios en el entorno de las moléculas. Otras terapias biológicas, incluidas las terapias basadas en ácidos nucleicos y células, también pueden sufrir cambios dentro de su entorno. Si bien esta flexibilidad en la estructura o la química es necesaria para la función biológica de la mayoría de, si no todas, las moléculas y células biológicas, también presenta muchos desafíos durante el desarrollo y la fabricación de terapias biológicas para aplicaciones farmacéuticas. Por ejemplo, las proteínas terapéuticas soportan diversas condiciones durante las muchas etapas del proceso que conducen a su administración a un paciente. Las muchas etapas del proceso incluyen, por ejemplo, uno o más de la producción de proteínas (por ejemplo, producción recombinante), la recolección, la purificación, la formulación, el llenado, el envasado, el almacenamiento, la entrega, y preparación final inmediatamente antes de la administración al paciente. Durante cada uno de estas etapas, una proteína terapéutica se coloca en uno o más entornos que pueden provocar o no un cambio en su estructura o química. El cambio en la estructura o química puede conducir a la formación de diferentes especies de las terapias biológicas que dan como resultado un producto heterogéneo. Mientras que algunas especies conservan su capacidad de unirse a sus dianas y por lo tanto mantienen la eficacia terapéutica, otras pierden la capacidad de unirse a la diana, y por lo tanto se vuelven funcionalmente inactivas. Para maximizar y mantener el control de calidad de estas terapias biológicas, la industria biofarmacéutica ha centrado muchos esfuerzos en comprender por qué algunas especies pierden actividad mientras que otras la mantienen.

Los atributos moleculares definen las propiedades fisicoquímicas de las moléculas biológicas terapéuticas, y por lo tanto pueden afectar la seguridad y la eficacia del fármaco. Los niveles de atributos críticos para la calidad del fármaco, o atributos críticos de calidad (CQAs), están definidos explícitamente por las especificaciones de pureza del producto, sujetas a extensas revisiones reguladoras.

### 40 SUMARIO

De acuerdo con algunas realizaciones, se describe un método para fabricar una terapia biológica. El método puede comprender detectar un nivel de un atributo molecular de la terapia biológica en una formulación en uno o más puntos de tiempo en condiciones de almacenamiento. El método puede comprender determinar una tasa de cambio del atributo molecular en las condiciones de almacenamiento. El método puede comprender obtener datos sobre la seguridad y/o eficacia *in vivo* de la terapia biológica para sujetos que han recibido una administración de la terapia biológica. El método puede comprender estimar un nivel de exposición al atributo molecular recibido por los sujetos en el momento de la administración de la terapia biológica, basándose en (i) la tasa de cambio del atributo molecular durante el almacenamiento de la terapia biológica en la formulación, y (ii) una duración que la terapia biológica en la formulación estuvo bajo las condiciones de almacenamiento antes de la administración de la terapia biológica. El método puede comprender determinar la presencia o ausencia de una correlación entre el nivel estimado de exposición al atributo molecular y los datos de seguridad y/o eficacia de la terapia biológica. Si no existe correlación, el método puede comprender fabricar lotes de producción de la terapia biológica que comprenden el atributo molecular en un nivel permisible específico del atributo molecular o por debajo de él, en función del nivel estimado de exposición al atributo molecular. Si la correlación está presente, el método puede comprender además establecer una especificación para los niveles del atributo molecular en el momento de la fabricación que no excedan un nivel máximo permisible del atributo molecular de la terapia biológica. El nivel máximo permisible del atributo molecular puede basarse en los niveles más altos estimados de exposición al atributo molecular que no estén asociados con eventos adversos y/o inhibición de la eficacia de la terapia biológica. La fabricación puede comprender además rechazar lotes de producción de la terapia biológica que comprenden niveles del atributo molecular que exceden los niveles máximos permisibles. En algunos casos, el nivel máximo permisible especificado del atributo molecular se calcula para producir un nivel de exposición al atributo al final de la vida útil que sea menor o igual al 90-100 % del nivel más alto estimado de exposición al atributo molecular que no esté asociado con eventos adversos y/o una inhibición de la eficacia en los sujetos.

De acuerdo con algunas realizaciones, se describe un método para desarrollar un procedimiento de fabricación para una terapia biológica. El método puede comprender detectar un nivel de un atributo molecular de la terapia biológica en una formulación en uno o más puntos de tiempo en condiciones de almacenamiento. El método puede comprender determinar una tasa de cambio del atributo molecular en las condiciones de almacenamiento. El método puede comprender obtener datos sobre la seguridad y/o eficacia de la terapia biológica in sujetos que han recibido una administración de la terapia biológica. El método puede comprender estimar un nivel de exposición al atributo molecular recibido por los sujetos en el momento de la administración de la terapia biológica, basándose en (i) la tasa de cambio del atributo molecular durante el almacenamiento de la terapia biológica en la formulación, y (ii) una duración que la terapia biológica en la formulación estuvo bajo las condiciones de almacenamiento antes de la administración de la terapia biológica. El método puede comprender determinar la presencia o ausencia de una correlación entre el nivel estimado de exposición al atributo molecular y los datos de seguridad y/o eficacia de la terapia biológica. Si (a) la correlación está ausente, el método puede comprender establecer el procedimiento de fabricación para producir niveles del atributo molecular iguales o inferiores a un nivel permisible especificado basado en el nivel estimado de exposición al atributo molecular. O, si (b) la correlación está presente, el método puede comprender establecer el procedimiento de fabricación para producir niveles del atributo molecular iguales o inferiores a un nivel máximo permisible especificado del atributo molecular en función del nivel más alto del atributo molecular que no esté asociado con eventos adversos y/o inhibición de la eficacia de la terapia biológica.

De acuerdo con algunas realizaciones, se describe un método para evaluar un impacto clínico de un atributo molecular de una terapia biológica. El método puede comprender detectar un nivel de un atributo molecular de la terapia biológica en una formulación en uno o más puntos de tiempo en condiciones de almacenamiento. El método puede comprender determinar una tasa de cambio del atributo molecular en las condiciones de almacenamiento. El método puede comprender obtener datos sobre la seguridad y/o eficacia de la terapia biológica in sujetos que han recibido una administración de la terapia biológica. El método puede comprender estimar un nivel de exposición al atributo molecular recibido por los sujetos en el momento de la administración de la terapia biológica, basándose en (i) la tasa de cambio del atributo molecular durante el almacenamiento de la terapia biológica en la formulación, y (ii) una duración que la terapia biológica en la formulación estuvo bajo las condiciones de almacenamiento antes de dicha administración. El método puede comprender determinar la presencia o ausencia de una correlación entre la exposición estimada al atributo molecular y la seguridad y/o eficacia de la terapia biológica. Si (a) la correlación está ausente, el método puede comprender determinar que el atributo molecular no afecta ni la seguridad clínica ni la eficacia de la terapia biológica. O, si (b) la correlación está presente, el método puede comprender determinar que el atributo molecular afecta la seguridad y/o eficacia de la terapia biológica. En algunos casos, si (a) la correlación está ausente, el método puede comprender además establecer una especificación para los niveles permisibles del atributo molecular de la terapia biológica, en el que los niveles permisibles del atributo molecular se basan en los niveles más altos estimados de exposición al atributo molecular recibidos por los sujetos. O, si (b) la correlación está presente, el método puede comprender además establecer una especificación para los niveles máximos permisibles del atributo molecular de la terapia biológica, en el que los niveles máximos permisibles del atributo molecular se basan en los niveles del atributo molecular asociados con eventos adversos y/o inhibición de la eficacia de la terapia biológica.

Para cualquiera de los métodos descritos aquí, la estimación puede basarse además en (iii) una dosis de la terapia biológica en dicha administración, y (iv) una cantidad del atributo molecular medida en el momento de la fabricación y/o liberación del lote.

Para cualquiera de los métodos descritos aquí, el nivel del atributo molecular de la terapia biológica en la formulación se puede detectar en dos o más puntos de tiempo en condiciones de almacenamiento.

Para cualquiera de los métodos descritos aquí, uno o más puntos de tiempo o dos o más puntos de tiempo pueden comprender un momento de fabricación, y al menos dos puntos de tiempo posteriores.

Para cualquiera de los métodos descritos aquí, la estimación del nivel de exposición al atributo molecular puede comprender el cálculo:

$$A_t = \left\{ \%A_0 + \sum_{i=1}^n (\%A_{\Delta_i} \times t_i) \right\} \times D$$

en el que  $A_t$  es el nivel estimado de exposición al atributo molecular,  $\%A_0$  es el porcentaje del atributo molecular en el momento de la liberación del lote,  $\%A_{\Delta_i}$  es la tasa de cambio del porcentaje del nivel del atributo molecular a lo largo del tiempo en una condición de almacenamiento dada,  $t_i$  es el tiempo de almacenamiento en la condición dada, y  $D$  es la concentración de la dosis de administración.

Para cualquiera de los métodos descritos aquí, la estimación del nivel de exposición al atributo molecular puede comprender el cálculo:

$$\%A_{rel.} = \frac{A_t}{D} \times 100\%$$

5 en el que  $\%A_{rel.}$  es el porcentaje del nivel relativo de la exposición al atributo molecular con respecto a la dosis, y en el que  $A_t$  es el nivel de la exposición al atributo molecular calculado utilizando la ecuación 1 o 2, y en el que  $D$  es la concentración de la dosis en la dimensión del peso del ingrediente farmacéutico activo asociado con cada tratamiento.

Para cualquiera de los métodos descritos aquí, la correlación puede comprender una correlación ponderada entre la exposición al atributo y las apariciones de eventos adversos.

10 Para cualquiera de los métodos descritos aquí, determinar una presencia o ausencia de una correlación entre el nivel estimado de exposición al atributo molecular y los datos de seguridad y/o eficacia de la terapia biológica puede comprender una estimación bayesiana.

15 Para cualquiera de los métodos descritos aquí, la terapia biológica en la formulación puede haber estado bajo condiciones de almacenamiento durante diferentes duraciones en las administraciones a diferentes sujetos.

20 Para cualquiera de los métodos descritos aquí, la administración (de la terapia biológica) puede comprender dos o más eventos de administración. En algunos casos, el nivel estimado de exposición al atributo molecular recibido por los sujetos en el momento de la administración (de la terapia biológica) puede ser un máximo o un promedio de los dos o más eventos de administración.

25 Para cualquiera de los métodos descritos aquí, la administración (de la terapia biológica) puede comprender una infusión continua, y la estimación puede comprender calcular un nivel estimado de exposición al atributo molecular durante dos o más intervalos de la infusión continua, tales como intervalos de 24 horas.

Para cualquiera de los métodos descritos aquí, los datos de seguridad pueden incluir datos de eventos adversos. En algunos casos, los datos de seguridad pueden incluir una evolución temporal de un evento adverso.

30 Para cualquiera de los métodos descritos aquí, los datos de eficacia pueden comprender datos de criterios de valoración clínicos.

35 Para cualquiera de los métodos descritos aquí, el atributo molecular puede comprender al menos uno de los siguientes: especies ácidas, especies básicas, especies de alto peso molecular, número de partículas subvisibles, bajo peso molecular, peso molecular medio, glicosilación (tal como cadena pesada no glicosilada o rica en manosa), cadena no pesada y cadena ligera, desamidación, desaminación, ciclación, oxidación, isomerización, fragmentación/recorte, variantes N-terminales y C-terminales, especies reducidas y parciales, estructura plegada, hidrofobia superficial, modificación química, enlace covalente, un motivo de aminoácido C-terminal PARG, o un motivo de aminoácido C-terminal PAR-Amida. Para cualquiera de los métodos descritos aquí, el atributo molecular puede comprender al menos uno de los siguientes: especies ácidas, especies básicas, especies de alto peso molecular, isómeros de aminoácidos, o número de partículas subvisibles.

45 Para cualquiera de los métodos descritos aquí, la terapia biológica puede seleccionarse del grupo que consiste en: un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, un producto de proteína de anticuerpo, una molécula activadora de células T biespecíficas (BiTE<sup>®</sup>), un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo trispecífico, una proteína de fusión Fc, una proteína recombinante, un virus recombinante, una célula T recombinante, un péptido sintético, y un fragmento activo de una proteína recombinante.

50 Para cualquiera de los métodos descritos aquí, la formulación puede ser una formulación farmacéuticamente aceptable. Para cualquiera de los métodos descritos aquí, el sujeto (o paciente) puede ser un sujeto (o paciente) humano.

55 Para cualquiera de los métodos descritos aquí, detectar el nivel de un atributo molecular de la terapia biológica puede comprender espectrometría de masas, cromatografía, electroforesis, espectroscopia, oscurecimiento de la luz, un método de partículas (tal como masa resonante de tamaño de nanopartícula/visible/micrométrico o un movimiento browniano), centrifugación analítica, imagenología o caracterización por imagenología, o inmunoensayo.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

60 **Las FIG. 1A-C** son una serie de gráficos que ilustran componentes de enfoques computacionales y estadísticos para determinar el Impacto Clínico de los Atributos (CIA) de acuerdo con las realizaciones aquí descritas.

Las FIG. 2A-B son una serie de gráficos que ilustran el impacto en ADA por atributos de mAb A (FIG. 1A) y mAb B (FIG. 1B) de acuerdo con las realizaciones aquí descritas. En cada gráfico de la FIG. 2B, los resultados para pacientes ADA negativos se muestran a la izquierda y los resultados para pacientes ADA positivos se muestran a la derecha.

5 Las FIG. 3A-B son una serie de gráficos que ilustran el análisis de CIA (sujetos agrupados según el  $A_t$  representativo) de la incidencia de ADA para Atributos de mAb A (FIG. 3A) y mAb B (FIG. 3B) de acuerdo con las realizaciones aquí descritas.

10 Las FIG. 4A-B son una serie de gráficos que ilustran el análisis de CIA (sujetos agrupados según el  $A_t$  representativo) del curso temporal de ADA para los atributos de mAb A (FIG. 4A) y mAb B (FIG. 4B) de acuerdo con las realizaciones aquí descritas.

15 Las FIG. 5A-C es una serie de gráficos que ilustran la asociación entre la respuesta de ADA y el  $A_t$  representativo (cantidad de exposición al atributo en el momento de la administración del tratamiento) para mAb B. En cada gráfico de la FIG. 5A, los resultados de todos los tratamientos para pacientes ADA positivos se muestran a la izquierda, los resultados de todos los tratamientos para pacientes ADA negativos se muestran en el centro, y los resultados de todos los tratamientos relevantes para ADA para pacientes ADA positivos se muestran a la derecha.

20 La FIG. 6 es una serie de gráficos que ilustran el impacto de los factores en los tratamientos sobre ADA. En cada gráfico de la FIG. 6, los resultados para pacientes ADA negativos se muestran a la izquierda y los resultados para pacientes ADA positivos se muestran a la derecha.

25 La FIG. 7A-B es una serie de gráficos que ilustran los análisis de CIA de sujetos agrupados según el resultado clínico conocido retrospectivamente (FIG. 7A) y, para los sujetos agrupados según el  $A_t$  representativo, Incidencia del Impacto en ADA por Atributos de mAb A (FIG. 7B). En cada gráfico de la FIG. 7A, los resultados para pacientes ADA negativos se muestran a la izquierda y los resultados para pacientes ADA positivos se muestran a la derecha.

30 La FIG. 8 es un gráfico que ilustra el análisis de CIA de sujetos agrupados según el resultado clínico conocido retrospectivamente para el Impacto en ADA por Atributos de mAb A utilizando estudios clínicos en etapa avanzada.

La FIG. 9 es un gráfico que ilustra el  $A_t$  promedio o máximo utilizado como  $A_t$  representativo analizado en sujetos agrupados según el  $A_t$  representativo, para el Impacto en ADA por Atributos de mAb B.

35 Las FIG. 10A-B son gráficos que muestran ejemplos de evaluaciones del impacto de los atributos moleculares y la potencia del Producto C, una molécula BiTE<sup>®</sup> canónica, en 6 eventos adversos. En cada uno de los gráficos de la FIG. 10A, para cada categoría de valor del eje X (0, >0-15, o >15), los pacientes sin eventos adversos se muestran a la izquierda y los pacientes con eventos adversos se muestran a la derecha. En cada uno de los gráficos de la FIG. 10B, para cada categoría de valor del eje X (0, >0-15, o >15), los pacientes sin eventos adversos o con  $G \leq 2$  eventos adversos se muestran a la izquierda y los pacientes con  $G \geq 3$  eventos adversos se muestran a la derecha.

40 Las FIG. 11A-D es una serie de gráficos que muestran un análisis del impacto de especies de alto peso molecular (HMW) en la pirexia utilizando un método como el descrito aquí que no utiliza estimación bayesiana (FIG. 11A-B), y un método como se describe aquí que utiliza estimación bayesiana (FIG. 11C-D).

#### 45 DESCRIPCION DETALLADA

Se describen aquí métodos para fabricar una terapia biológica (tal como una proteína terapéutica, un ácido nucleico, o una terapia que comprende células) en los que la seguridad y la eficacia de la terapia biológica se controlan limitando los niveles de exposición al atributo a un sujeto. Después de fabricar un lote de producción de una terapia biológica, ésta se almacenará en formulación durante un período de tiempo antes de administrarse a un sujeto. Durante ese tiempo de almacenamiento, los niveles de los atributos moleculares de la terapia biológica pueden cambiar. Además, los niveles de atributos moleculares pueden variar entre diferentes lotes de producción, por ejemplo reflejando diferencias en los niveles de atributos moleculares en diferentes etapas de producción entre el cultivo celular inicial y el producto farmacológico final de la terapia biológica. Por ejemplo, pueden aumentar los niveles de atributos tales como especies ácidas, especies básicas, especies de alto peso molecular, isómeros de aminoácidos, o partículas subvisibles. Dichos atributos pueden provocar una disminución de la eficacia de la terapia biológica, y/o pueden provocar eventos adversos en un sujeto que recibe la terapia biológica. Como se describe aquí, se pueden modelar los cambios en los niveles de atributos moleculares durante el almacenamiento. Con base en el nivel de atributo molecular en el momento en que se fabrica un lote de producción de una terapia biológica, la cantidad de tiempo que la terapia biológica en formulación está almacenada antes de la administración a un sujeto, la tasa de cambio del atributo molecular en el almacenamiento, y la dosis de la terapia biológica, se puede calcular el nivel de atributo molecular en el momento de la administración al sujeto. Además, si el nivel real de atributo molecular en el momento de la administración no está asociado con eventos adversos o pérdida de eficacia, se puede determinar que ese nivel de atributos moleculares es seguro y efectivo. En consecuencia, utilizando los métodos descritos aquí, se pueden producir lotes de producción de la terapia biológica a niveles específicos o por debajo de ellos, en función del nivel que se considere seguro y eficaz en el momento de la administración.

Se contempla que si bien la criticidad y las especificaciones de fabricación de los atributos moleculares se han determinado utilizando métodos convencionales, la criticidad y las especificaciones determinadas convencionalmente para los atributos moleculares pueden presentar poca relevancia clínica. La criticidad generalmente se investiga utilizando sistemas de modelos no humanos, y los límites de especificación reflejan los bajos niveles de atributos que se pueden alcanzar razonablemente durante la fabricación y el almacenamiento. Como alternativa, en un enfoque de conocimiento previo o de experiencia clínica, se propone que un atributo no sea crítico cuando rara vez se observan consecuencias clínicas para otros productos farmacéuticos que contienen el atributo. Este enfoque, sin embargo, ignora la posible variabilidad específica del producto en el impacto de los atributos. Además, los eventos adversos pueden ser causados por un atributo y aún así parecer raros, si los lotes que contienen un nivel suficientemente alto del atributo para causar los eventos se distribuyen con poca frecuencia en las clínicas debido a la variabilidad de lote a lote.

Los métodos descritos aquí pueden utilizar un enfoque de análisis de datos que prueba si existe una correlación entre el nivel real estimado de exposición del paciente a un atributo determinado y el grado de aparición de un resultado clínico mediante el análisis de los datos de estudios clínicos y estudios de análisis de calidad del producto. Este enfoque puede denominarse Impacto Clínico de los Atributos (CIA). Los métodos descritos aquí utilizan datos clínicos reales y evaluaciones de los niveles de exposición a atributos en el momento en que se administra una terapia biológica. Estos métodos proporcionan una evaluación en el mundo real del impacto de los atributos moleculares, superando las deficiencias de los enfoques convencionales que han utilizado sistemas de modelos no humanos para determinar los niveles de atributos, y que no han tenido en cuenta la exposición a los atributos en el momento de la administración.

### **Atributos moleculares**

"Atributos moleculares" y las variaciones de este término raíz tienen su significado ordinario y habitual como lo entendería una persona con conocimientos normales en la técnica en vista de esta divulgación. Se refiere a una estructura modificada química o físicamente en una macromolécula, tal como una proteína o un ácido nucleico, y puede caracterizarse en términos de su identidad fisicoquímica o tipo de atributo y ubicación dentro de la secuencia de la macromolécula, por ejemplo la posición del aminoácido en el que está presente el atributo. Por ejemplo, los restos de asparagina y glutamina son susceptibles a la desamidación. Una asparagina desamidada en la posición 10 de una secuencia de aminoácidos de una proteína terapéutica es un ejemplo de un atributo. Se describen aquí tipos de atributos moleculares ejemplares. Para mayor concisión, los atributos moleculares pueden denominarse aquí simplemente "atributos". Los niveles de atributos críticos para la calidad del fármaco, o atributos críticos de calidad (CQA), pueden definirse explícitamente en las especificaciones de pureza del producto. Estas especificaciones suelen estar sujetas a extensas revisiones reguladoras. En algunas realizaciones, una especificación puede establecer los niveles permisibles de uno o más atributos moleculares en la fabricación de una terapia biológica.

En algunas realizaciones, el atributo molecular comprende o consiste en una o más de especies ácidas, especies básicas, especies de alto peso molecular, número de partículas subvisibles, bajo peso molecular, peso molecular medio, glicosilación (tal como cadena pesada no glicosilada o rica en manosa), cadena no pesada y cadena ligera, desamidación, desaminación, ciclación, oxidación, isomerización, fragmentación/recorte, variantes N-terminales y C-terminales, especies reducidas y parciales, estructura plegada, hidrofobia superficial, modificación química, enlaces covalentes, un motivo de aminoácido C-terminal PARG, o un motivo de aminoácido C-terminal PAR-Amida.

PARG es una variante C-terminal alternativa de anticuerpos que puede ocurrir como resultado de un ajuste alternativo. Representa 4 aminoácidos (Prolina, Alanina, Arginina, Glicina), en la que el "AR" se insertó genéticamente en la secuencia C-terminal de IgG2 canónica. La PAR-amida es otra variante C-terminal que resulta de un procesamiento posterior de PARG. Se refiere a la glicina C-terminal que se escinde de los anticuerpos que terminan en PARG, dejando un grupo amida en la arginina C-terminal.

En algunas realizaciones, el atributo molecular comprende o consiste en al menos uno de: especies ácidas, especies básicas, especies de alto peso molecular, isómeros de aminoácidos, o número de partículas subvisibles.

### **Técnicas para detectar niveles de atributos moleculares**

Se puede utilizar cualquier técnica analítica adecuada para detectar un atributo molecular con los métodos descritos aquí. Las técnicas para detectar un atributo molecular incluyen, pero no se limitan a, espectrometría de masas, cromatografía, electroforesis, espectroscopia, oscurecimiento de la luz, métodos de partículas (masa resonante de tamaño de nanopartículas/visible/micrométrico o un movimiento browniano), centrifugación analítica, imagenología o caracterización imagenológica, e inmunoensayos.

Las técnicas ejemplares para detectar atributos moleculares incluyen cartografiado de péptidos reducidos y no reducidos (que puede detectar modificaciones químicas), cromatografía (tal como cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), cromatografía de intercambio iónico (IEX), tal como cromatografía de intercambio catiónico (CEX), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de afinidad, tal como cromatografía en columna de

proteína A, o cromatografía de fase inversa (RP)), enfoque isoeléctrico capilar (cIEF), electroforesis capilar en zona (CZE), fraccionamiento de flujo libre (FFF), o ultracentrifugación (UC), HIAC (tal como para detectar el recuento de partículas subvisibles), MFI (tal como para detectar el recuento de partículas subvisibles y la morfología), inspección visible (partículas visibles), SDS-PAGE (tal como para detectar fragmentos, agregados covalentes), análisis de color (Trp Ox), rCE-SDS y nrCE-SDS (tal como para detectar fragmentos que son moléculas parciales), métodos de dimensionamiento de nanopartículas, métodos de espectroscopia (tales como FTIR, CD, fluorescencia intrínseca, o unión de colorante ANS), un ensayo de Ellman (sulfhidrilos libres), SEC-MALS, HILIC (mapa de glicanos), y ELISA (tal como para detectar HCP).

## 10 **Terapias Biológicas**

Como se utiliza aquí, "terapia biológica" y las variaciones de este término raíz tienen su significado ordinario y habitual como lo entendería una persona con conocimientos normales en la técnica en vista de esta divulgación. Se refiere a una composición terapéutica que comprende una macromolécula biológica, por ejemplo una terapia génica, una proteína terapéutica, un ácido nucleico, un virus, o una célula o una porción de la misma.

En los métodos descritos aquí, la terapia biológica puede seleccionarse del grupo que consiste en: un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, un producto de proteína de anticuerpo, una molécula activadora de células T biespecíficas (BiTE®), un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo trispecífico, una proteína de fusión Fc, una proteína recombinante, un virus recombinante, una célula T recombinante, un péptido sintético, ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN), y un fragmento activo de una proteína recombinante.

Un "anticuerpo" tiene su significado habitual y ordinario como lo entiende una persona con conocimientos normales en la técnica en vista de esta divulgación. Se refiere a una inmunoglobulina de cualquier isotipo con unión específica al antígeno diana, e incluye, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados, y totalmente humanos. A modo de ejemplo, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. A modo de ejemplo, los anticuerpos humanos pueden ser de cualquier isotipo, incluidos IgG (incluidos los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgA (incluidos los subtipos IgA1 e IgA2), IgM e IgE. Un anticuerpo IgG humano generalmente estará compuesto por dos cadenas pesadas de longitud completa y dos cadenas ligeras de longitud completa. Los anticuerpos pueden derivar únicamente de una única fuente, o pueden ser "quiméricos", es decir, diferentes porciones del anticuerpo pueden derivar de dos o más anticuerpos diferentes de la misma especie o de especies diferentes. Se entenderá que una vez que se obtiene un anticuerpo de una fuente, puede sufrir modificación por ingeniería adicional, por ejemplo para mejorar la estabilidad y el plegamiento. En consecuencia, se entenderá que un anticuerpo "humano" puede obtenerse de una fuente, y puede sufrir modificación por ingeniería adicional, por ejemplo en la región Fc. El anticuerpo diseñado todavía puede ser considerado como un tipo de anticuerpo humano. De manera similar, las variantes de un anticuerpo humano, por ejemplo aquellas que han experimentado una maduración de afinidad, también se entenderán como "anticuerpos humanos", a menos que se indique lo contrario. En algunas realizaciones, un anticuerpo comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un anticuerpo monoclonal humano, humanizado, o quimérico.

Una "cadena pesada" de una proteína de unión a antígeno (tal como un anticuerpo) incluye una región variable ("VH") y tres regiones constantes: CH1, CH2, y CH3. En las FIGS. 9A-B se muestran ejemplos de regiones constantes de cadena pesada adecuadas para las proteínas de unión a antígeno descritas aquí, incluidas las regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas ejemplares. Una "cadena ligera" de una proteína de unión a antígeno (tal como un anticuerpo) incluye una región variable ("VL") y una región constante ("CL"). Las cadenas ligeras humanas incluyen cadenas kappa y cadenas lambda. Las regiones constantes de cadena ligera ejemplares adecuadas para las proteínas de unión a antígeno descritas aquí, incluidas las regiones constantes lambda humana y kappa humana se muestran en la FIG. 9C.

En diversos aspectos, la terapia biológica es un producto de proteína de anticuerpo. Como se utiliza aquí, la expresión "producto de proteína de anticuerpo" se refiere a una cualquiera de varias alternativas de anticuerpos que en diversos casos se basan en la arquitectura de un anticuerpo pero no se encuentran en la naturaleza. En algunos aspectos, el producto de proteína de anticuerpo tiene un peso molecular en el intervalo de al menos alrededor de 12-150 kDa. En ciertos aspectos, el producto de proteína de anticuerpo tiene un intervalo de valencia (n) desde monomérico (n = 1), a dimérico (n = 2), a trimérico (n = 3), a tetramérico (n = 4), si no una valencia de orden superior. Los productos de proteína de anticuerpo, en algunos aspectos, son aquellos basados en la estructura completa del anticuerpo y/o aquellos que imitan fragmentos de anticuerpos que conservan la capacidad completa de unión al antígeno, por ejemplo scFvs, Fabs y VHH/VH (que se analizan a continuación). El fragmento de anticuerpo de unión a antígeno más pequeño que retiene su sitio de unión a antígeno completo es el fragmento Fv, que consiste completamente en regiones variables (V). Se usa un enlazador peptídico de aminoácido flexible y soluble para conectar las regiones V a un fragmento scFv (fragmento variable monocatenario) para la estabilización de la molécula, o los dominios constantes (C) se añaden a las regiones V para generar un fragmento Fab [fragmento, unión a antígeno]. Tanto los fragmentos scFv como Fab se pueden producir fácilmente en células hospedantes, por ejemplo células hospedantes procariontas. Otros productos de proteína de anticuerpo incluyen scFv estabilizado por enlace de disulfuro (ds-scFv), Fab monocatenario (scFab), así como formatos de anticuerpos di- y multiméricos como dia-, tria- y tetra-cuerpos, o minicuerpos (miniAbs) que comprenden diferentes formatos que consisten en scFv unidos a dominios de oligomerización. Los fragmentos más pequeños son VHH/VH de los Ab de cadena pesada de camélidos, así como los

Ab de un solo dominio (sdAb). El elemento estructural que se usa más frecuentemente para crear formatos novedosos de anticuerpo es el fragmento de anticuerpo (scFv) de dominio variable (V) de una sola cadena, que comprende dominios V de la cadena pesada y ligera (dominio VH y VL) unidos por un conector peptídico de ~15 residuos de aminoácidos. Una pepticuerpo o fusión péptido-Fc es aún otro producto de proteína de anticuerpo. La estructura de un pepticuerpo consiste en un péptido biológicamente activo injertado en un dominio Fc. Los pepticuerpos están bien descritos en la técnica. Véase, por ejemplo, Shimamoto et al., mAbs 4(5): 586-591 (2012).

Las terapias biológicas adecuadas para los métodos descritos aquí pueden incluir polipéptidos, incluidos aquellos que se unen a uno o más de los siguientes: Estas incluyen proteínas CD, incluyendo CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD30 y CD34; incluyendo las que interfieren con la unión al receptor. Proteínas de la familia de receptores HER, que incluyen, HER2, HER3, HER4 y el receptor de EGF. Moléculas de adhesión celular, por ejemplo, LFA-I, Mol, p150, 95, VLA-4, ICAM-I, VCAM e integrina alfa v/beta 3. Factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular ("VEGF"), la hormona del crecimiento, la hormona estimulante de la tiroides, la hormona estimulante del foliculo, la hormona luteinizante, el factor liberador de la hormona del crecimiento, la hormona paratiroidea, la sustancia inhibidora de Müller, la proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1 alfa), la eritropoyetina (EPO), el factor de crecimiento nervioso, tal como NGF-beta, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), los factores de crecimiento de fibroblastos, incluidos, por ejemplo, aFGF y bFGF, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), los factores de crecimiento transformantes (TGF), incluidos, entre otros, TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , incluidos TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, TGF- $\beta$ 4, o TGF- $\beta$ 5, los factores de crecimiento similares a insulina I y II (IGF-I e IGF-II), des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), y factores osteoinductivos. Las insulinas y proteínas relacionadas con la insulina, incluyendo la insulina, cadena A de insulina, cadena B de insulina, proinsulina y proteínas de unión al factor de crecimiento similar a insulina. Proteínas de coagulación y relacionadas con la coagulación, tales como, entre otros, factor VIII, factor tisular, factor de von Willebrand, proteína C, alfa-1-antitripsina, activadores del plasminógeno, tales como urocinasa y activador tisular del plasminógeno ("t-PA"), bombesina, trombina y trombopoyetina; (vii) otras proteínas sanguíneas y séricas, incluyendo, aunque sin limitación, albúmina, IgE y antígenos de grupos sanguíneos. Factores estimulantes de colonias y receptores de los mismos, incluyendo los siguientes, entre otros, M-CSF, GM-CSF y G-CSF, y receptores de los mismos, tales como el receptor de CSF-1 (c-fms). Receptores y proteínas asociadas a receptor, incluyendo, por ejemplo, receptor flk2/flt3, receptor de obesidad (OB), receptor de LDL, receptores de la hormona del crecimiento, receptores de trombopoyetina ("TPO-R", "c-mpl"), receptores de glucagón, receptores de interleucina, receptores de interferón, receptores de linfocitos T, receptores del factor de células madre, tales como c-Kit, y otros receptores. Ligandos de receptor, incluyendo, por ejemplo, OX40L, el ligando para el receptor OX40. Factores neurotróficos, incluyendo factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF) y neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6). Cadena A de relaxina, cadena B de relaxina y prorelaxina; interferones y receptores de interferón, que incluyen, por ejemplo, interferón-alfa, - $\beta$  y - $\gamma$ , y sus receptores. Interleucinas y receptores de interleucinas, incluyendo IL-1 a IL-33 y receptores de IL-1 a IL-33, tal como el receptor de IL-8, entre otros. Antígenos víricos, incluyendo un antígeno vírico de la envoltura del virus del SIDA. Lipoproteínas, calcitonina, glucagón, factor natriurético auricular, tensorioactivo pulmonar, factor de necrosis tumoral-alfa y -beta, encefalina, RANTES (regulado después de la activación de linfocitos T normales, expresados y secretados), péptido asociado a gonadotropina de ratón, DNasa, inhibina y activina. Integrina, proteína A o D, factores reumatoides, inmunotoxinas, proteína morfogenética ósea (BMP), superóxido dismutasa, proteínas de membrana de superficie, factor acelerador de la desintegración (DAF), envoltura del VIH, proteínas de transporte, receptores de localización, adhesinas, proteínas reguladoras, inmunoadhesinas, anticuerpos. Miostatinas, proteínas TALL, incluida TALL-I, proteínas amiloides, incluidas, pero sin limitarse a, proteínas beta amiloides, linfopoyetinas del estroma tímico ("TSLP"), ligando RANK ("RANKL" u "OPGL"), c-kit, receptores de TNF, incluido el receptor de TNF tipo 1, TRAIL-R2, angiopoyetinas, y fragmentos biológicamente activos o análogos o variantes de cualquiera de los anteriores.

Los ejemplos de terapias biológicas adecuadas para los métodos descritos aquí incluyen anticuerpos tales como infliximab, bevacizumab, cetuximab, ranibizumab, palivizumab, abagovomab, abciximab, actoxumab, adalimumab, afelimomab, afuzumab, alacizumab, alacizumab pegol, ald518, alemtuzumab, alirocumab, altumomab, amatuximab, anatumomab mafenatox, anrukinzumab, apolizumab, arcitumomab, aselizumab, altinumab, atlizumab, atorolimiumab, tocilizumab, bapineuzumab, basiliximab, bavixumab, bectumomab, belimumab, bemarituzumab, benralizumab, bertilimumab, besilesomab, bevacizumab, bezlotoxumab, biciromab, bivatumab, bivatumab mertansina, blinatumomab, blosozumab, brentuximab vedotin, briakinumab, brodalumab, canakinumab, cantuzumab mertansina, cantuzumab mertansina, caplacizumab, capromab pendetida, carlumab, catumaxomab, cc49, cedelizumab, certolizumab pegol, cetuximab, citatuzumab bogatox, cixutumumab, clazakizumab, clenoliximab, clivatuzumab tetraxetan, conatumomab, crenezumab, cr6261, dacetuzumab, daclizumab, dalotuzumab, daratumumab, demcizumab, denosumab, dordlimomab aritox, drozitumab, duligotumab, dupilumab, ecomeximab, eculizumab, edobacomab, edrecolomab, efalizumab, efungumab, elotuzumab, elsilimumab, enavatuzumab, enlimomab pegol, enokizumab, enoticumab, ensituximab, epitumomab cituxetan, epratuzumab, erenumab, erlizumab, ertumaxomab, etaracizumab, etrolizumab, evolocumab, exbivirumab, fanolesomab, faralimumab, farletuzumab, fasinumab, fbta05, felvizumab, fezakinumab, ficlatuzumab, figitumumab, flavotumab, fontolizumab, foralumab, foravirumab, fresolimumab, fulranumab, futuximab, galiximab, ganitumab, gantenerumab, gavilimumab, gemtuzumab ozogamicin, gevokizumab, girentuximab, glembatumumab vedotin, golimumab, gomiliximab, gs6624, ibalizumab, ibritumomab tiuxetan, icrucumab, igovomab, imciromab, imgatuzumab, inclacumab, indatuximab ravtansine, infliximab, intetumumab, inolimumab, inotuzumab ozogamicina, ipilimumab, iratumumab, itolizumab, ixekizumab, keliximab, labetuzumab, lebrizumab, lemalesomab, lerdelimumab, lexatumumab, libivirumab, ligelizumab, lintuzumab, lirilumab,

lorvotuzumab mertansina, lucatumumab, lumiliximab, mapatumumab, maslimomab, mavrilimumab, matuzumab, mepolizumab, metelimumab, milatuzumab, minretumomab, mitumomab, mogamulizumab, morolimumab, motavizumab, moxetumomab pasudotox, muromonab-cd3, nacolomab tafenatox, namilumab, naptumomab estafenatox, narnatumab, natalizumab, nebacumab, necitumumab, nerelimomab, nesvacumab, nimotuzumab, nivolumab, nofetumomab merpentan, ocaratuzumab, ocrelizumab, odulimumab, ofatumumab, olaratumab, olokizumab, omalizumab, onartuzumab, oportuzumab monatox, oregovomab, orticumab, otelixizumab, oxelumab, ozanezumab, ozoralizumab, pagibaximab, palivizumab, panitumumab, panobacumab, parsatuzumab, pascolizumab, pateclizumab, patritumab, pentumomab, perakizumab, pertuzumab, pexelizumab, pidilizumab, pintumomab, placulumab, ponezumab, priliximab, pritumumab, PRO 140, quilizumab, racotumomab, radretumab, rafivirumab, ramucirumab, ranibizumab, raxibacumab, regavirumab, reslizumab, rilotumumab, rituximab, robatumumab, roledumab, romosozumab, rontalizumab, rovelizumab, ruplizumab, samalizumab, sarilumab, satumomab pendetide, secukinumab, sevirumab, sibrotuzumab, sifalimumab, siltuximab, simtuzumab, siplizumab, sirukumab, solanezumab, solitomab, sonepcizumab, sontuzumab, stamulumab, sulesomab, suvizumab, tabalumab, tacatuzumab tetraxetan, tadocizumab, talizumab, tanezumab, taplitumomab paptox, tefibazumab, telimomab aritox, tenatumomab, tefibazumab, teneliximab, teplizumab, teprotumumab, tezepelumab, TGN1412, tremelimumab, ticilimumab, tildrakizumab, tigatuzumab, TNX-650, tocilizumab, toralizumab, tositumomab, tralokinumab, trastuzumab, TRBS07, tregalizumab, tucotuzumab celmoleukin, tuvirumab, ublituximab, urelumab, urtoxazumab, ustekinumab, vapaliximab, vatelizumab, vedolizumab, veltuzumab, vepalimumab, vesencumab, visilizumab, volociximab, vorsetuzumab mafodotin, votumumab, zalutumumab, zanolimumab, zatuximab, ziralimumab, o zolimumab aritox.

En algunas realizaciones, la terapia biológica es una molécula BiTE<sup>®</sup>. Las moléculas BiTE<sup>®</sup> son construcciones de unión a antígenos biespecíficas diseñadas que dirigen la actividad citotóxica de células T contra las células cancerosas. Son la fusión de dos fragmentos variables monocatenarios (scFv) de diferentes anticuerpos, o secuencias de aminoácidos de cuatro genes diferentes, en una sola cadena peptídica de aproximadamente 55 kilodalton. Uno de los scFv se une a linfocitos T mediante el receptor de CD3, y el otro a la célula tumoral mediante una molécula específica de tumor. Blinatumomab (BLINCYTO<sup>®</sup>) es un ejemplo de una molécula de BiTE<sup>®</sup>, específica para CD19. Las moléculas de BiTE<sup>®</sup> que se modifican, tales como las modificadas para prolongar sus semividas, también pueden usarse en los métodos divulgados. En diversos aspectos, el polipéptido es una proteína de unión a antígeno, por ejemplo una molécula BiTE<sup>®</sup>. En algunas realizaciones, un producto de proteína de anticuerpo comprende una molécula BiTE<sup>®</sup>.

En algunas realizaciones, la terapia biológica se presenta en una formulación. La formulación puede ser una formulación farmacéuticamente aceptable. La formulación puede comprender la terapia biológica junto con un diluyente, vehículo, solubilizante, emulsionante, conservante, y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

Los materiales de formulación aceptables para terapias biológicas como se describe aquí preferiblemente no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o preservar, por ejemplo, el pH, la osmolalidad, la viscosidad, la claridad, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución o liberación, la adsorción o la penetración de la composición. En tales realizaciones, los materiales de formulación adecuados incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina); antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrógeno-sulfito de sodio); amortiguadores (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos); agentes de volumen (tales como manitol o glicina); agentes quelantes (tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)); agentes complejantes (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); cargas; monosacáridos; disacáridos; y otros hidratos de carbono (tales como glucosa, sacarosa, manosa o dextrinas); proteínas (tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes, aromatizantes y diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sal (tales como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agentes humectantes (tales como pluronics, PEG, ésteres de sorbitán, polisorbatos tales como polisorbato 20, polisorbato, triton, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes mejoradores de la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol); agentes mejoradores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos, preferiblemente cloruro de sodio o potasio, manitol, sorbitol); vehículos de administración; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. Véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18<sup>a</sup> edición, (A.R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

Un vehículo o portador adecuado para la formulación puede ser agua para inyección, disolución salina fisiológica, o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente suplementado con otros materiales comunes en composiciones para administración parenteral. La solución salina tamponada neutra o la solución salina mezclada con albúmina de suero son vehículos ejemplares adicionales. En realizaciones específicas, las composiciones farmacéuticas comprenden un amortiguador Tris de alrededor de pH 7,0-8,5, o un amortiguador de acetato de alrededor de pH 4,0-5,5, y pueden incluir además sorbitol o un sustituto adecuado para el mismo.

Los componentes de formulación están presentes preferiblemente en concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. En determinadas realizaciones, se usan tampones para mantener la composición a pH fisiológico o a un pH ligeramente menor, normalmente dentro de un intervalo de pH de desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 8. Incluyendo alrededor de 5,1, alrededor de 5,2, alrededor de 5,3, alrededor de 5,4, alrededor de 5,5, alrededor de 5,6, alrededor de 5,7, alrededor de 5,8, alrededor de 5,9, alrededor de 6,0, alrededor de 6,1, alrededor de 6,2, alrededor de 6,3, alrededor de 6,4, alrededor de 6,5, alrededor de 6,6, alrededor de 6,7, alrededor de 6,8, alrededor de 6,9, alrededor de 7,0, alrededor de 7,1, alrededor de 7,2, alrededor de 7,3, alrededor de 7,4, alrededor de 7,5, alrededor de 7,6, alrededor de 7,7, alrededor de 7,8, alrededor de 7,9, y alrededor de 8,0.

Se observa que algunas terapias biológicas pueden ser autoadministradas por los sujetos, ya sea directamente o a través de un inyector automático, mientras que otras pueden ser administradas al sujeto por otra persona, tal como un proveedor de atención médica. Como tal, un sujeto "que recibe una administración" o "se le administra" una terapia biológica a un sujeto, y las variaciones de estos términos raíz, como se usan aquí, pueden referirse a la terapia biológica que los sujetos se autoadministran a sí mismos (ya sea directamente o a través de un aparato tal como un inyector automático), y/o por otros individuos, tales como proveedores de atención médica, al sujeto.

### **Métodos para fabricar una terapia biológica**

Se contempla que los métodos descritos aquí pueden usarse para evaluar si los atributos moleculares afectan la eficacia de una terapia biológica, y/o afectan el perfil de seguridad de una terapia biológica. Los métodos pueden comprender la determinación de un nivel real estimado de exposición al atributo molecular en el momento en que un sujeto recibe una administración de una terapia biológica. Estos métodos pueden identificar niveles o intervalos del atributo molecular adecuados para la fabricación, la liberación del lote, y/o el momento de administración.

En algunas realizaciones, se describe un método para fabricar una terapia biológica. El método puede comprender detectar un nivel de un atributo molecular de la terapia biológica en una formulación en uno o más puntos de tiempo bajo condiciones de almacenamiento (opcionalmente, en dos o más puntos de tiempo en condiciones de almacenamiento). Opcionalmente, por ejemplo, en casos en los que no hay cambios en los atributos moleculares durante el almacenamiento (por ejemplo, para algunos productos farmacéuticos que se almacenan congelados), puede ser suficiente detectar el nivel de atributo molecular en un momento dado. Se contempla además que, para los niveles de atributos moleculares que pueden cambiar durante el almacenamiento, se puede utilizar la detección del nivel del atributo molecular en dos puntos de tiempo más en condiciones de almacenamiento para calcular una tasa de cambio del atributo molecular como se describe aquí. A modo de ejemplo, los puntos temporales pueden comprender el momento de fabricación. A modo de ejemplo, los puntos de tiempo pueden comprender el momento de fabricación y al menos otro punto de tiempo. El método puede comprender determinar una tasa de cambio del atributo molecular en las condiciones de almacenamiento (se contempla que para algún atributo molecular de algunas terapias biológicas en algunas condiciones de almacenamiento, por ejemplo algunas terapias biológicas que se almacenan congeladas, la tasa de cambio puede calcularse como cero). El método puede comprender obtener datos sobre la seguridad y/o eficacia *in vivo* de la terapia biológica para sujetos que han recibido una administración de la terapia biológica. El método puede comprender estimar un nivel de exposición al atributo molecular recibido por los sujetos en el momento de dicha administración, basándose en (i) la tasa de cambio del atributo molecular durante el almacenamiento, y (ii) una duración que la terapia biológica en la formulación estuvo bajo las condiciones de almacenamiento antes de dicha administración. La estimación también puede tener en cuenta (iii) el nivel del atributo molecular en el momento de la fabricación y/o en la liberación del lote, y/o (iv) la dosis del producto biológico administrada al sujeto. A modo de ejemplo, la estimación puede utilizar la ecuación 1 o la ecuación 2 o la ecuación 3. El método puede comprender determinar la presencia o ausencia de una correlación entre el nivel estimado de exposición al atributo molecular recibida por los sujetos y los datos de seguridad y/o eficacia de la terapia biológica. Si no existe correlación, el método puede comprender fabricar lotes de producción de la terapia biológica que comprenden el atributo molecular en un nivel permisible específico del atributo molecular o por debajo de él, en función del nivel estimado de exposición al atributo molecular. Por ejemplo, el nivel permisible especificado puede ser un nivel del atributo molecular que se calcula para producir un nivel de exposición al atributo al final de la vida útil que sea menor o igual al nivel más alto estimado de exposición al atributo molecular en los sujetos. Por ejemplo, el nivel permisible especificado puede ser un nivel del atributo molecular que se calcula para producir un nivel de exposición al atributo al final de la vida útil que sea menor o igual al 90 - 100% del nivel más alto estimado de exposición al atributo molecular en los sujetos. En consecuencia, se espera que el nivel permisible produzca niveles de exposición al atributo que demuestren ser seguros y efectivos en los sujetos durante toda la vida útil de la terapia biológica. Los lotes de producción con niveles del atributo molecular que excedan el nivel permisible especificado podrán ser rechazados.

Si la correlación está presente, el método puede comprender además establecer una especificación para los niveles del atributo molecular en el momento de la fabricación para no exceder un nivel máximo permisible del atributo molecular de la terapia biológica. El nivel máximo permisible del atributo molecular puede basarse en los niveles más altos estimados de exposición al atributo molecular en sujetos que no estén asociados con eventos adversos y/o inhibición de la eficacia de la terapia biológica. El método de fabricación puede comprender además el rechazo de lotes de producción de la terapia biológica que comprenden niveles del atributo molecular que exceden el nivel máximo permisible (y, por lo tanto, están fuera de la especificación). Se podrán aceptar lotes de producción con niveles del atributo molecular que no excedan el nivel máximo permisible especificado. Por ejemplo, el nivel máximo permisible

especificado puede ser un nivel del atributo molecular que se calcula para producir un nivel de exposición al atributo al final de la vida útil que sea menor o igual al nivel más alto estimado de exposición al atributo molecular que no esté asociado con eventos adversos y/o una inhibición de la eficacia en los sujetos. El cálculo puede utilizar la ecuación 1 o la ecuación 2 o la ecuación 3, y puede tener en cuenta la tasa de cambio del atributo molecular en la formulación durante el almacenamiento, y la dosis del atributo molecular que se administrará a un sujeto. Por ejemplo, el nivel máximo permisible especificado puede ser un nivel del atributo molecular que se calcula para producir un nivel de exposición al atributo al final de la vida útil que sea menor o igual al 90 - 100% del nivel más alto estimado de exposición al atributo molecular que no esté asociado con eventos adversos y/o una inhibición de la eficacia en los sujetos.

Como se utiliza aquí, un "nivel permisible" de atributo molecular se refiere a un nivel de atributo molecular de una terapia biológica en una formulación que está dentro de las especificaciones en el momento de la fabricación. Como se describe aquí, el nivel permisible se puede calcular para producir un nivel específico de exposición al atributo molecular (a un sujeto al que se le administraría la terapia biológica en la formulación) al final de la vida útil o al vencimiento que sea menor o igual a un nivel estimado de exposición al atributo molecular que no esté asociado con eventos adversos y/o pérdida de eficacia (esto se puede denominar un nivel permisible "basado en" el nivel estimado de exposición al atributo). Por lo tanto, los niveles permisibles de atributos moleculares pueden brindar confianza de que el nivel de exposición al atributo molecular de la terapia biológica en la formulación es seguro y eficaz cuando se administra a un sujeto, incluso si se administra muy cerca de su vida útil o de caducidad. Un "nivel máximo permisible" se refiere a un escenario en el que existe una correlación entre el nivel estimado de exposición al atributo molecular y los datos de seguridad y/o eficacia. El "nivel máximo permisible" se refiere al nivel más alto de atributo molecular en la formulación que produce un nivel de exposición al atributo molecular (a un sujeto al que se le administraría la terapia biológica en la formulación) al final de la vida útil o al vencimiento que es menor o igual al nivel más alto de exposición al atributo molecular *no* asociado con eventos adversos. El nivel permisible o el nivel máximo permisible se puede calcular utilizando la ecuación 1 o la ecuación 2 o la ecuación 3 en función del nivel estimado de exposición al atributo no asociado con eventos adversos, la duración hasta el final de la vida útil o el vencimiento, y la tasa de cambio del nivel del atributo molecular, y la dosis de la terapia biológica. Es decir, utilizando el nivel de exposición al atributo molecular que no estaba asociado con eventos adversos y/o inhibición de la eficacia, la tasa de cambio del atributo molecular en la formulación, y esta duración, se puede determinar el nivel permisible (si es aplicable, el nivel máximo permisible). Por lo tanto, si se fabrica una terapia biológica con un atributo molecular en un nivel permisible o por debajo de él (si es aplicable, un nivel máximo permisible), se puede esperar que en el momento de la administración a un sujeto, el nivel estimado de exposición al atributo molecular al sujeto será o estará por debajo de un nivel que no esté asociado con eventos adversos y/o pérdida de eficacia. Como se utiliza aquí, un nivel permisible o un nivel máximo permisible "basado en" un nivel estimado de exposición de un atributo molecular se refiere al nivel permisible (o nivel máximo permisible) calculado para no producir más que el nivel estimado de atributo molecular al final de la vida útil o al vencimiento. Si más de una dosis es adecuada para una terapia biológica en formulación, se puede utilizar la dosis adecuada más alta para calcular el nivel permisible o el nivel máximo permisible "basado en" el nivel estimado de un atributo molecular (ya que dosis más bajas tendrán niveles aún más bajos de exposición al atributo molecular). A modo de ejemplo, el nivel estimado de exposición al atributo puede seleccionarse para que se encuentre dentro de un intervalo de confianza para una distribución o una dispersión de niveles estimados de exposición al atributo molecular que se determinaron para un grupo de sujetos. Se contempla que un nivel estimado de exposición al atributo recibido por los sujetos no implica necesariamente que cada sujeto recibió el mismo nivel numérico de exposición al atributo. Más bien, el nivel estimado de exposición al atributo recibido por esos sujetos puede comprender una distribución de niveles estimados del atributo recibidos por sujetos individuales. Por lo tanto, el nivel máximo permisible puede seleccionarse utilizando un intervalo de confianza de modo que haya al menos un 85%, 90%, 95%, 97% o 99% de probabilidad de que el nivel de exposición al atributo al final de la vida útil sea menor o igual al nivel más alto de exposición al atributo que no estaba asociado con una pérdida de seguridad o eficacia. Se contempla además que el valor real del nivel permisible o máximo permisible "basado en" el nivel de exposición al atributo molecular puede sufrir redondeo. El redondeo puede proporcionar conveniencia administrativa o matemática, tal como redondear a una, dos o tres cifras significativas en una unidad adecuada para medir el atributo molecular. Para mayor precaución, el redondeo puede ser hacia abajo. Por ejemplo, el nivel permisible o el nivel máximo permisible de atributo "basado en" el nivel estimado de exposición al atributo se puede calcular para producir un nivel de exposición al atributo al final de la vida útil que no sea mayor que el 99%, 97%, 95%, 90%, 85%, u 80% del nivel de referencia de exposición al atributo (que no estaba asociado con una pérdida de seguridad y/o eficacia) calculado utilizando la ecuación 1 o 2 como se describe aquí. Este redondeo hacia abajo puede brindar una garantía adicional de que el nivel de exposición al atributo de la terapia biológica de última generación seguirá siendo seguro y/o eficaz.

En algunas realizaciones, los lotes de producción se fabrican con niveles de más de un atributo molecular, cada uno igual o inferior a su nivel permisible (o máximo permisible). Por ejemplo, los lotes de producción pueden fabricarse con al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez atributos moleculares, incluidos intervalos entre dos cualesquiera de los valores enumerados, por ejemplo, uno - diez, uno - cinco, dos - diez, dos - cinco, tres - diez, tres - cinco, o cinco - diez atributos moleculares, cada uno de los cuales está en o por debajo de un nivel permisible especificado (o máximo permisible).

#### ***Técnicas de fabricación***

Los métodos para fabricar terapias biológicas como se describe aquí (por ejemplo, proteínas terapéuticas) pueden utilizar tecnología de ADN recombinante. Los métodos de ADN recombinante para producir proteínas terapéuticas tales como anticuerpos o productos de proteína de anticuerpo son bien conocidos. El ADN puede codificar la proteína terapéutica. Por ejemplo, el ADN puede codificar los anticuerpos, por ejemplo el ADN que codifica un dominio VH, un dominio VL, un fragmento variable monocatenario (scFv) o fragmentos y combinaciones de los mismos (polinucleótidos diana), se puede insertar en un vector de expresión adecuado, que después se puede transfectar en una célula hospedante adecuada, tales como células de *Escherichia coli*, células COS, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no producen un anticuerpo, para obtener los anticuerpos deseados.

Se conocen en la técnica vectores de expresión adecuados que contienen, por ejemplo, un polinucleótido que codifica el polipéptido diana unido a un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia nucleotídica que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo, y el dominio variable del anticuerpo puede clonarse en dicho vector para la expresión de la cadena pesada, la cadena ligera completa, o ambas cadenas pesada y ligera completas (o fragmentos de las mismas). El vector de expresión se puede transferir a una célula hospedante mediante técnicas convencionales, y las células transfectadas se pueden cultivar para producir los anticuerpos.

Se puede utilizar cualquier línea celular que pueda expresar, o que se modifique para expresar, proteínas tales como anticuerpos funcionales o fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, las líneas celulares de mamíferos adecuadas incluyen líneas celulares inmortalizadas disponibles en la American Type Culture Collection (Manassas, VA), incluidas células de ovario de hámster chino (CH), células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), y células de riñón epitelial humano 293. Además, se pueden elegir líneas celulares o sistemas hospedantes para garantizar la correcta modificación y procesamiento de los anticuerpos. Se pueden utilizar células hospedantes eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento adecuado de la transcripción primaria, la glicosilación, y la fosforilación del producto genético. Estas incluyen células CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, NS0 (una línea de células de mieloma murino que no produce de forma endógena ninguna cadena de inmunoglobulina funcional), SP20, CRL7030 y HsS78Bst. También se pueden utilizar líneas celulares humanas desarrolladas inmortalizando linfocitos humanos. La línea celular humana PER.C6<sup>®</sup> (Janssen; Titusville, NJ) se puede utilizar para producir de forma recombinante anticuerpos monoclonales. Ejemplos de células no de mamífero que también se pueden utilizar incluyen células de insectos (por ejemplo, Sf21/Sf9, *Trichoplusia ni* Bti-Tn5b1-4), o células de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces* (tales como *S. cerevisiae*, *Pichia*, etc.), células vegetales, o células de pollo.

Las proteínas tales como los anticuerpos pueden expresarse de forma estable en una línea celular utilizando métodos convencionales. La expresión estable se puede utilizar para la producción a largo plazo y de alto rendimiento de proteínas recombinantes. Para una expresión estable, las células hospedantes se pueden transformar con un vector modificado adecuadamente que incluye elementos de control de la expresión (por ejemplo, promotor, potenciador, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un gen marcador seleccionable. Se conocen en la técnica métodos para producir líneas celulares estables con un alto rendimiento, y los reactivos están disponibles comercialmente. La expresión transitoria también puede lograrse utilizando métodos convencionales.

Una línea celular que expresa una proteína, tal como un anticuerpo, puede mantenerse en un medio de cultivo celular y en condiciones de cultivo que den lugar a la expresión y producción de los anticuerpos. Los medios de cultivo celular pueden basarse en formulaciones de medios disponibles comercialmente, incluidos, por ejemplo, DMEM o Ham's F12. Además, los medios de cultivo celular pueden modificarse para favorecer el aumento tanto del crecimiento celular como de la expresión de proteínas biológicas. Por supuesto, el medio de cultivo celular se puede optimizar para un cultivo celular específico, incluido el medio de crecimiento de cultivo celular que está formulado para promover el crecimiento celular, o el medio de producción de cultivo celular que está formulado para promover la producción de proteínas recombinantes.

Se conocen muchos medios de cultivo celular y nutrientes y suplementos para el cultivo celular. Por ejemplo, los medios basales adecuados incluyen el medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), DME/F12, medio esencial mínimo (MEM), medio basal de Eagle (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, medio esencial mínimo a (a-MEM), medio esencial mínimo de Glasgow (G-MEM), PF CHO, y medio de Dulbecco modificado de Iscove. Otros ejemplos de medios basales que se pueden utilizar incluyen el medio basal BME y el medio Eagle modificado de Dulbecco.

El medio basal puede estar libre de suero, lo que significa que el medio no contiene suero (por ejemplo, suero bovino fetal (FBS)), o medios libres de proteínas animales, o medios químicamente definidos. El medio basal se puede modificar para eliminar ciertos componentes no nutricionales que se encuentran en el medio basal, tales como diversos amortiguadores inorgánicos y orgánicos, tensioactivo o tensioactivos, y cloruro de sodio. El medio de cultivo celular puede contener un medio de células basales (modificado o no) y al menos uno de los siguientes: fuente de hierro, factor de crecimiento recombinante; amortiguador; tensioactivo; regulador de osmolaridad; fuente de energía; e hidrolizados no de animales. Además, el medio celular basal modificado puede contener opcionalmente aminoácidos, vitaminas, o una combinación de aminoácidos y vitaminas. Un medio basal modificado puede contener además glutamina, por ejemplo L-glutamina y/o metotrexato.

Una vez que se ha producido una proteína terapéutica (por ejemplo, un anticuerpo o un producto de proteína de anticuerpo), se puede purificar mediante métodos convencionales, por ejemplo mediante cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por los antígenos específicos, proteína A, proteína G, o cromatografía en columna de exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, la proteína se puede fusionar a secuencias polipeptídicas heterólogas ("etiquetas") para facilitar la purificación.

La proteína purificada generalmente se formula con un excipiente para producir una disolución estéril que se puede inyectar o infundir. Por ejemplo, la proteína purificada puede formularse en una formulación como la descrita aquí. La formulación puede ser seguida del llenado, envasado, almacenamiento, envío, y preparación final inmediatamente antes de la administración al sujeto.

### **Métodos para desarrollar un procedimiento de fabricación para terapia biológica**

Se contempla que los métodos descritos aquí también pueden usarse para desarrollar métodos para fabricar una terapia biológica. En algunas realizaciones, se describe un método para desarrollar un procedimiento de fabricación para terapia biológica. El método puede comprender detectar un nivel de un atributo molecular de la terapia biológica en una formulación en uno o más puntos de tiempo en condiciones de almacenamiento (opcionalmente en dos o más puntos de tiempo en condiciones de almacenamiento). Por ejemplo, los puntos temporales pueden incluir el momento de fabricación. Por ejemplo, los puntos temporales pueden incluir el momento de fabricación y al menos otro punto temporal. El método puede comprender determinar una tasa de cambio del atributo molecular en las condiciones de almacenamiento. El método puede comprender obtener datos sobre la seguridad y/o eficacia de la terapia biológica in sujetos que han recibido una administración de la terapia biológica. El método puede comprender estimar un nivel de exposición al atributo molecular recibido por los sujetos en el momento de administración, basándose en (i) la tasa de cambio del atributo molecular durante el almacenamiento de la terapia biológica en la formulación, y (ii) una duración que la terapia biológica en la formulación estuvo bajo las condiciones de almacenamiento antes de dicha administración. La estimación también puede tener en cuenta (iii) el nivel del atributo molecular en el momento de la fabricación y/o en la liberación del lote, y/o (iv) la dosis del producto biológico administrada al sujeto. A modo de ejemplo, la estimación puede utilizar la ecuación 1 o la ecuación 2 o la ecuación 3. El método puede comprender determinar la presencia o ausencia de una correlación entre el nivel estimado de exposición al atributo molecular y los datos de seguridad y/o eficacia de la terapia biológica.

Si (a), la correlación está ausente, el método puede comprender establecer el procedimiento de fabricación para producir niveles del atributo molecular iguales o inferiores a un nivel permisible especificado basado en el nivel estimado de exposición al atributo molecular. Por ejemplo, los niveles permisibles especificados pueden ser un nivel del atributo molecular que se calcula para producir un nivel de exposición al atributo al final de la vida útil que sea menor o igual al nivel más alto estimado de exposición al atributo molecular en los sujetos. El cálculo puede utilizar la ecuación 1 o la ecuación 2 o la ecuación 3. Por ejemplo, el nivel permisible especificado puede ser un nivel del atributo molecular que se calcula para producir un nivel de exposición al atributo al final de la vida útil que sea menor o igual al 90 - 100% del nivel más alto estimado de exposición al atributo molecular en los sujetos. Los lotes de producción con niveles del atributo molecular que excedan el nivel permisible especificado podrán ser rechazados.

Si (b), la correlación está presente, el método puede comprender establecer el procedimiento de fabricación para producir niveles del atributo molecular iguales o inferiores a un nivel máximo permisible especificado del atributo molecular en función del nivel más alto del atributo molecular que no esté asociado con eventos adversos y/o inhibición de la eficacia de la terapia biológica. Por ejemplo, el nivel máximo permisible especificado puede ser un nivel del atributo molecular que se calcula para producir un nivel de exposición al atributo al final de la vida útil que sea menor o igual al nivel más alto estimado de exposición al atributo molecular que no esté asociado con eventos adversos y/o una inhibición de la eficacia en los sujetos. El cálculo puede utilizar la ecuación 1 o la ecuación 2 o la ecuación 3. Por ejemplo, el nivel máximo permisible especificado puede ser un nivel del atributo molecular que se calcula para producir un nivel de exposición al atributo al final de la vida útil que sea menor o igual al 90 - 100% del nivel más alto estimado de exposición al atributo molecular que no esté asociado con eventos adversos y/o una inhibición de la eficacia en los sujetos. El nivel permisible o el nivel máximo permisible puede ser parte de una especificación en el momento de la fabricación o liberación del lote.

### **Métodos para evaluar el impacto clínico de un atributo molecular de una terapia biológica**

En algunas realizaciones, se describe un método para evaluar el impacto clínico de los atributos moleculares. Dicho método puede utilizarse además en un método para fabricar una terapia biológica, y en un método para desarrollar un procedimiento de fabricación para una terapia biológica como se describe aquí. El método puede comprender detectar un nivel de un atributo molecular de la terapia biológica en una formulación en uno o más puntos de tiempo en condiciones de almacenamiento. El nivel de exposición al atributo se puede detectar en dos o más puntos temporales bajo las condiciones de almacenamiento. A modo de ejemplo, los puntos temporales para detectar el nivel de atributo molecular pueden incluir el momento de fabricación o al menos otro punto temporal. A modo de ejemplo, los dos o más puntos temporales para detectar el nivel de atributo molecular pueden incluir el momento de fabricación y al menos otro punto temporal. El método puede comprender determinar una tasa de cambio del atributo molecular en

las condiciones de almacenamiento. El método puede comprender obtener datos sobre la seguridad y/o eficacia de la terapia biológica in sujetos que han recibido una administración de la terapia biológica. El método puede comprender estimar un nivel de exposición al atributo molecular recibido por los sujetos en el momento de dicha administración, basándose en (i) la tasa de cambio del atributo molecular durante el almacenamiento de la terapia biológica en la formulación, y (ii) una duración que la terapia biológica en la formulación estuvo bajo las condiciones de almacenamiento antes de dicha administración. La estimación también puede tener en cuenta (iii) el nivel del atributo molecular en el momento de la fabricación y/o en la liberación del lote, y/o (iv) la dosis del producto biológico administrada al sujeto. A modo de ejemplo, la estimación puede utilizar la ecuación 1 o la ecuación 2 o la ecuación 3 como se describe aquí. El método puede comprender determinar la presencia o ausencia de una correlación entre la exposición estimada al atributo molecular y la seguridad y/o eficacia de la terapia biológica. Si (a) la correlación está ausente, se puede determinar que el atributo molecular no afecta ni la seguridad clínica ni la eficacia de la terapia biológica. Si (b) la correlación está presente, se puede determinar que el atributo molecular afecta la seguridad clínica y/o la eficacia de la terapia biológica.

Si (a), no existe correlación, el método puede comprender además establecer una especificación para los niveles permisibles del atributo molecular de la terapia biológica, en el que los niveles permisibles del atributo molecular se basan en los niveles estimados más altos del atributo molecular recibidos por los sujetos. Por ejemplo, la especificación de los niveles permisibles puede ser un nivel del atributo molecular en el momento de la fabricación que se calcula para producir un nivel de exposición al atributo al final de la vida útil que sea menor o igual al nivel más alto estimado de exposición al atributo molecular en los sujetos. Por ejemplo, la especificación de niveles permisibles puede ser un nivel del atributo molecular que se calcula para producir un nivel de exposición al atributo al final de la vida útil que sea menor o igual al 90 - 100% del nivel más alto estimado de exposición al atributo molecular en los sujetos. La especificación puede utilizarse para pruebas de fabricación y/o liberación de la terapia biológica. Si un lote o producto de la terapia biológica comprende el atributo molecular en un nivel que excede el nivel permisible, el lote o producto puede considerarse fuera de especificación y rechazarse. La terapia biológica puede fabricarse de acuerdo con la especificación.

Si (b) la correlación está presente, el método puede comprender además establecer una especificación para los niveles máximos permisibles del atributo molecular de la terapia biológica, en el que los niveles máximos permisibles del atributo molecular se basan en los niveles de la exposición al atributo molecular estimado más alto que no estaban asociados con eventos adversos y/o inhibición de la eficacia de la terapia biológica. La especificación puede utilizarse para pruebas de fabricación y/o liberación de la terapia biológica. Por ejemplo, la especificación para el nivel máximo permisible puede ser un nivel del atributo molecular que se calcula para producir un nivel de exposición al atributo al final de la vida útil que sea menor o igual al nivel más alto estimado de exposición al atributo molecular que no esté asociado con eventos adversos y/o una inhibición de la eficacia en los sujetos. El cálculo puede utilizar la ecuación 1 o la ecuación 2 o la ecuación 3. Por ejemplo, el nivel máximo permisible especificado puede ser un nivel del atributo molecular que se calcula para producir un nivel de exposición al atributo al final de la vida útil que sea menor o igual al 90 - 100% del nivel más alto estimado de exposición al atributo molecular que no esté asociado con eventos adversos y/o una inhibición de la eficacia en los sujetos. Si un lote de producción o producto de la terapia biológica comprende el atributo molecular en un nivel que excede el nivel máximo permisible, el lote o producto puede considerarse fuera de especificación y rechazarse. La terapia biológica puede fabricarse de acuerdo con la especificación.

#### **Otros aspectos de los métodos**

Cualquiera de los métodos descritos aquí puede comprender uno o más aspectos adicionales.

En algunas realizaciones, para cualquier método descrito aquí, la estimación puede basarse además en (iii) una dosis de la terapia biológica en dicha administración, y (iv) una cantidad del atributo molecular medida en el momento de la fabricación y/o liberación del lote. Respecto a (iii), se observa que una dosis mayor de producto biológico administrará una cantidad mayor de un atributo molecular que una dosis menor que tenga el mismo contenido porcentual del atributo molecular. También se contempla que en algunos casos, el nivel del atributo molecular en el momento de fabricación y/o la dosis puede no variar apreciablemente, y por lo tanto la estimación puede realizarse únicamente a partir de (i) y (ii). Por ejemplo, el procedimiento de fabricación puede estar bien establecido y estrictamente controlado, y puede demostrarse que produce niveles consistentes de un atributo molecular en el momento de la fabricación. Por ejemplo, la terapia biológica sólo podrá administrarse en una dosis única, de modo que no es necesario ponderar el cálculo por dosis.

En algunas realizaciones, para cualquier método descrito aquí, el nivel de atributo molecular de la terapia biológica en la formulación se mide en uno o más puntos de tiempo en el momento de la fabricación o después de él, por ejemplo al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez puntos de tiempo, incluidos intervalos entre dos cualesquiera de los valores enumerados, por ejemplo uno-dos puntos de tiempo, uno-cinco puntos de tiempo, o uno-diez puntos de tiempo. Sin estar limitados por la teoría, se contempla que para algunas terapias biológicas en formulación, para las cuales los niveles de atributo molecular no cambian durante el almacenamiento, como puede ser el caso de algunas terapias biológicas en formulación que se almacenan congeladas, puede ser suficiente medir el nivel de atributo molecular en un solo punto de tiempo. En algunas realizaciones, para cualquier método descrito aquí,

el nivel de atributo molecular de la terapia biológica en la formulación se mide en dos o más puntos de tiempo, por ejemplo al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, o diez puntos de tiempo, incluidos intervalos entre dos cualesquiera de los valores enumerados, por ejemplo dos-cinco puntos de tiempo, dos-diez puntos de tiempo, tres-cinco puntos de tiempo, tres-diez puntos de tiempo, o cinco-diez puntos de tiempo. Los niveles del atributo molecular en dos o más puntos de tiempo se pueden utilizar para calcular una tasa de cambio en los niveles del atributo molecular en condiciones de almacenamiento. Los puntos de tiempo pueden ser iguales o posteriores al momento de fabricación. En algunas realizaciones, para cualquier método descrito aquí, los dos o más puntos de tiempo comprenden un momento de fabricación. En algunas realizaciones, para cualquier método descrito aquí, los dos o más puntos de tiempo comprenden un momento de fabricación, y al menos un punto de tiempo posterior. En algunas realizaciones, para cualquier método descrito aquí, los dos o más puntos de tiempo comprenden un momento de fabricación, y al menos dos puntos de tiempo posteriores.

En algunas realizaciones, para cualquier método descrito aquí, estimar el nivel de exposición al atributo molecular comprende utilizar una ecuación como la descrita aquí. En algunas realizaciones, la estimación del nivel de exposición al atributo molecular comprende utilizar la ecuación 1:

$$A_t = (\%A_0 + \%A_{\Delta} \times t)D \quad (1)$$

en la que  $A_t$  es el nivel estimado de exposición al atributo molecular,  $\%A_0$  es el porcentaje del atributo en el momento de la liberación del lote,  $\%A_{\Delta}$  es la tasa de cambio en el porcentaje del nivel del atributo,  $t$  es el tiempo de almacenamiento entre la liberación del lote y la administración del tratamiento, y  $D$  es la concentración de la dosis en la dimensión del peso del ingrediente farmacéutico activo asociado con cada tratamiento.

En algunas realizaciones, la estimación del nivel de exposición al atributo molecular comprende utilizar la ecuación 2:

$$A_t = \left\{ \%A_0 + \sum_{i=1}^n (\%A_{\Delta_i} \times t_i) \right\} \times D \quad (2)$$

en el que  $A_t$  es el nivel estimado de exposición al atributo molecular,  $\%A_0$  es el porcentaje del atributo molecular en el momento de la liberación del lote,  $\%A_{\Delta_i}$  es la tasa de cambio del porcentaje del nivel del atributo molecular a lo largo del tiempo en una condición de almacenamiento dada,  $t_i$  es el tiempo de almacenamiento en la condición dada, y  $D$  es la concentración de la dosis de administración.

En algunas realizaciones, la estimación del nivel de exposición al atributo molecular comprende utilizar la ecuación 3:

$$\%A_{rel} = \frac{A_t}{D} \times 100\% \quad (3)$$

en la que  $\%A_{rel}$  es el porcentaje del nivel relativo de la exposición al atributo molecular con respecto a la dosis, y en la que  $A_t$  es el nivel de la exposición al atributo molecular calculado utilizando la ecuación 1 o 2, y  $D$  es la concentración de la dosis en la dimensión del peso del ingrediente farmacéutico activo asociado con cada tratamiento. Se observa que la ecuación 3 puede explicar el nivel relativo de exposición al atributo molecular con respecto a la concentración de la dosis. Sin estar limitados por la teoría, si un atributo molecular afecta la eficacia, se puede inferir que los no atributos también pueden afectar la eficacia.

Por ejemplo, la concentración relativa del ingrediente farmacéutico activo (API) con respecto a la concentración de la dosis puede afectar la eficacia. En consecuencia, el porcentaje del atributo molecular con respecto a la concentración de la dosis puede ser útil para medir el efecto de un atributo molecular sobre la eficacia. Como tal, en los métodos de algunas realizaciones, la ecuación 3 se puede utilizar cuando se determina la presencia o ausencia de una correlación entre el nivel estimado de exposición al atributo molecular y los datos de eficacia.

En algunas realizaciones, para los métodos descritos aquí, estimar el nivel de exposición al atributo molecular recibido por el sujeto comprende asignar un nivel de exposición al atributo estimado de la siguiente manera:

(A) Primero se determina  $A_t$  utilizando la Ecuación 1 o la Ecuación 2 o la Ecuación 3 para todos los tratamientos relevantes como se describe a continuación.

(1) Para los pacientes que no muestran el resultado clínico de interés a lo largo de los estudios clínicos, los tratamientos relevantes son todos los tratamientos administrados a los pacientes a lo largo del estudio.

(2) Para los pacientes que muestran el resultado clínico, los tratamientos relevantes son todos los tratamientos administrados a los pacientes antes de la aparición del resultado clínico.

(3) Para los pacientes que desarrollan el resultado clínico antes de recibir cualquier tratamiento, no existe ningún tratamiento relevante. Para estos pacientes,  $A_t$  fue 0.

(4) Para las terapias biológicas administradas mediante infusión continua,  $A_t$  que ocurre durante la parte relevante de la infusión puede determinarse de la siguiente manera (para las terapias biológicas no administradas mediante fusión continua, el punto (4) puede omitirse):

a. Para la infusión administrada de forma continua durante más de 12 o 24 horas, se determina  $A_t$  por cada segmento de 12 o 24 horas de duración de la infusión relevante antes de la aparición del resultado clínico.

b. Para las infusiones que duran menos de 12 horas (o 24 horas, según corresponda), se determina  $A_t$  asociado con cada una de las infusiones relevantes antes de la aparición del resultado clínico.

c. Para cualquiera de los 2 casos anteriores (a y b), si el resultado clínico ocurre durante una infusión, se determina  $A_t$  asociado con la parte de la infusión anterior a la aparición del resultado clínico.

(B) Una vez que se determina  $A_t$  para todos los tratamientos relevantes para cada paciente con o sin el resultado clínico, se calcula el promedio, o máximo, de todos los  $A_t$  asociados con los tratamientos relevantes o la porción relevante de infusiones como se define anteriormente.

Se observa que se pueden aplicar operaciones matemáticas adicionales para refinar aún más la determinación de una correlación entre el nivel de exposición al atributo molecular y los datos sobre seguridad y eficacia. En algunas realizaciones, para cualquier método descrito aquí, la correlación comprende una correlación ponderada entre la exposición al atributos y las apariciones de eventos adversos. La ponderación podrá utilizar el tamaño de cada grupo de sujetos. Sin estar limitados por la teoría, se contempla que si los sujetos experimentan eventos adversos en un régimen de dosis múltiples de una terapia biológica, dichos sujetos pueden dejar de usar la terapia biológica. En conjunto, puede haber menos datos de sujetos que experimentaron eventos adversos que de aquellos que no experimentaron eventos adversos, lo que puede afectar la determinación de una correlación (o la falta de ella). En consecuencia, los datos pueden ponderarse opcionalmente para tener en cuenta a los sujetos que interrumpieron un régimen de múltiples dosis de una terapia biológica antes de completar el régimen, por ejemplo sujetos que experimentaron eventos adversos.

Se contempla además que para diferentes sujetos, la terapia biológica en la formulación puede estar en condiciones de almacenamiento durante diferentes duraciones para diferentes sujetos. Como tal, puede que no haya una única duración durante la cual la terapia biológica en la formulación haya estado en condiciones de almacenamiento. Más bien, se pueden aplicar diferentes duraciones a diferentes administraciones de la terapia biológica, según corresponda. La estimación del nivel de exposición al atributo molecular puede tener en cuenta estas diferentes duraciones seleccionando un tiempo de almacenamiento ( $t_i$ ) apropiado en cada caso. Así, en el método de algunas realizaciones, la terapia biológica estuvo bajo condiciones de almacenamiento durante diferentes duraciones en las administraciones a diferentes sujetos.

Se contempla además que para los métodos como se describe aquí, la administración de la terapia biológica puede comprender dos o más eventos de administración, por ejemplo al menos dos, tres, cuatro, cinco, o diez eventos de administración, incluidos intervalos entre dos cualesquiera de los valores enumerados, tales como dos-tres, dos-cinco, dos-diez, tres-cinco, tres-diez, o cinco-diez eventos de administración. De acuerdo con esto, en algunas realizaciones, el nivel estimado de exposición al atributo recibido por los sujetos en el momento de la administración es un máximo o un promedio de los dos o más eventos de administración.

Se contempla además que, para los métodos como los descritos aquí, la administración de la terapia biológica puede comprender una infusión continua. La infusión continua puede durar, por ejemplo, un período de horas o días. En algunas realizaciones, la administración comprende una infusión continua, y la estimación del nivel de exposición al atributo comprende calcular un nivel estimado de exposición al atributo molecular durante dos o más intervalos de la infusión continua, tales como intervalos de 12 horas o de 24 horas.

Los métodos descritos aquí pueden utilizar datos de estudios clínicos. Estos incluyen, pero no se limitan a, el número de sujeto, información del resultado clínico (fecha, hora y extensión [gravedad o grado]), número de lote del tratamiento, tratamiento (fecha, hora y duración). Los datos pueden agruparse según el resultado clínico (por ejemplo, criterios de valoración clínicos y/o eventos adversos). Los eventos adversos pueden ser indicativos de datos de seguridad, y los criterios de valoración clínicos pueden ser indicativos de datos de eficacia. En la agrupación basada en resultados clínicos, los sujetos se agrupan según la aparición del resultado clínico con la gravedad o grado de

interés. A modo de ejemplo, para analizar el impacto de un atributo molecular en la gravedad de un evento adverso de seguridad, los sujetos se agrupan según la aparición del EA con el grado de gravedad de interés (por ejemplo, el grupo positivo para fiebre grave incluiría a los pacientes que tuvieron fiebre de grado 3 o superior, mientras que el grupo negativo para fiebre grave incluiría a los sujetos que no tuvieron fiebre de grado 3 o superior). Después, el nivel estimado de exposición al atributo para cada sujeto se determina como se describe.

A modo de ejemplo, los datos de seguridad de los métodos descritos aquí pueden comprender datos de eventos adversos. Los eventos adversos pueden incluir eventos adversos relacionados con el tratamiento. Por ejemplo, los eventos adversos relacionados con el tratamiento con una terapia biológica pueden comprender eventos adversos inmunes, tal como una respuesta inmune contra la terapia biológica (por ejemplo, anticuerpo anti-fármaco (ADA)). Otros ejemplos de eventos adversos incluyen anemia, síndrome de liberación de citocinas (SLC), fiebre, reacción relacionada con la infusión (RRI), linfocitopenia, o eventos neurológicos. En algunas realizaciones, para cualquier método descrito aquí, los datos de seguridad comprenden datos de eventos adversos. A modo de ejemplo, los datos de seguridad pueden incluir una evolución temporal de un evento adverso.

A modo de ejemplo, los datos de eficacia de los métodos descritos aquí pueden comprender evidencia clínica de eficacia, por ejemplo tratamiento, prevención, mejora, o comienzo retardado de una enfermedad o trastorno. Los datos de los criterios de valoración clínicos pueden ser indicativos de eficacia. En consecuencia, en algunas realizaciones, los datos de eficacia comprenden datos de criterios de valoración clínicos.

Se contempla que, para cualquiera de los métodos aquí descritos, la presencia o ausencia de una correlación entre el nivel estimado de exposición al atributo molecular y los datos de seguridad y/o eficacia de la terapia biológica se puede calcular utilizando métodos estadísticos. Por ejemplo, se puede calcular una correlación de regresión lineal entre la tasa de eventos clínicos a partir de datos de seguridad y/o eficacia y el nivel de exposición al atributo, y se pueden determinar valores de p (Figs. 3A, 3B, 7B y 9). Por ejemplo, los valores de p pueden calcularse a partir de pruebas de la t o pruebas de F (Figs. 2A, 2B, 5A, 5B, 6, 7A, 8, 10A y 10B). Por ejemplo, se podría realizar una prueba de Log-rank o de Mantel-Cox para calcular valores de p para evaluar los comienzos tempranos de eventos de seguridad clínica para grupos de sujetos clínicos con niveles más altos de exposición al atributo (Figs. 4A y 4B).

En algunas implementaciones de cualquiera de los métodos descritos aquí, se utiliza un enfoque de estimación bayesiana. El enfoque de estimación bayesiana se puede utilizar para determinar la presencia o ausencia de una correlación entre el nivel estimado de exposición al atributo molecular y los datos de seguridad y/o eficacia de la terapia biológica. Debido a la naturaleza de aprendizaje gradual de un enfoque bayesiano, todas las evidencias pueden usarse *a priori* de manera completa e imparcial. En particular, al aplicar un enfoque de estimación bayesiana para determinar la presencia o ausencia de una correlación entre el nivel estimado de exposición al atributo molecular y los datos de seguridad y/o eficacia de la terapia biológica, el método puede modificar la función de densidad de probabilidad del impacto clínico de cada atributo para que tome un valor determinado cada vez que aparezca una nueva evidencia, hasta que se utilicen todas las evidencias. La probabilidad de que cada atributo esté asociado con cada evento adverso se deriva al final del análisis. Se ha desarrollado un programa informático para aprovechar la alta potencia computacional requerida para el enfoque bayesiano (véase el **Ejemplo 12**). El programa proporciona una plataforma interactiva para visualizar el resultado del enfoque de estimación bayesiana con hojas de cálculo proporcionadas por el usuario. El programa también proporciona módulos de ajuste de parámetros para definir valores anteriores, eliminar valores atípicos, y seleccionar múltiples atributos. Se probaron en el sistema algunos conjuntos de datos clínicos reales de CIA anteriores realizados para mAb D, así como algunos datos modelados basados en los datos de CIA de mAb D. El método de estimación bayesiano generó los resultados esperados, demostrando la validez del sistema.

## EJEMPLOS

### **EJEMPLO 1: Métodos de análisis de atributos moleculares**

Aquí, examinamos el impacto de seguridad inmunológica clínicamente relevante mediante 15 atributos moleculares entre 2 productos farmacéuticos de anticuerpos monoclonales (mAb) de inmunoglobulina G2 (IgG2), mAb A y mAb B, utilizando un enfoque de análisis de datos, denominado Análisis de Impacto Clínico (CIA). El CIA prueba si existe una correlación entre el nivel de exposición del paciente a un atributo determinado y el grado de aparición de un resultado clínico mediante el análisis de los datos de estudios clínicos y estudios de análisis de calidad del producto. No se encontró asociación entre el nivel de exposición del paciente a ninguno de los atributos y la respuesta de ADA, lo que sugiere que ninguno de los atributos analizados en los niveles de exposición examinados causa una respuesta de ADA. Además, los intervalos superiores de los niveles de exposición examinados fueron mayores o cercanos a los límites de especificación de pureza para los atributos del mAb A, lo que demuestra la viabilidad de generar evidencia clínicamente relevante para justificar estos atributos, posibilitada por el CIA. Estos resultados muestran que la integración de información clínica y analítica proporciona información clínicamente relevante sobre el impacto de los atributos aplicable en el desarrollo y la fabricación de fármacos.

Evaluamos el impacto de seguridad clínicamente relevante de los atributos integrando los datos analíticos clínicos y de atributos (Figura 1, Ecuación 1). En resumen, el nivel de exposición al atributo en el momento de la administración del tratamiento se aproxima combinando el nivel del atributo medido en el momento de la liberación del lote con el

cambio en el nivel del atributo entre la liberación del lote y el momento de la administración del tratamiento (Figura 1A). La exposición al atributo se determina entonces para los tratamientos individuales administrados al paciente durante el régimen de tratamiento. Si un atributo causa un evento clínico, entonces los pacientes con el evento se encontrarán asociados con niveles más altos de exposición al atributo en promedio (Figura 1B), o se encontrará una correlación positiva entre el nivel de exposición al atributo y la incidencia (Figura 1C, izquierda) o la evolución temporal (Figura 1C, derecha) del evento clínico. Por el contrario, la ausencia de asociación entre la exposición al atributo y el evento clínico indicará que el atributo no causa el evento en los niveles de exposición examinados.

Como se muestra en la FIG. 1A, el nivel de exposición al atributo en el momento de administración del tratamiento,  $A_t$ , es aproximado teniendo en cuenta el nivel del atributo medido en el momento de la fabricación y el cambio en el nivel a lo largo del tiempo. En un análisis retrospectivo, los pacientes se agrupan según el resultado clínico conocido retrospectivamente, tales como los resultados de la prueba de ADA (FIG 1B). Entonces,  $A_t$  que representa los pacientes individuales se compara entre los grupos como se ilustra. En un análisis prospectivo, los pacientes se agrupan según el  $A_t$  representativo (FIG. 1C). La incidencia (izquierda) o la evolución temporal (derecha) del resultado clínico de cada grupo se compara con respecto al  $A_t$  representativo promedio del grupo.

Investigamos la respuesta inmunológica de pacientes expuestos a 15 atributos entre 2 productos farmacéuticos separados, mAb A y mAb B, examinando las exposiciones a los atributos y los resultados de la prueba de ADA para 1.398 pacientes de 8 estudios clínicos individuales para mAb A, y para 5.439 pacientes de 2 estudios clínicos combinados para mAb B. ADA sigue siendo una preocupación regulatoria crítica debido a una variedad de impactos en la seguridad y la eficacia, incluida la neutralización de la función de unión a la diana por parte del fármaco y otros eventos adversos más graves<sup>17,18</sup>.

Los atributos analizados para mAb A son especies de alto peso molecular (HMW) en cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), especies ácidas en intercambio catiónico (CEX), especies de cadena no pesada y de cadena ligera (NonHC+LC) en electroforesis capilar en condición reductora/desnaturizante (rCE-SDS), y especies hidrófilas en el pre-pico que eluye antes de las especies principales en cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). Los atributos analizados para el mAb B son HMW en SEC; especies de bajo peso molecular (LMW) separables mediante rCE-SDS, especies de peso molecular medio (MMW), especies de cadena pesada no glicosilada (NGHC), suma de LMW MMW y NGHC (L+M+NG) y NonHC+LC; especies de alto contenido de manosa (HM) analizadas por cromatografía de interacción hidrófila, especies básicas 3 separables mediante CEX y todas las especies básicas; y variante 1 de secuencia C-terminal (CSV1) y variante 2 de secuencia C-terminal (CSV2) analizadas por espectrometría de masas. Se contempla que para los métodos descritos aquí, se puede analizar cualquier atributo o combinación de atributos.

En los niveles de exposición de atributos examinados, encontramos que ninguno de los 4 atributos de mAb A es un determinante de ADA. Además, ninguno de los 11 atributos de mAb B resulta ser un determinante de ADA. Además, los intervalos superiores de los niveles examinados de exposición a atributos son más altos que, o cercanos a, las especificaciones de pureza propuestas para los atributos correspondientes de mAb A, lo que demuestra que el CIA se puede utilizar para generar evidencia clínicamente relevante que justifique las especificaciones propuestas.

El CIA implica analizar el grado de prevalencia, o evolución temporal, del resultado clínico según una variable dada, tal como por ejemplo los distintos niveles de atributos a los que están expuestos los pacientes. Se llevaron a cabo los siguientes enfoques para integrar los resultados de la prueba de ADA y el nivel de exposición a atributos de pacientes individuales al realizar CIA.

### **Selección de estudios clínicos**

Los criterios para seleccionar estudios clínicos para CIA fueron que (1) existía una gran variabilidad en el nivel de exposición al atributo, y (2) se inscribió un gran número de pacientes. De esta manera, se pueden obtener resultados estadísticamente significativos al analizar el impacto clínico en el contexto de una amplia gama de niveles de exposición a atributos. Así, se seleccionaron estudios de aumento de dosis o estudios que utilizaron múltiples lotes de tratamiento, y, si se necesitaba un mayor número de pacientes, se combinaron pacientes de estudios comparables para el análisis.

### **Resultados de la prueba de ADA de los estudios clínicos**

Se analizaron los resultados de la prueba de ADA de los inmunoensayos puente basados en electroquimioluminiscencia (ECL)<sup>19</sup>, cada uno desarrollado para detectar específicamente el ADA que se une al mAb A o al mAb B en el suero del paciente. Se observa que el ADA de unión abarca tanto ADA neutralizantes como no neutralizantes. Sin embargo, los ADA neutralizantes son mucho menos frecuentes que los ADA de unión tanto para el mAb A como para el mAb B, lo que requiere un número mucho mayor de pacientes para realizar análisis estadísticamente significativos, y el análisis de los ADA de unión se ajusta al presente ejemplo, que prueba si algún resultado clínico está asociado con una variable en los tratamientos.

Los estudios clínicos seleccionados para mAb A fueron 4 estudios de aumento de dosis de fase temprana con hasta un total de 218 pacientes, 2 estudios de fase 2 con hasta 627 pacientes, y 2 estudios de fase 3 con hasta 542 pacientes.

Estos tres conjuntos de estudios se analizaron individualmente mediante CIA retrospectivo o prospectivo que se describe a continuación.

5 Los estudios clínicos seleccionados para mAb B fueron 2 estudios de fase 2 con hasta 5.440 pacientes. Este conjunto de estudios fueron analizados mediante CIA tanto retrospectivo como prospectivo.

#### **Análisis de atributos y datos del estudio de estabilidad**

10 Los lotes de medicamentos administrados en los estudios clínicos seleccionados para el CIA se rastrearon utilizando un registro de rastreo de lotes para identificar los lotes de medicamentos inspeccionados en pruebas analíticas de calidad del producto, de modo que se pudiera obtener el nivel de atributo determinado en el momento de la liberación del lote específico de los lotes de tratamiento individuales.

15 Las pruebas para los análisis de liberación de lotes son SEC (cromatografía de exclusión por tamaño) para HMW, rCE-SDS (electroforesis capilar en condiciones reductoras y desnaturalizantes con SDS) para HC, LC, LMW, MMW y NGHC, y CEX (cromatografía de intercambio catiónico) para especies ácidas o básicas, desarrolladas individualmente específicamente para mAb A o mAb B. Otros datos analíticos de HIC (cromatografía de interacción hidrófoba), cromatografía hidrófila (HILIC) para HM y cartografiado de péptidos por LCMSMS (cromatografía de líquidos-espectrometría de masas en tándem) para especies variantes de secuencia C-terminal (CSV1 y CSV2) estaban disponibles para lotes limitados de mAb A o mAb B debido a que no estaban en el panel de ensayos de liberación de lotes.

25 También se extrajeron los datos de los estudios de estabilidad de atributos para cada producto farmacéutico. Los datos de estabilidad representan el cambio en el nivel de atributos individuales a lo largo del tiempo en las condiciones de almacenamiento, lo que es fundamental para determinar el nivel de exposición a atributos en el momento de la administración del tratamiento, como se muestra a continuación.

#### **Determinación de la exposición a atributos**

30 La cantidad de exposición a atributos en el momento de la administración del tratamiento,  $A_t$ , asociada con cada tratamiento se determinó a partir de la información anterior utilizando la Ecuación 1:

$$A_t = (\%A_0 + \%A_{\Delta} \times t)D \quad (\text{Ecuación 1})$$

35 en la que  $\%A_0$  es el porcentaje del atributo en el momento de la liberación del lote,  $\%A_{\Delta}$  es la tasa de cambio en el porcentaje del nivel del atributo,  $t$  es el tiempo de almacenamiento entre la liberación del lote y la administración del tratamiento, y  $D$  es la concentración de la dosis en la dimensión del peso del ingrediente farmacéutico activo asociado con cada tratamiento.

40 A cada paciente se le asigna entonces un  $A_t$  representativo. En el caso de los estudios de fase temprana en los que se administra un único tratamiento a cada paciente, el  $A_t$  representativo fue  $A_t$  asociado con el tratamiento.

45 En el caso de estudios que implican regímenes de múltiples tratamientos, los tratamientos administrados después de la primera vez que el paciente da positivo en la prueba de ADA son irrelevantes para investigar la causa de ADA. Entonces, para el paciente positivo para ADA, el  $A_t$  representativo fue el promedio o máximo de los niveles de exposición a atributos asociados con los tratamientos administrados antes de la primera vez que se probó ADA positivo. Para el paciente negativo para ADA, se incluyeron todos los tratamientos del régimen completo para determinar la exposición promedio o máxima para obtener el  $A_t$  representativo.

#### **50 Grupos de pacientes para CIA**

55 De los pacientes de los estudios seleccionados como se describe anteriormente, sólo los que cumplieron los siguientes criterios fueron incluidos en el CIA: (1) La información sobre los lotes está disponible para todos los tratamientos del régimen; (2) la exposición al atributo se pudo determinar para todos los tratamientos del régimen; (3) los resultados de la prueba de ADA están disponibles; y (4) ninguna prueba de ADA realizada antes de administrar el primer tratamiento arrojó resultados positivos. Por ejemplo, un paciente del estudio clínico para mAb B fue excluido del CIA porque faltaba una entrada para el número de lote del producto farmacológico para uno de los tratamientos. Además, 29 pacientes en los estudios para mAb B se excluyeron debido a que dieron positivo para ADA antes del tratamiento.

60 La aplicación de estos criterios dio como resultado el siguiente número de pacientes: El CIA para HMW, NonHC+LC o especies ácidas de mAb A analizó por separado a 218 pacientes de los 4 estudios combinados de fase temprana, y a 627 pacientes de los 2 estudios combinados de fase 2. El CIA para el pre-pico HIC de mAb A analizó por separado a 90 pacientes de los 2 estudios combinados de fase temprana, y a 24 pacientes de los 2 estudios combinados de fase 2. Un CIA separado para HMW de mAb A analizó además a 553 pacientes de los 2 ensayos de fase 3 combinados.

65

Para HMW, LMW, MMW, NGHC, M+N+NG, NonHC+LC, especie básica 3 y todas las especies básicas de mAb B, se analizaron 5439 pacientes de los 2 estudios combinados de fase 2 mediante los 3 enfoques de CIA (Figura 1B y C, véase a continuación). El CIA para HM de mAb B se realizó analizando 127 pacientes, y para GSV1 y GSV2, analizando 1.671 pacientes, del mismo conjunto de estudios clínicos.

### **Ejemplo 2: Resultados para el análisis del impacto de los atributos en pacientes individuales**

Si un atributo provoca una respuesta de ADA, entonces existiría una correlación positiva, por lo que los pacientes ADA-positivos se encontrarían asociados con un nivel de exposición al atributo más alto en comparación con los pacientes ADA-negativos (**FIG. 1A-C**). Encontrar la asociación no prueba la causalidad, aunque tal hallazgo puede motivar estudios adicionales para comprobar la causalidad. Sin embargo, descubrir que dicha asociación no existe eliminará la causalidad de ADA por el atributo en el nivel de exposición examinado. Se realizaron tres análisis separados para probar la asociación entre el nivel de exposición al atributo y la aparición de la respuesta de ADA.

El nivel de exposición a atributos representativo analizado para pacientes individuales (como se describe en el Ejemplo 1) se determinó a partir de las exposiciones únicas para los pacientes en los estudios de fase 1 para mAb A, las exposiciones máximas para los pacientes en los estudios de fase 2 y 3 para mAb B, y las exposiciones máximas para los pacientes de mAb B. El promedio  $A_i$  es una representación estadística de las exposiciones a múltiples atributos. El  $A_i$  máximo es inmunológicamente relevante debido a que el paciente puede generar ADA sólo tras una exposición a un inmunógeno que supere un cierto nivel umbral<sup>20,21</sup>.

### **Ejemplo 3: CIA retrospectivo para los atributos de mAb A y mAb B**

Se desarrolló un análisis retrospectivo (sujetos agrupados según el resultado clínico conocido retrospectivamente) para evaluar si los pacientes ADA positivos estaban asociados con niveles más altos de exposición a atributos en comparación con los pacientes ADA negativos. Los pacientes se agrupan según los resultados de la prueba de ADA conocidos retrospectivamente (**FIG. 1B**). Después, las distribuciones de los niveles de exposición a atributos representativos se comparan entre los grupos de pacientes ADA positivos y ADA negativos para cada atributo. Si los niveles de exposición a atributos representativos para el grupo de pacientes ADA positivos son más altos que los del grupo de pacientes ADA negativos en promedio, entonces se realiza la prueba de la t de Student para evaluar si la diferencia es estadísticamente significativa.

No se encontró asociación estadísticamente significativa entre los pacientes positivos para ADA y una mayor exposición a cualquiera de los atributos de mAb A o mAb B (**FIG. 2**), lo que indica que ninguno de estos atributos causa ADA en los niveles de exposición examinados. Este hallazgo se mantiene independientemente de si la única exposición (**FIG. 2A**), la exposición promedio (Figura 1 del Apéndice), o la exposición máxima (**FIG. 2B**) se utilizó como nivel de exposición representativo (véase la sección Métodos). El examen de múltiples conjuntos de estudios clínicos para mAb A en diversas fases indica de manera sinónima que ninguno de los 4 atributos es un determinante de ADA (**FIG. 2A, FIGs. 7A y 8**).

Las **FIG. 2A-B** ilustran comparaciones de los niveles de exposición a atributos entre pacientes ADA positivos y ADA negativos, y muestran que no existe asociación estadísticamente significativa entre el alto nivel de exposición y los pacientes ADA positivos para todos los atributos analizados, lo que indica que estos atributos no causan ADA en las condiciones clínicas examinadas. Los números entre paréntesis son valores de p determinados cuando es necesario. Las líneas son el promedio  $\pm$  desviación estándar de las exposiciones de atributos representativos de cada paciente para cada grupo.

### **Ejemplo 4: CIA prospectivo (de incidencia de ADA para atributos de mAb A y mAb B)**

Se desarrolló un análisis de incidencia en sujetos agrupados según el  $A_i$  representativo para comprobar si existe una correlación positiva entre el nivel de exposición al atributo y la incidencia de la respuesta de ADA. Los pacientes se agrupan en cuartiles según los niveles de exposición a atributos, y el % de pacientes ADA positivos determinado para cada grupo se compara entre sí con respecto al promedio del grupo de los niveles representativos de exposición a atributos (**FIG. 1C**, panel izquierdo).

Los intervalos de los niveles de exposición aplicados para crear los grupos para los cuartiles se optimizaron para lograr variabilidades mínimas en los niveles de exposición dentro de cada grupo de pacientes, y simultáneamente para garantizar un número adecuado de pacientes que constituyan cada grupo. Si se observó una correlación positiva entre la incidencia de ADA y el nivel de exposición a atributos, se calculó una correlación ponderada utilizando el número de pacientes en grupos individuales como ponderación<sup>22</sup> para comprobar si la correlación era estadísticamente significativa.

En consonancia con los resultados del análisis de CIA del Ejemplo 3 (en el que los sujetos se agruparon según el resultado clínico conocido retrospectivamente), no se encuentra ninguna correlación estadísticamente positiva entre la incidencia de ADA y el nivel de exposición para todos los atributos analizados para mAb A o mAb B (**FIGs. 3A-B, FIG. 7B**). De hecho, una menor exposición parece estar asociada con pacientes ADA-positivos de mAb B, lo que se

manifiesta como correlaciones negativas en la Incidencia para los sujetos agrupados según el  $A_t$  representativo (**FIG. 3B**). Esta correlación negativa es un resultado estadísticamente informativo que corrobora además la ausencia de causalidad (véase a continuación; **FIGs. 5A-B, FIG. 9**).

5 **Las FIG. 3A-B** muestran fracciones de pacientes ADA positivos en los cuartiles de pacientes agrupados según los niveles de exposición a atributos representativos que van de bajos a altos, y se grafican como una función del promedio del grupo de los niveles de exposición representativos. Los números entre paréntesis son valores de  $p$  ponderados, que se determinan cuando se encuentra una correlación positiva. El número de pacientes en cada cuartil se muestra al lado del gráfico. Las barras de error son desviaciones estándar. Los resultados para mAb A se muestran en la **FIG. 3A**, y los resultados para mAb B se muestran en la **FIG. 3B**.

#### **Ejemplo 5: Análisis prospectivo del CIA sobre la evolución temporal de ADA para los atributos de mAb A y mAb B**

15 Se desarrolló otro análisis prospectivo (sujetos agrupados según  $A_t$  representativo; véase la **FIG. 1B**, panel derecho) para comparar la evolución temporal de la respuesta de ADA entre los pacientes agrupados de la misma manera que en la Incidencia de CIA en el Ejemplo 4, arriba. Si un mayor nivel de exposición a atributos se asociaba con una aparición más extensa a lo largo del tiempo, entonces se realizó la prueba de log-rank de Mantel-Cox<sup>23,24</sup> para probar si la diferencia en los cursos temporales era estadísticamente significativa.

20 De acuerdo con los análisis anteriores, no se encontró asociación entre los cursos temporales de ADA y los niveles de exposición para todos los atributos de mAb A o mAb B (**FIGs. 4A-B**). Para el pre-pico HIC del mAb A (**FIG. 4A**), el resultado que muestra la ausencia de su asociación con ADA no fue informativo debido al número limitado de pacientes analizados. Otros análisis anteriores realizados utilizando datos de un mayor número de pacientes en un conjunto diferente de estudios clínicos (**FIGs. 2A y 3A**) indican que HIC Pre-Pico, de hecho, no es un determinante de ADA.

#### **Ejemplo 6: Asociación entre la respuesta de ADA y $A_t$ representativo más bajo**

30 La asociación entre un nivel  $A_t$  más bajo y la respuesta de ADA, o correlación negativa, se encuentra tanto en la incidencia como en la evolución temporal tanto para el mAb A como para el mAb B (**FIGs. 2B, 3B, 4A y 4B**). Esta correlación negativa se vuelve pronunciada cuando se analiza el  $A_t$  máximo en CIA para mAb B (**FIGs. 2B, 3B y 4B**).

35 Utilizando exposiciones a HMW en los pacientes tratados con mAb B, demostramos que las correlaciones negativas fortalecen los resultados de CIA que muestran que la exposición al atributo no causa la respuesta de ADA. No existe sesgo en cómo se produce la exposición máxima a HMW entre los pacientes ADA negativos y ADA positivos: En general, no hay diferencia en el nivel máximo de  $A_t$  entre pacientes ADA negativos y ADA positivos (Figura 5A); y los tiempos de tratamiento, en los que ocurren las exposiciones máximas a HMW, también se distribuyen de manera similar entre los pacientes ADA negativos y ADA positivos (Figura 5B). Sin embargo, la mayoría de los tratamientos están asociados con exposiciones a HMW que son, en particular, menores que el promedio de exposiciones máximas a HMW de 2 mg, como en la Figura 5A (Figura 5C). Sin estar limitados por la teoría, se contempla que excluir los tratamientos en algunos de los momentos de administración posteriores (debido a su falta de relevancia para la causalidad de la aparición de ADA) puede dar como resultado el análisis de las siguientes exposiciones más altas de HMW como exposiciones representativas para los pacientes ADA positivos. El uso de estas exposiciones a HMW inmediatamente superiores puede crear un sesgo que impulse la correlación en una dirección negativa. Este sesgo potencial puede tenerse en cuenta al realizar el análisis.

40 En la **FIG. 5A**, el  $A_t$  máximo determinado utilizando todos los tratamientos o los tratamientos relevantes para ADA se grafican para los pacientes ADA negativos o ADA positivos. Se indican el promedio  $\pm$  desviación estándar para el  $A_t$  máximo determinado utilizando todos los tratamientos para pacientes ADA-negativos; y los de otros grupos son como se analizaron para los mismos grupos correspondientes en la Figura 2B. Los valores de  $p$  de las pruebas de la  $t$  son mayores que 0,05 para las comparaciones indicadas n.s. (no significativo), a menos que se indique lo contrario. Las barras de error son la desviación estándar. En la **FIG. 5B**, se muestran las frecuencias del tiempo de los tratamientos mensuales vinculados a las exposiciones máximas a HMW en pacientes individuales para los grupos ADA-negativos y ADA-positivos. En la **FIG. 5C**, se grafica la frecuencia de los tratamientos que dan como resultado diferentes niveles de exposición a HMW para pacientes individuales con mAb2, junto con el porcentaje acumulativo de los números de tratamientos.

60 Sólo las exposiciones a atributos de los tratamientos administrados antes de las respuestas de ADA son relevantes para la respuesta de ADA. Además, el análisis de las exposiciones máximas a los atributos tiene en cuenta el mecanismo inmunológico, ya que el ADA sólo puede ser inducido por inmunógenos que superen las concentraciones umbral<sup>20,21</sup>. En conjunto, las correlaciones negativas encontradas aquí proporcionan evidencia adicional de que la exposición al atributo no causa ADA (véase el Ejemplo 8).

#### **Ejemplo 7: Aplicación del enfoque de CIA al análisis del impacto clínico del régimen de tratamiento**

65

Además de analizar el impacto de los atributos, probamos si existe una asociación entre la respuesta de ADA y diversos factores del régimen de tratamiento, incluido el número de administraciones del tratamiento, las dosis para cada tratamiento, y el número de lotes de tratamiento asociados con el curso del tratamiento para cada paciente.

5 Ninguno de estos factores se encuentra asociado con la incidencia de ADA. De hecho, los pacientes con ADA positivo se asocian con menores números y duraciones de tratamientos, así como con menos lotes de tratamiento, debido a que los análisis incluyeron sólo los tratamientos administrados antes de sus primeras pruebas de ADA positivas.

10 Esto demuestra que el enfoque de CIA también se puede aplicar a otros aspectos de los tratamientos, además de a las exposiciones a atributos. Prevemos que se puede realizar un análisis poderoso que amplíe el conocimiento sobre la seguridad y eficacia de los medicamentos combinando la información de exposición a atributos con la información del paciente, tal como la demografía, o incluso los genotipos.

### **Ejemplo 8: Un análisis adicional de la incidencia prospectiva de CIA**

15 En la Incidencia de CIA de sujetos agrupados según el  $A_t$  representativo (**FIGs. 9A-B**), se probó si la pendiente de la regresión lineal es significativamente diferente de cero utilizando la prueba de F, que calcula la probabilidad,  $p$ , de que los puntos seleccionados aleatoriamente dieran como resultado, o superaran, el coeficiente de correlación de regresión lineal observado,  $R^2$ . Los valores de  $p$  de las pruebas de F que determinaron las pendientes significativas distintas de cero en las regresiones para NonHC+LC en rCE-SDS, Especies Básicas 3 en CEX, Todas las Especies Básicas en CEX, y CSV2, analizados utilizando  $A_t$  máx., fueron 0,017, 0,049, 0,031 y 0,045, respectivamente. Las demás pendientes no fueron significativamente diferentes de cero.

20 **La FIG. 9B** se recapitula, y se compara con los mismos conjuntos de datos que se vuelven a analizar utilizando  $A_t$  promedio, en lugar del  $A_t$  máximo como en la FIG. 9B. Las líneas son regresiones lineales no ponderadas, y la pendiente de todas las regresiones es estadísticamente cero, excepto las de rCE-SDS NonHC+LC analizadas usando  $A_t$  máximo, Especies Básicas 3 en CEX analizadas usando  $A_t$  máximo, Todas las Especies Básicas en CEX analizadas usando  $A_t$  máximo, y CSV2 analizado usando  $A_t$  máximo.\* El número de pacientes agrupados en los cuartiles para nuevos análisis es el mismo que los cuartiles correspondientes como se muestra en la FIG. 9B, a menos que se indique lo contrario. Las correlaciones de los datos reanalizados son generalmente menos negativas, excepto para HM y CSV1, cuya pendiente para todos los ajustes es estadísticamente cero.

### **Ejemplo 9: CIA utiliza estudios clínicos adicionales**

35 Los análisis de CIA sobre el impacto de los atributos del mAb A en ADA realizados con los datos de los estudios clínicos de fase 2 indican que ninguno de los CQA es un determinante de la respuesta de ADA en los niveles de exposición examinados (**FIG. 7**). Los niveles de exposición a atributos en los estudios clínicos de fase 3 de mAb A son inferiores a los de los estudios de fase anterior, y, como lo indica el análisis de CIA de sujetos agrupados según el  $A_t$  representativo, no causan ADA (**FIG. 8**).

40 Como se muestra en la **FIG. 7-B**, se analizan pacientes en régimen en estudios clínicos diferentes a los analizados en la **FIG. 2A**. El  $A_t$  promedio por tratamiento se utiliza como  $A_t$  representativo para tratamientos individuales. Las barras de error son la incertidumbre propagada a partir de la desviación estándar asociada con el  $A_t$  promedio individual. Los cuartiles analizados en (**FIG. 7B**), y los intervalos de exposición a atributos utilizados para agrupar los cuartiles son los mismos que los de la **FIG. 4A**.

### **Asociación entre $A_t$ bajo y ADA**

50 Se encontrará un sesgo en las exposiciones máximas a atributos entre los pacientes ADA negativos y ADA positivos, si los atributos no causan ADA y sólo se analizan los tratamientos relevantes para ADA en el CIA de los pacientes ADA positivos, como se establece aquí. Este sesgo disminuirá cuando se analice la exposición promedio por tratamiento como la exposición representativa de pacientes individuales. Por ejemplo, es plausible que el sesgo que da como resultado exposiciones máximas reducidas a HMW al excluir los tratamientos irrelevantes para ADA del CIA de pacientes ADA positivos pueda ser compensado por el sesgo análogo que da como resultado exposiciones mínimas aumentadas a HMW. En consonancia con esta ilustración, el uso de las exposiciones promedio como exposiciones representativas para CIA generalmente disminuye, o elimina, estas correlaciones negativas (**FIG. 9**). Debido a que los atributos analizados aquí son relevantes para ADA, y el análisis de las exposiciones máximas es inmunológicamente significativo 25,26, las correlaciones negativas descritas en el texto principal proporcionan evidencia adicional de que los atributos no causan ADA en la condición clínica examinada.

### **Ejemplo 10: Análisis y conclusiones de los Ejemplos 1-9**

65 Demostramos que la integración de la información sobre lotes de tratamiento, resultados clínicos y datos de análisis de atributos permite la aproximación del nivel de exposición a atributos asociado con los tratamientos individuales administrados a los pacientes. Entonces, se puede comprobar si un atributo causa ADA mediante pruebas estadísticas que examinan la presencia de correlación entre un  $A_t$  más alto y la aparición de la respuesta de ADA. Si bien la

presencia de asociación requerirá investigaciones más específicas para establecer la causalidad, la ausencia de asociación elimina la causalidad.

El trabajo aquí describe un esfuerzo que integra información de tratamiento para pacientes individuales y evalúa el impacto clínicamente relevante de los atributos moleculares para la terapéutica. Aquí, no se encuentra una correlación positiva significativa entre la respuesta de ADA y el nivel de exposición para ninguno de los 15 atributos examinados entre 2 productos farmacéuticos, mAb A y mAb B, lo que indica que ninguno de estos atributos es un determinante de ADA en los niveles examinados para los productos farmacéuticos correspondientes (Tabla 1). Este trabajo no establece que estos atributos tampoco supongan un mayor riesgo de seguridad en diferentes niveles de exposición o para otras moléculas de mAb terapéuticas.

El presente enfoque analiza datos pasivos extraídos de estudios clínicos originalmente pensados para centrarse en establecer la seguridad o eficacia de los productos farmacéuticos. Las preocupaciones éticas de exponer a los pacientes a niveles arbitrarios de atributos impiden la generación de datos activos mediante el diseño de estudios específicamente para explorar el impacto de los atributos en los pacientes. Sin embargo, el CIA de datos pasivos proporciona información valiosa e implicaciones tanto para las actividades científicas básicas como aplicadas en biotecnología.

Por ejemplo, el CIA puede ayudar a determinar los límites de especificación de pureza del producto centrados en el paciente. La falta de causalidad de ADA por exposición a atributos, como se estableció anteriormente, indica que los atributos en los niveles de exposición examinados no representan un mayor riesgo de seguridad inmunológica. En particular, los límites superiores de estos niveles de exposición a atributos analizados para mAb A (Tabla 1) son cercanos o superiores a los límites de los atributos correspondientes impuestos por las especificaciones de este producto farmacéutico (no se muestran), lo que demuestra que la evidencia centrada en el paciente generada por CIA se puede utilizar para determinar los límites de especificación terapéutica.

La FIG. 6 ilustra los impactos de los factores en los tratamientos sobre el ADA. Se comparan diversos factores del régimen de tratamiento con mAb B, la dosis promedio por tratamiento, la duración del tratamiento, el número de tratamiento y el número de lote de tratamiento entre pacientes ADA negativos y ADA positivos. Estos factores corresponden a todos los tratamientos para pacientes negativos para ADA, o a tratamientos anteriores a los primeros resultados de la prueba positivos para ADA para pacientes positivos para ADA. Los errores son desviaciones estándar.

**Tabla 1. Promedio y máximo de exposiciones de atributos representativos (en mg) analizados de pacientes individuales en CIA.**

Molécula	Atributo	Promedio	±	Desviación estándar	Máximo
mAb A <sup>†</sup>	HMW en SEC	1,0	±	0,5	2,8
	NoHC+LC en CE	1,7	±	0,9	4,4
	Especies ácidas	36	±	17	87
	Pre-pico en HIC	4,9	±	0,4	5,2
mAb B <sup>‡</sup>	HMW en SEC	2,0	±	0,2	2,8
	LMW en CE	0,30	±	0,06	0,63
	MMW en CE	0,9	±	0,2	1,7
	NGHC en CE	1,08	±	0,05	1,20
	L+M+NG en CE	2,2	±	0,2	3,5
	NoHC+LC en CE	4,6	±	0,3	6,3
	HM	9,8	±	0,4	9,9
	Especies básicas 3	14	±	3	17
	Todas las especies básicas	34	±	4	39
	CSV1	4	±	2	6
CSV2	6	±	2	9	

<sup>†</sup>Los valores para mAb A son de las FIGs. 2A y 3A.

<sup>‡</sup>Los valores para mAb B son de las FIGs. 2B, 3B y 4B.

El CIA también puede profundizar los conocimientos fundamentales en inmunología clínica. Cualquier asociación encontrada entre la respuesta de ADA y el nivel de exposición al atributo puede dar lugar a estudios *in vitro* o *in vivo* enfocados en investigar la causalidad o el mecanismo de generación de ADA. Dependiendo de si  $A_i$  promedio o

máximo representa mejor cualquier exposición a atributos correlacionada con ADA, una hipótesis también se puede estrechar para probar si las exposiciones repetidas a atributos altos o las exposiciones únicas a atributos altos son críticas para inducir la respuesta de ADA.

5 Demostramos además que el CIA se puede combinar con otros análisis para proporcionar implicaciones poderosas en el desarrollo de terapias, y para abordar preguntas críticas inexploradas. ¿Puede un atributo afectar el resultado clínico de un subconjunto de la población definido por su información demográfica o genómica? ¿Podrían los conocimientos resultantes en demografía y genómica mejorar el diseño de ensayos clínicos? ¿Los atributos alterarían los comportamientos biofísicos, tales como la estructura y la dinámica conformacional, para diferentes moléculas de proteínas terapéuticas, y a su vez, afectarían los resultados clínicos? El presente trabajo presenta datos y análisis que encabezan estas y otras discusiones.

15 En resumen, comprender el impacto de los atributos moleculares en la seguridad y eficacia de los fármacos es fundamental para el desarrollo de terapias. Por ejemplo, algunos atributos pueden hacer que los pacientes generen respuestas de anticuerpos antifármacos (ADA), lo que sigue siendo una preocupación reguladora importante debido a los posibles impactos clínicos, incluida la neutralización del fármaco. Los sistemas de modelos no humanos, tales como células, tejidos y animales, son sistemas experimentales viables para probar el impacto de los atributos en la seguridad, pero brindan información limitada sobre las consecuencias clínicas de la exposición del paciente a los atributos. Aquí, examinamos el impacto de seguridad inmunológica clínicamente relevante mediante 15 atributos entre 20 productos farmacéuticos de anticuerpos monoclonales (mAb) de inmunoglobulina G2 (IgG2), mAb A y mAb B, utilizando un enfoque de análisis de datos, denominado Análisis de Impacto Clínico (CIA). El CIA prueba si existe una correlación entre el nivel de exposición del paciente a un atributo determinado y el grado de aparición de un resultado clínico mediante el análisis de los datos de estudios clínicos y estudios de análisis de calidad del producto. No se encontró asociación entre el nivel de exposición del paciente a ninguno de los atributos y la respuesta de ADA, lo que sugiere que ninguno de los atributos analizados en los niveles de exposición examinados causa una respuesta de ADA. Además, los intervalos superiores de los niveles de exposición examinados fueron mayores o cercanos a los límites de especificación de pureza para los atributos del mAb A, lo que demuestra la viabilidad de generar evidencia clínicamente relevante para justificar estos atributos, posibilitada por el CIA. Estos resultados muestran que la integración de información clínica y analítica proporciona información clínicamente relevante sobre el impacto de los atributos aplicable en el desarrollo de fármacos.

#### **Ejemplo 11: Análisis del Producto C, una molécula BiTE® canónica**

35 Se realizó un análisis adicional sobre el Producto C, una molécula BiTE® canónica. Los atributos moleculares medidos fueron sulfatación de Tyr, isomerización de Asp, hidroxilisina de Lys, glucosil-galactosilhidroxilisina de Lys, oxidación de Met, y agregados de SE-HPLC. También se evaluó la potencia. Los datos de seguridad incluyeron la identificación de los siguientes eventos adversos: Anemia, síndrome de liberación de citocinas (SRC), fiebre, reacción relacionada con la infusión (RRI), linfocitopenia, y eventos neurológicos.

40 La exposición al atributo se estimó en función de 1) el nivel porcentual del atributo para diferentes lotes de producto farmacéutico en el momento de la fabricación, 2) la estabilidad del atributo o la tasa a la que el nivel del atributo cambia durante todo el almacenamiento del producto farmacéutico (PF), 3) la fecha y la hora en que se administra un tratamiento individual a cada paciente, junto con el registro de qué lote de producto farmacéutico se administró para cada tratamiento. Después, 4) la fecha y hora de la aparición del resultado clínico dado con los grados (o gravedades) de interés se pueden incorporar para la siguiente etapa en el CIA (Figura 1), en el que 5) el CIA combina la información para determinar la exposición al atributo, y 6) analiza si existe una asociación entre el nivel de exposición al atributo y la aparición del resultado clínico de interés.

50 (A) Primero se determinó  $A_i$  utilizando la Ecuación 1 para todos los tratamientos relevantes como se define a continuación.

(1) Para los pacientes que no muestran el resultado clínico de interés a lo largo de los estudios clínicos, los tratamientos relevantes son todos los tratamientos administrados a los pacientes a lo largo del estudio.

55 (2) Para los pacientes que muestran el resultado clínico, los tratamientos relevantes son todos los tratamientos administrados a los pacientes antes de la aparición del resultado clínico.

60 (3) Para los pacientes que desarrollan el resultado clínico antes de recibir cualquier tratamiento, no existe ningún tratamiento relevante. Para estos pacientes,  $A_i$  fue 0.

(4) Para las administraciones mediante infusión continua,  $A_i$  que ocurre durante la parte relevante de la infusión se determinó de la siguiente manera:

- 5 a. Para la infusión administrada de forma continua durante más de 24 horas, se determina  $A_t$  por cada segmento de 24 horas de duración de la infusión relevante antes de la aparición del resultado clínico.
- b. Para las infusiones que duran menos de 24 horas, se determina  $A_t$  asociado con cada una de las infusiones relevantes antes de la aparición del resultado clínico.
- 10 c. Para cualquiera de los 2 casos anteriores, si el resultado clínico ocurre durante una infusión, se determina  $A_t$  asociado con la parte de la infusión anterior a la aparición del resultado clínico.

15 Los resultados para el análisis del Producto C se muestran en las FIGS. 10A-B. Además de los 6 CQA enumerados para el CIA del Producto C, se analizó el impacto de la potencia en los EA probando si existe una correlación entre la dosis del Producto C escalada según el valor de potencia y la aparición de EA en pacientes a los que se les administró una dosis nula, una dosis media o una dosis alta. Como se muestra en la FIG. 10A, se analizó la asociación de la potencia con la aparición de EA con cualquier grado. Como se muestra en la Figura 10B, se analizó la asociación de la potencia con la aparición de EA con un grado de 3 o superior.

20 Se observó que ninguno de los atributos se correlacionó con ninguno de los eventos adversos evaluados. De esta forma se determinó que los niveles estimados de exposición a los atributos eran seguros.

### **Ejemplo 12: Implementación informática de la estimación bayesiana**

25 Se desarrolló un programa informático para aprovechar el alto poder computacional requerido para el enfoque de estimación bayesiana. El programa proporciona una plataforma interactiva para visualizar el resultado del enfoque de estimación bayesiana con hojas de cálculo proporcionadas por el usuario. El programa también proporciona módulos de ajuste de parámetros para definir valores anteriores, eliminar valores atípicos, y seleccionar múltiples atributos. Se probaron en el sistema un conjunto de datos clínicos procesados para métodos de evaluación de un impacto clínico de un atributo molecular de mAb D, así como algunos datos modelados basados en los datos CIA de mAb D. El método se realizó para probar si existe una correlación positiva entre la exposición a mAb D HMW y la aparición del evento adverso de pirexia comparando las exposiciones diarias máximas a HMW entre los sujetos negativos y positivos al evento adverso. El método no encontró correlación utilizando el método convencional (**FIG. 11A**). El método bayesiano (**FIGs. 11C-D**) generó resultados análogos al sistema convencional (**FIGs. 11A-B**), demostrando la validez del sistema:

- 35 (1) Al analizar los datos clínicos de un ensayo clínico de mAb D, el método de estimación bayesiano indicó ausencia de probabilidad de que los atributos estuvieran correlacionados con los resultados clínicos (**FIG. 11C**). Cuando los datos se procesaron utilizando estadísticas convencionales, se indicó el mismo resultado por las estadísticas convencionales (**FIG. 11A**), mientras que
- 40 (2) al analizar el conjunto de datos modelados (basados en dichos datos clínicos), pero en el que los niveles de exposición a los atributos se incrementaron arbitrariamente para los sujetos del estudio clínico, el método de estimación bayesiana indicó una probabilidad de que los atributos estuvieran correlacionados con los resultados clínicos (**FIG. 11D**), al igual que las estadísticas convencionales (**FIG. 11B**). Así, tanto las estadísticas convencionales como el método de estimación bayesiano indicaron la correlación entre el
- 45 resultado clínico y los niveles de exposición a atributos aumentados arbitrariamente.

### **Referencias**

- 50 1 Rosenberg, A. S., Verthelyi, D. & Cherney, B. W. Managing uncertainty: a perspective on risk pertaining to product quality attributes as they bear on immunogenicity of therapeutic proteins. *J Pharm Sci* 101, 3560-3567, doi:10.1002/jps.23244 (2012).
- 55 2 Goetze, A. M., Schenauer, M. R. & Flynn, G. C. Assessing monoclonal antibody product quality attribute criticality through clinical studies. *MAbs* 2, 500-507 (2010).
- 3 Kelley, B., Cromwell, M. & Jerkins, J. Integration of QbD risk assessment tools and overall risk management. *Biologicals* 44, 341-351, doi:10.1016/j.biologicals.2016.06.001 (2016).
- 60 4 Bessa, J. et al. The immunogenicity of antibody aggregates in a novel transgenic mouse model. *Pharm Res* 32, 2344-2359, doi:10.1007/s11095-015-1627-0 (2015).
- 5 Bi, V. et al. Development of a human antibody tolerant mouse model to assess the immunogenicity risk due to aggregated biotherapeutics. *J Pharm Sci* 102, 3545-3555, doi:10.1002/jps.23663 (2013).

- 6 Bee, J. S., Goletz, T. J. & Ragheb, J. A. The future of protein particle characterization and understanding its potential to diminish the immunogenicity of biopharmaceuticals: a shared perspective. *J Pharm Sci* 101, 3580-3585, doi:10.1002/jps.23247 (2012).
- 5 7 Goetze, A. M., Liu, Y. D., Arroll, T., Chu, L. & Flynn, G. C. Rates and impact of human antibody glycation in vivo. *Glycobiology* 22, 221-234, doi:10.1093/glycob/cwr141 (2012).
- 8 Jawa, V. et al. Evaluating Immunogenicity Risk Due to Host Cell Protein Impurities in Antibody-Based Biotherapeutics. *AAPS J* 18, 1439-1452, doi:10.1208/s12248-016-9948-4 (2016).
- 10 9 Joubert, M. K. et al. Use of In Vitro Assays to Assess Immunogenicity Risk of Antibody-Based Biotherapeutics. *PLoS One* 11, e0159328, doi:10.1371/journal.pone.0159328 (2016).
- 15 10 Liu, Y. D. et al. Human IgG2 antibody disulfide rearrangement in vivo. *J Biol Chem* 283, 29266-29272, doi:10.1074/jbc.M804787200 (2008).
- 11 Liu, Y. D., van Enk, J. Z. & Flynn, G. C. Human antibody Fc deamidation in vivo. *Biologicals* 37, 313-322, doi:10.1016/j.biologicals.2009.06.001 (2009).
- 20 12 Yang, J., Goetze, A. M. & Flynn, G. C. Assessment of naturally occurring covalent and total dimer levels in human IgG1 and IgG2. *Mol Immunol* 58, 108-115, doi:10.1016/j.molimm.2013.11.011 (2014).
- 13 Zhang, Q. et al. Characterization of the co-elution of host cell proteins with monoclonal antibodies during protein A purification. *Biotechnol Prog* 32, 708-717, doi:10.1002/btpr.2272 (2016).
- 25 14 Seamon, K. B. Specifications for biotechnology-derived protein drugs. *Curr Opin Biotechnol* 9, 319-325 (1998).
- 15 Rathore, A. S. Setting Specifications for a Biotech Therapeutic Product in the Quality by Design Paradigm. *BioPharm International* 23 (2010). accessible en la red mundial en [www dot biopharminternational dot com/setting-specifications-biotech-therapeutic-product-quality-design-paradigm?id=&pageID=1&sk=&date=.](http://www.biopharminternational.com/setting-specifications-biotech-therapeutic-product-quality-design-paradigm?id=&pageID=1&sk=&date=)
- 30 16 Rathore, A. S. Roadmap for implementation of quality by design (QbD) for biotechnology products. *Trends Biotechnol* 27, 546-553, doi:10.1016/j.tibtech.2009.06.006 (2009).
- 35 17 Casadevall, N. et al. Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N Engl J Med* 346, 469-475, doi:10.1056/NEJMoa011931 (2002).
- 18 Li, J. et al. Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin. *Blood* 98, 3241-3248 (2001).
- 40 19 Bautista, A. C., Salimi-Moosavi, H. & Jawa, V. Universal immunoassay applied during early development of large molecules to understand impact of immunogenicity on biotherapeutic exposure. *AAPS J* 14, 843-849, doi:10.1208/s12248-012-9403-0 (2012).
- 45 20 Sauerborn, M., Brinks, V., Jiskoot, W. & Schellekens, H. Immunological mechanism underlying the immune response to recombinant human protein therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* 31, 53-59, doi:10.1016/j.tips.2009.11.001 (2010).
- 50 21 Baker, M. P., Reynolds, H. M., Lemicis, B. & Bryson, C. J. Immunogenicity of protein therapeutics: The key causes, consequences and challenges. *Self Nonself* 1, 314-322, doi:10.4161/self.1.4.13904 (2010).
- 22 Sauna, Z. E., Lagassé, D., Pedras-Vasconcelos, J., Golding, B. & Rosenberg, A. S. Evaluating and Mitigating the Immunogenicity of Therapeutic Proteins. *Trends Biotechnol* 36, 1068-1084, doi:10.1016/j.tibtech.2018.05.008 (2018).
- 55 23 Mantel, N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep* 50, 163-170 (1966).
- 24 Peto, R. & Peto, J. Asymptotically Efficient Rank Invariant Test Procedures. *Journal of the Royal Statistical Society. Series A (General)* 135, 185-207, doi:10.2307/2344317 (1972).
- 60 25 Sauerborn, M., Brinks, V., Jiskoot, W. & Schellekens, H. Immunological mechanism underlying the immune response to recombinant human protein therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* 31, 53-59, doi:10.1016/j.tips.2009.11.001 (2010).
- 65

26 Baker, M. P., Reynolds, H. M., Lumicisi, B. & Bryson, C. J. Immunogenicity of protein therapeutics. The key causes consequences and challenges. *Self Nonself* 1, 314-322, doi:10.4161/self.1.4.13904 (2010).

5 27. Wurth C., Demeule B., Mahler H.-C. & Adler M. Quality by Design Approaches to Formulation Robustness - An Antibody Case Study *J. Pharma. Sci.* 105(5), 1667-1675 (2016). J Z

10 El uso de los términos "un" y "una" y "el/la", y referencias similares, en el contexto de describir la descripción (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) debe interpretarse para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique aquí de otro modo o se contradiga claramente por el contexto. Las expresiones "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" deben interpretarse como expresiones abiertas (es decir, que significan "que incluye, pero no se limita a"), a menos que se indique lo contrario.

15 Los términos "paciente" y "sujeto" se utilizan indistintamente aquí. Generalmente, se entenderá que estos términos se refieren a seres humanos. En los métodos de algunas realizaciones, el paciente o sujeto es un ser humano.

20 La enumeración de intervalos de valores aquí tiene la intención meramente de servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del intervalo y cada punto final, a menos que se indique lo contrario aquí, y cada valor y punto final por separado se incorpora a la memoria descriptiva como si se citase individualmente aquí.

25 Todos los métodos descritos en esta memoria se pueden realizar en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario aquí o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje ilustrativo (por ejemplo, "tal como") que se proporciona en esta memoria, tiene como intención ilustrar mejor la descripción, y no representa una limitación en el alcance de la descripción, a menos que se reivindique lo contrario. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva debe interpretarse como una indicación de cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la divulgación.

Se describen aquí realizaciones preferidas de esta divulgación, incluido el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención reivindicada.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para fabricar una terapia biológica, comprendiendo el método:

5 detectar un nivel de un atributo molecular de la terapia biológica en una formulación en uno o más puntos de tiempo en condiciones de almacenamiento;

10 determinar una tasa de cambio del atributo molecular en las condiciones de almacenamiento, en el que un atributo molecular es una estructura química o físicamente modificada de la molécula que define sus propiedades fisicoquímicas;

obtener datos sobre la seguridad y/o eficacia *in vivo* de la terapia biológica para sujetos que han recibido una administración de la terapia biológica;

15 estimar un nivel de exposición al atributo molecular recibido por los sujetos en el momento de dicha administración, basándose en (i) la tasa de cambio del atributo molecular durante el almacenamiento de la terapia biológica en la formulación, y (ii) una duración que la terapia biológica en la formulación estuvo bajo las condiciones de almacenamiento antes de dicha administración;

20 determinar la presencia o ausencia de una correlación entre el nivel estimado de exposición al atributo molecular y los datos de seguridad y/o eficacia de la terapia biológica; y

25 si no existe correlación, fabricar lotes de producción de la terapia biológica que comprenden el atributo molecular en un nivel permisible específico del atributo molecular o por debajo de él, en función del nivel estimado de exposición al atributo molecular.

30 2. El método de la reivindicación 1, en el que si la correlación está presente, el método comprende además establecer una especificación para los niveles del atributo molecular en el momento de la fabricación que no excedan un nivel máximo permisible del atributo molecular de la terapia,

en el que dicho nivel máximo permisible del atributo molecular se basa en los niveles más altos estimados de exposición al atributo molecular que no estén asociados con eventos adversos y/o inhibición de la eficacia de la terapia biológica,

35 comprendiendo además dicha fabricación rechazar lotes de producción de la terapia biológica que comprenden niveles del atributo molecular que exceden los niveles máximos permisibles.

40 3. El método de la reivindicación 2, en el que el nivel máximo permisible especificado del atributo molecular se calcula para producir un nivel de exposición al atributo al final del período de almacenamiento que sea menor o igual al 90-100 % del nivel más alto estimado de exposición al atributo molecular que no esté asociado con eventos adversos y/o una inhibición de la eficacia en los sujetos.

4. Un método para desarrollar un procedimiento de fabricación para una terapia biológica, comprendiendo el método:

45 detectar un nivel de un atributo molecular de la terapia biológica en una formulación en uno o más puntos de tiempo en condiciones de almacenamiento;

determinar una tasa de cambio del atributo molecular en las condiciones de almacenamiento;

50 obtener datos sobre la seguridad y/o eficacia *in vivo* de la terapia biológica en sujetos que han recibido una administración de la terapia biológica;

55 estimar un nivel de exposición al atributo molecular recibido por los sujetos en el momento de dicha administración, basándose en (i) la tasa de cambio del atributo molecular durante el almacenamiento de la terapia biológica en la formulación, y (ii) una duración que la terapia biológica en la formulación estuvo bajo las condiciones de almacenamiento antes de dicha administración;

60 determinar la presencia o ausencia de una correlación entre el nivel estimado de exposición al atributo molecular y los datos de seguridad y/o eficacia de la terapia biológica; y

(a) si la correlación está ausente, establecer el procedimiento de fabricación para producir niveles del atributo molecular iguales o inferiores a un nivel permisible especificado basado en el nivel estimado de exposición al atributo molecular; o

65 (b) si la correlación está presente, establecer el procedimiento de fabricación para producir niveles del atributo molecular iguales o inferiores a un nivel máximo permisible especificado del atributo molecular en función del nivel

más alto del atributo molecular que no esté asociado con eventos adversos y/o inhibición de la eficacia de la terapia biológica, en el que un atributo molecular es una estructura química o físicamente modificada de la molécula que define sus propiedades fisicoquímicas.

5 **5.** Un método para evaluar un impacto clínico de un atributo molecular de una terapia biológica, comprendiendo el método:

detectar un nivel de un atributo molecular de la terapia biológica en una formulación en uno o más puntos de tiempo en condiciones de almacenamiento;

10 determinar una tasa de cambio del atributo molecular en las condiciones de almacenamiento;

obtener datos sobre la seguridad y/o eficacia in vivo de la terapia biológica en sujetos que han recibido una administración de la terapia biológica;

15 estimar un nivel de exposición al atributo molecular recibido por los sujetos en el momento de dicha administración, basándose en (i) la tasa de cambio del atributo molecular durante el almacenamiento de la terapia biológica en la formulación, y (ii) una duración que la terapia biológica en la formulación estuvo bajo las condiciones de almacenamiento antes de dicha administración;

20 determinar una presencia o ausencia de una correlación entre la exposición estimada al atributo molecular y la seguridad y/o eficacia de la terapia biológica; y

25 si (a) la correlación está ausente, determinar que el atributo molecular no afecta ni la seguridad clínica ni la eficacia de la terapia biológica; o

si (b) la correlación está presente, determinar que el atributo molecular afecta la seguridad y/o eficacia de la terapia biológica, en el que un atributo molecular es una estructura química o físicamente modificada de la molécula que define sus propiedades fisicoquímicas.

30 **6.** El método de la reivindicación 5, en el que si (a) la correlación está ausente, el método comprende además establecer una especificación para los niveles permisibles del atributo molecular de la terapia biológica, en el que los niveles permisibles del atributo molecular se basan en los niveles más altos estimados de exposición al atributo molecular recibidos por los sujetos, o

35 en el que (b) si la correlación está presente, el método comprende además establecer una especificación para los niveles máximos permisibles del atributo molecular de la terapia biológica, en el que dichos niveles máximos permisibles del atributo molecular se basan en niveles del atributo molecular asociado con eventos adversos y/o inhibición de la eficacia de la terapia biológica.

40 **7.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que

a) la estimación se basa además en (iii) una dosis de la terapia biológica en dicha administración, y (iv) una cantidad del atributo molecular medida en el momento de la fabricación y/o liberación del lote;

45 b) la estimación del nivel de exposición al atributo molecular comprende el cálculo:

$$A_t = \left\{ \%A_0 + \sum_{i=1}^n (\%A_{\Delta_i} \times t_i) \right\} \times D$$

50 en el que  $A_t$  es el nivel estimado de exposición al atributo molecular,  $\%A_0$  es el porcentaje del atributo molecular en el momento de la liberación del lote,  $\%A_{\Delta_i}$  es la tasa de cambio del porcentaje del nivel del atributo molecular a lo largo del tiempo en una condición de almacenamiento dada,  $t_i$  es el tiempo de almacenamiento en la condición dada, y  $D$  es la concentración de la dosis de administración; y/o

55 c) la estimación del nivel de exposición al atributo molecular comprende el cálculo:

$$\%A_{rel} = \frac{A_t}{D} \times 100\%$$

60 en el que  $\%A_{rel}$  es el porcentaje del nivel relativo de la exposición al atributo molecular con respecto a la dosis, y en el que  $A_t$  es el nivel de la exposición al atributo molecular calculado utilizando la ecuación 1 o 2, y en el que  $D$  es la concentración de la dosis en la dimensión del peso del ingrediente farmacéutico activo asociado con cada tratamiento.

**8.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que

- a) el nivel del atributo molecular de la terapia biológica en la formulación se detecta en dos o más puntos de tiempo en condiciones de almacenamiento; y/o
- 5 b) el atributo molecular comprende al menos uno de los siguientes: especies ácidas, especies básicas, especies de alto peso molecular, número de partículas subvisibles, bajo peso molecular, peso molecular medio, glicosilación (tal como cadena pesada no glicosilada o rica en manosa), cadena no pesada y cadena ligera, desamidación, desaminación, ciclación, oxidación, isomerización, fragmentación/recorte, variantes N-terminales y C-terminales, especies reducidas y parciales, estructura plegada, hidrofobia superficial, modificación química, enlace covalente, un
- 10 motivo de aminoácido C-terminal PARG, o un motivo de aminoácido C-terminal PAR-Amida.
- 9.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el uno o más puntos de tiempo o dos o más puntos de tiempo comprenden un momento de fabricación, y al menos dos puntos de tiempo posteriores.
- 15 **10.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que
- a) la correlación comprende una correlación ponderada entre la exposición a atributos y las apariciones de eventos adversos; y/o
- 20 b) determinar la presencia o ausencia de una correlación entre el nivel estimado de exposición al atributo molecular y los datos de seguridad y/o eficacia para la terapia biológica comprende la estimación bayesiana.
- 11.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que
- 25 a) la terapia biológica en la formulación estaba bajo las condiciones de almacenamiento durante diferentes duraciones en las administraciones a diferentes;
- b) la administración comprende dos o más eventos de administración, preferiblemente en el que el nivel estimado de exposición al atributo molecular recibido por los sujetos en el momento de dicha administración es un máximo o un
- 30 promedio de los dos o más eventos de administración; y/o
- c) dicha administración comprende una infusión continua, y dicha estimación comprende calcular un nivel estimado de exposición al atributo molecular durante dos o más intervalos de dicha infusión continua, tales como intervalos de
- 35 24 horas.
- 12.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que
- a) dichos datos de seguridad comprenden datos sobre eventos adversos, preferiblemente en el que los datos de seguridad comprenden una evolución temporal de los eventos adversos; y/o
- 40 b) dichos datos de eficacia comprenden datos de criterios de valoración clínicos.
- 13.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la terapia biológica se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, un producto de proteína de anticuerpo, una molécula activadora de células T biespecíficas (BiTE<sup>®</sup>), un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo trispecífico, una proteína de fusión Fc, una proteína recombinante, un virus recombinante, una célula T recombinante, un péptido sintético, y un fragmento activo de una proteína recombinante.
- 45 **14.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la formulación es una formulación farmacéuticamente aceptable.
- 50 **15.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que detectar el nivel de un atributo molecular de la terapia biológica comprende espectrometría de masas, cromatografía, electroforesis, espectroscopia, oscurecimiento de la luz, un método de partículas (tal como masa resonante de tamaño de nanopartícula/visible/micrométrico o un movimiento browniano), centrifugación analítica, imagenología o caracterización por imagenología, o inmunoensayo.
- 55

FIG. 1A

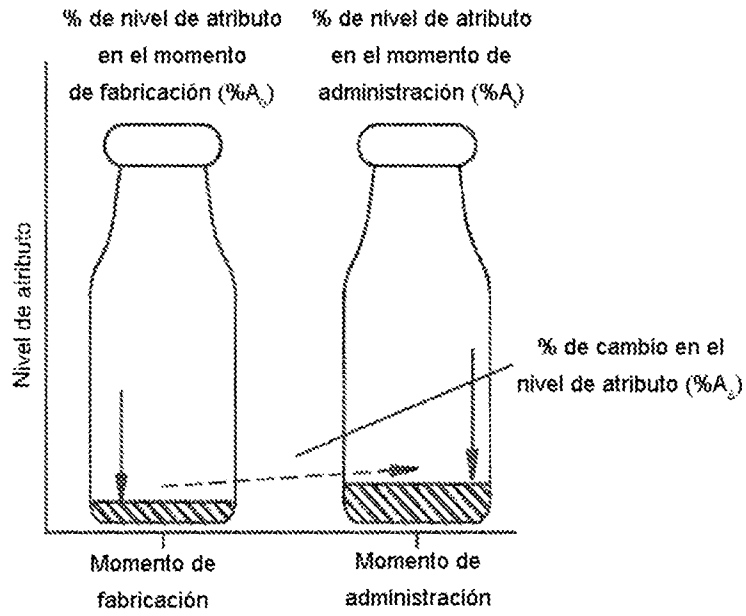


FIG. 1B

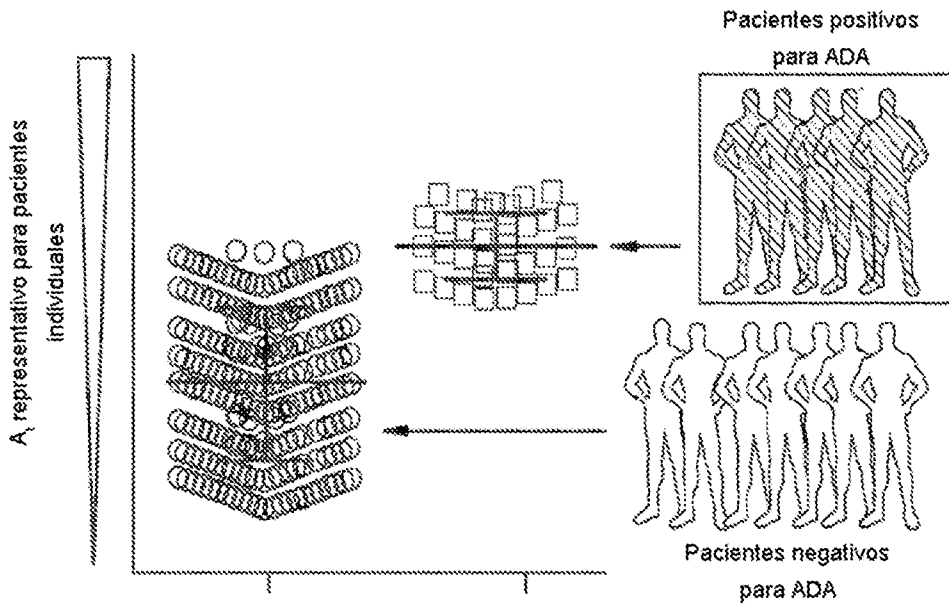


FIG. 1C

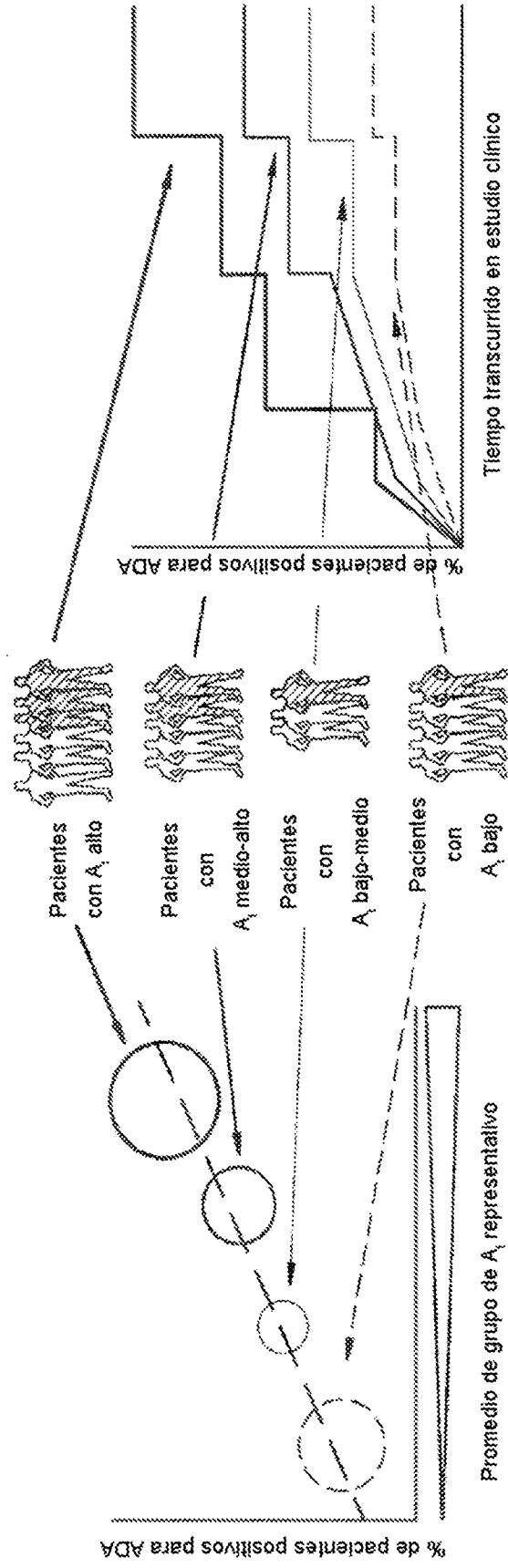


FIG. 2A

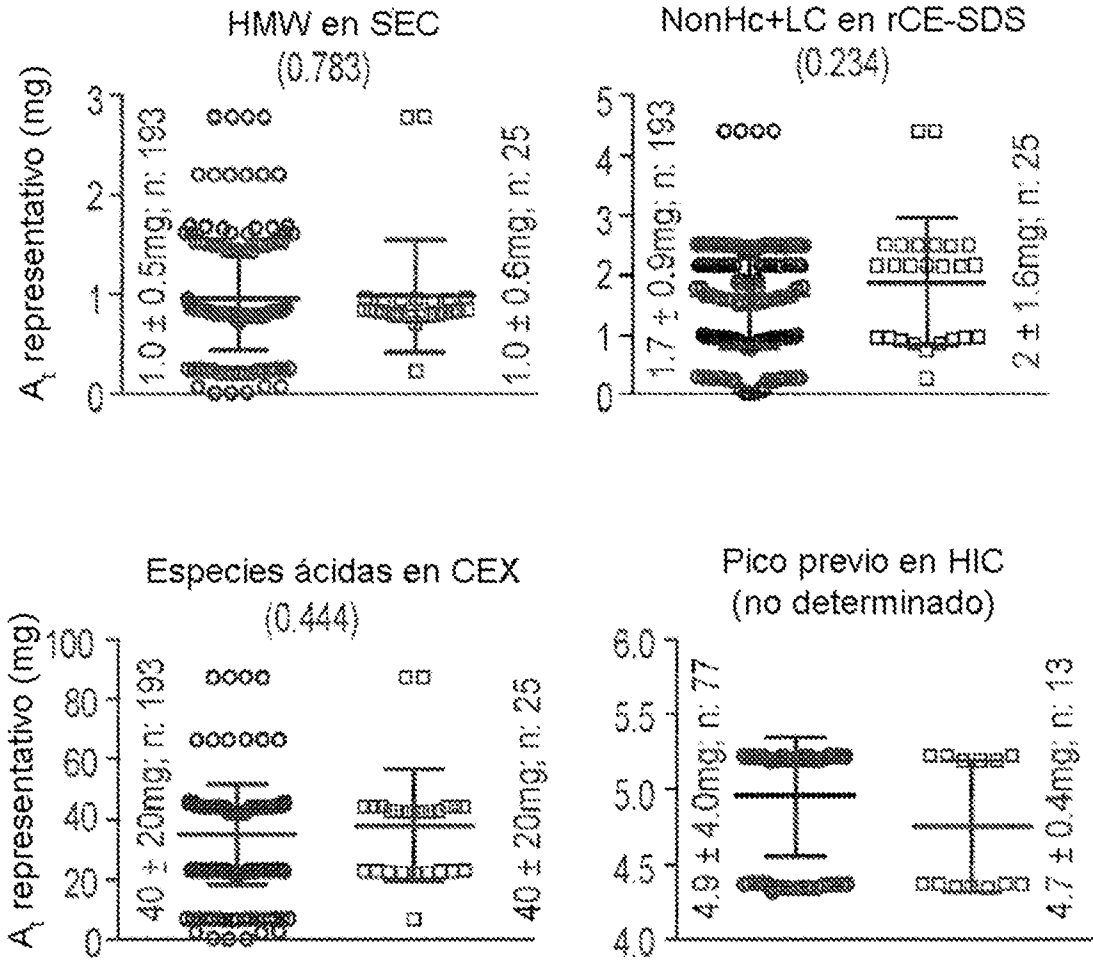


FIG. 2B

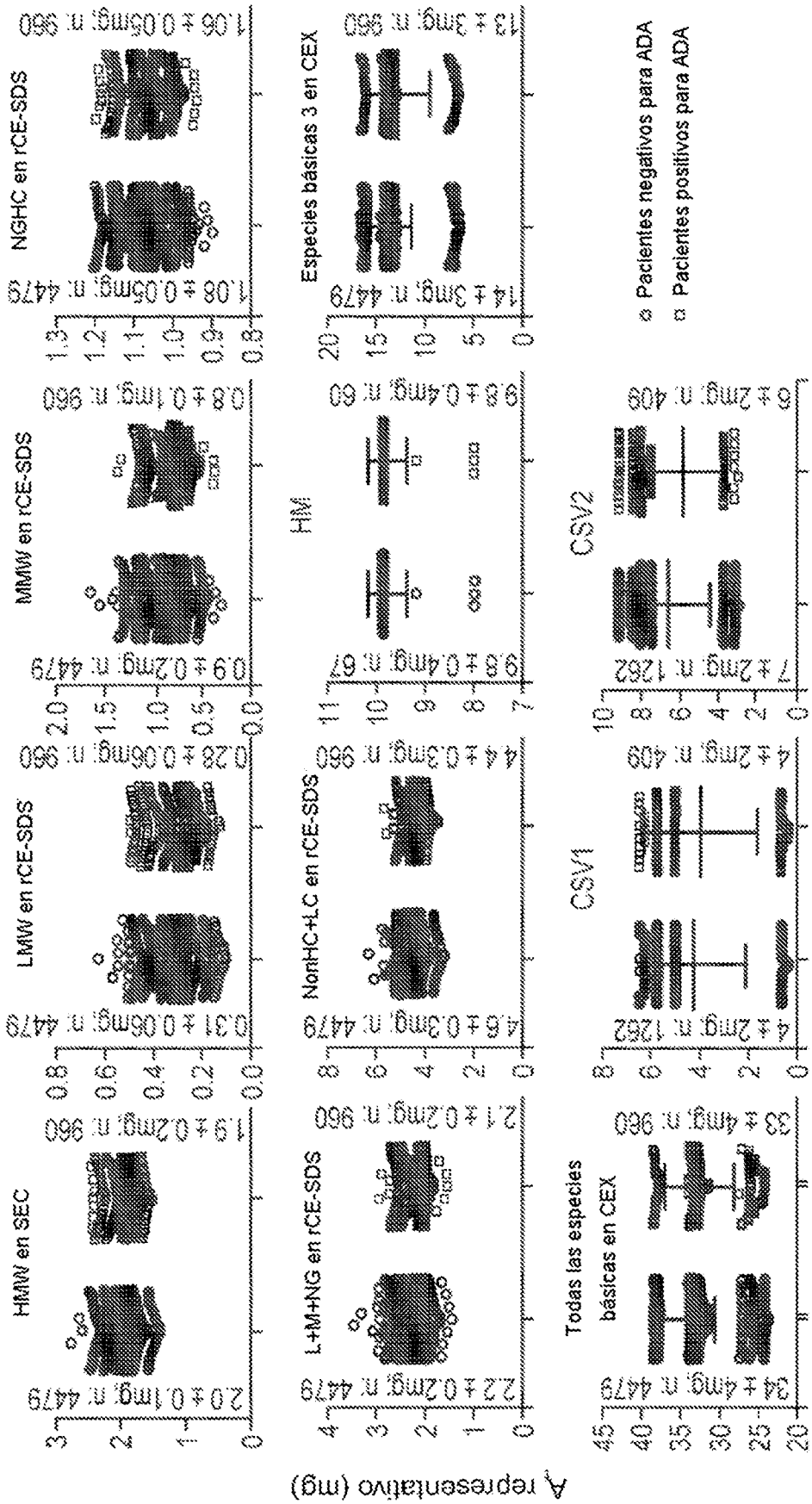


FIG. 3A

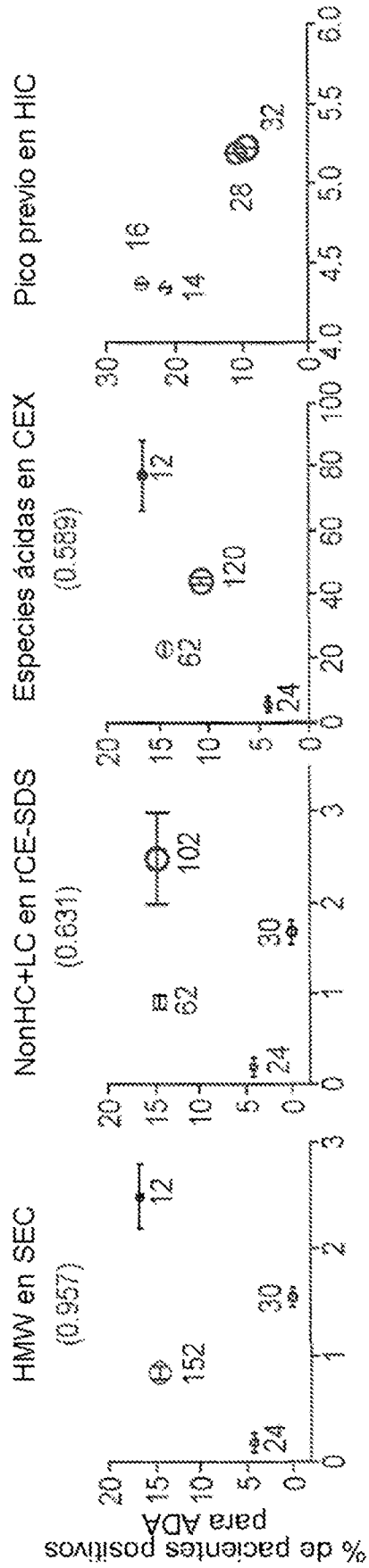
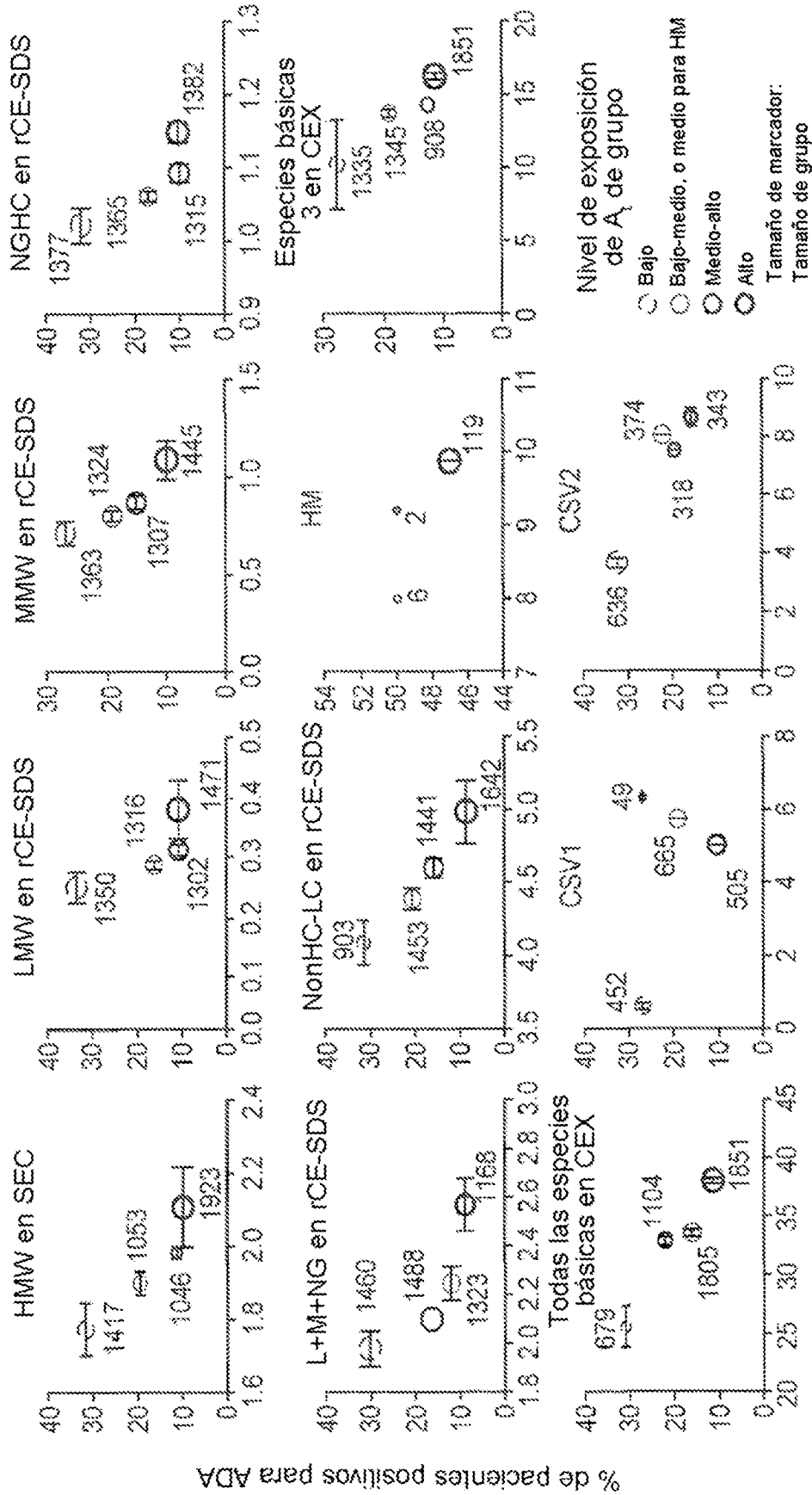


FIG. 3B



Exposición de atributo promedio de grupo (mg)

FIG. 4A

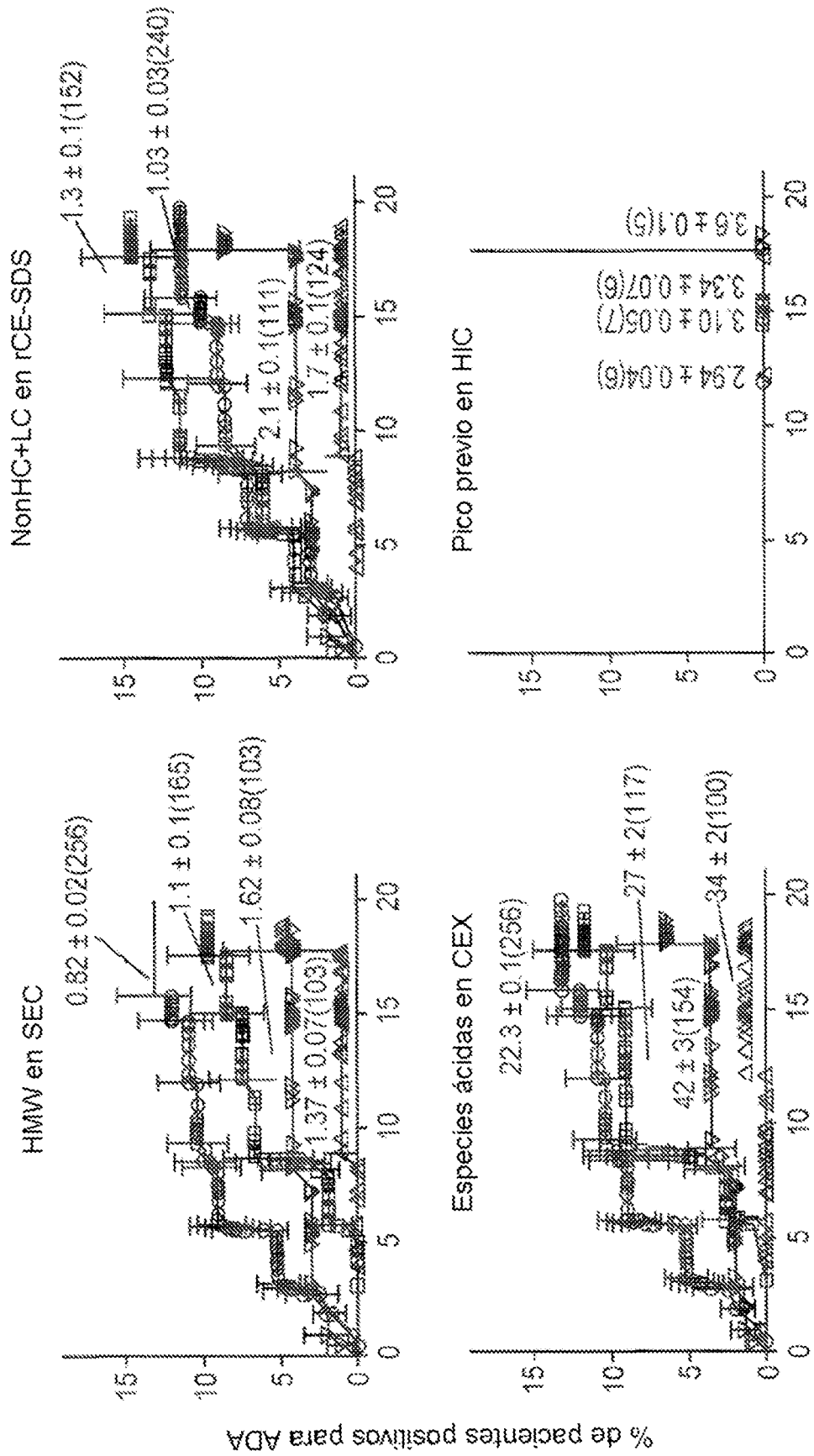
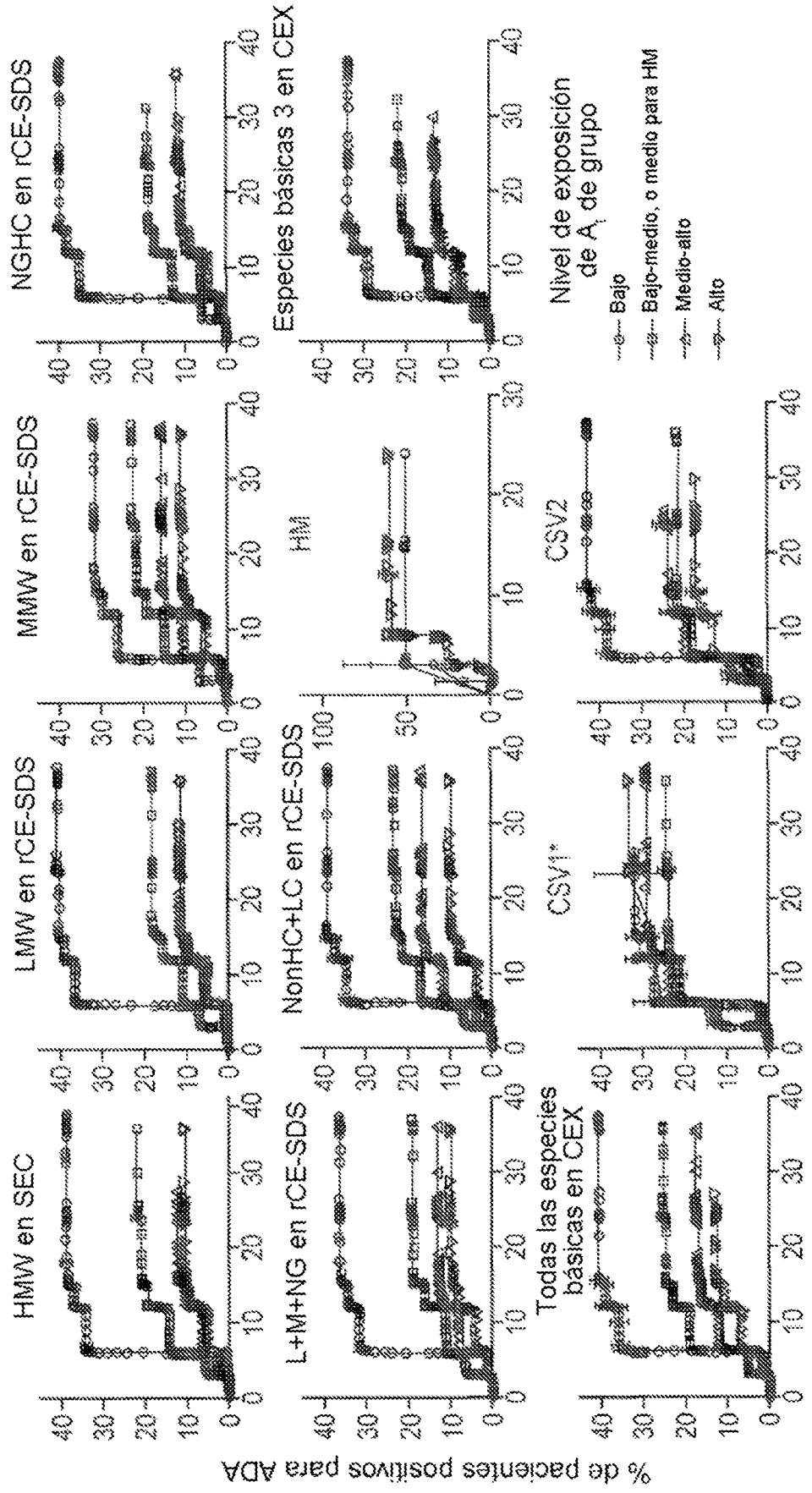


FIG. 4B



Tiempo transcurrido en estudio clínico (mes)



FIG. 5C

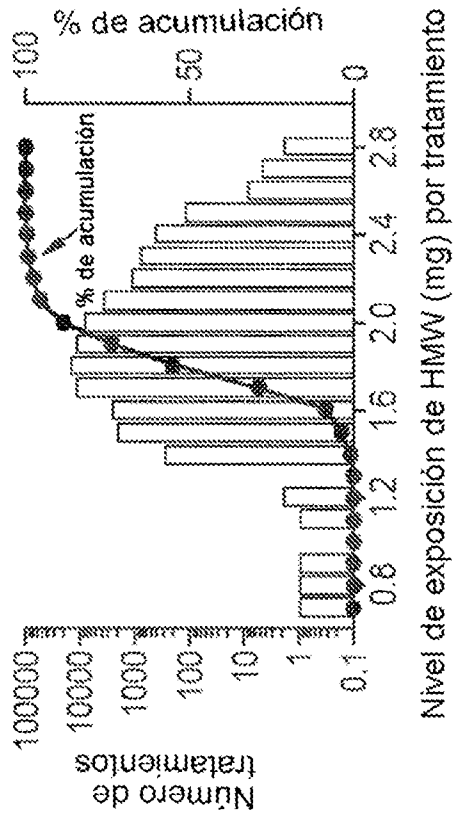


FIG. 5B

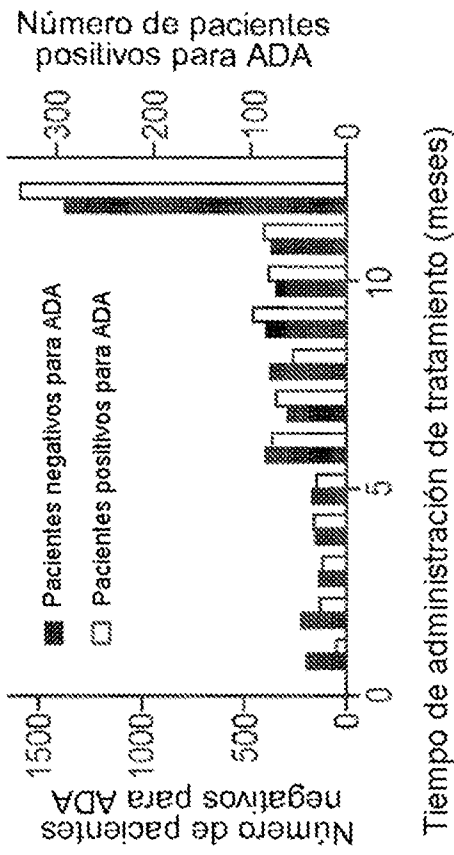


FIG. 6

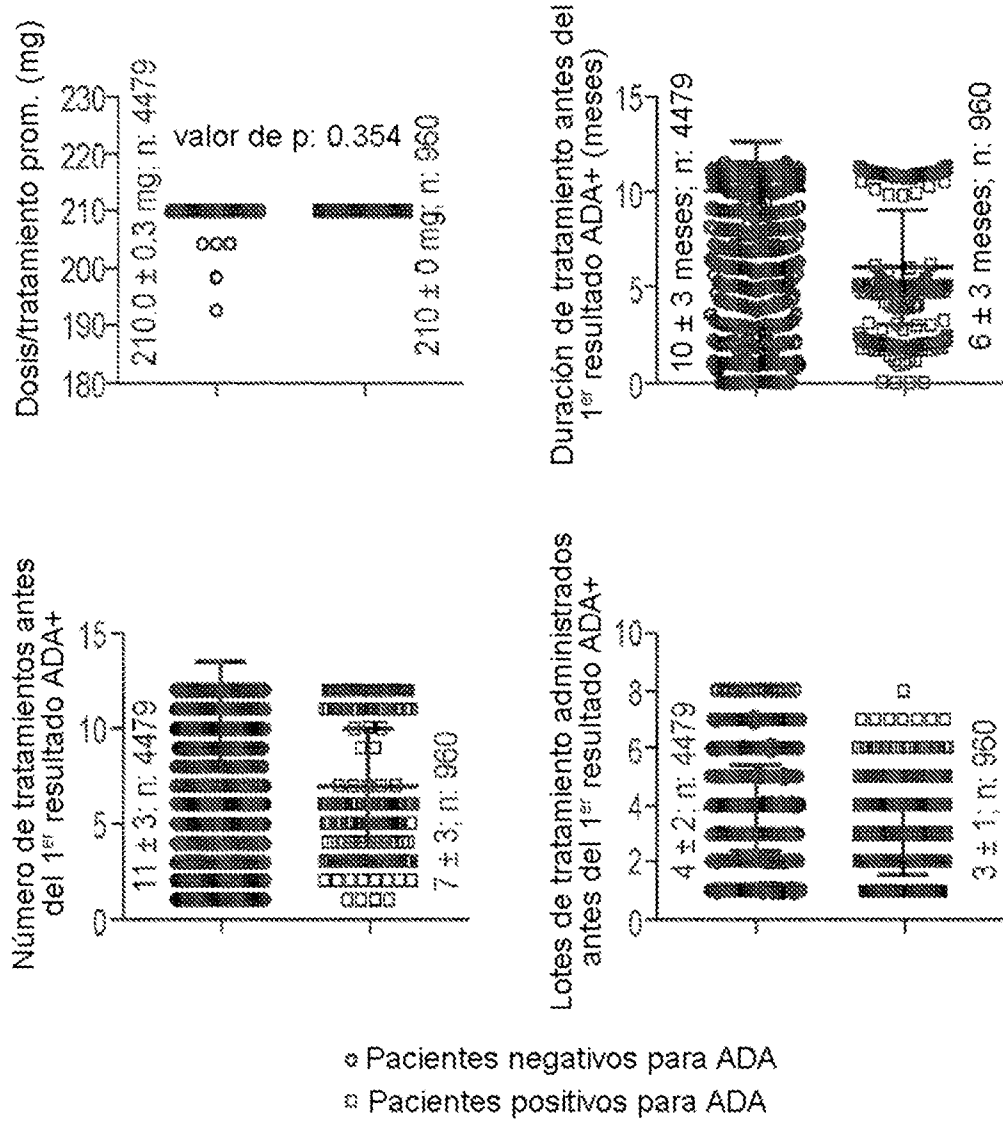


FIG. 7A

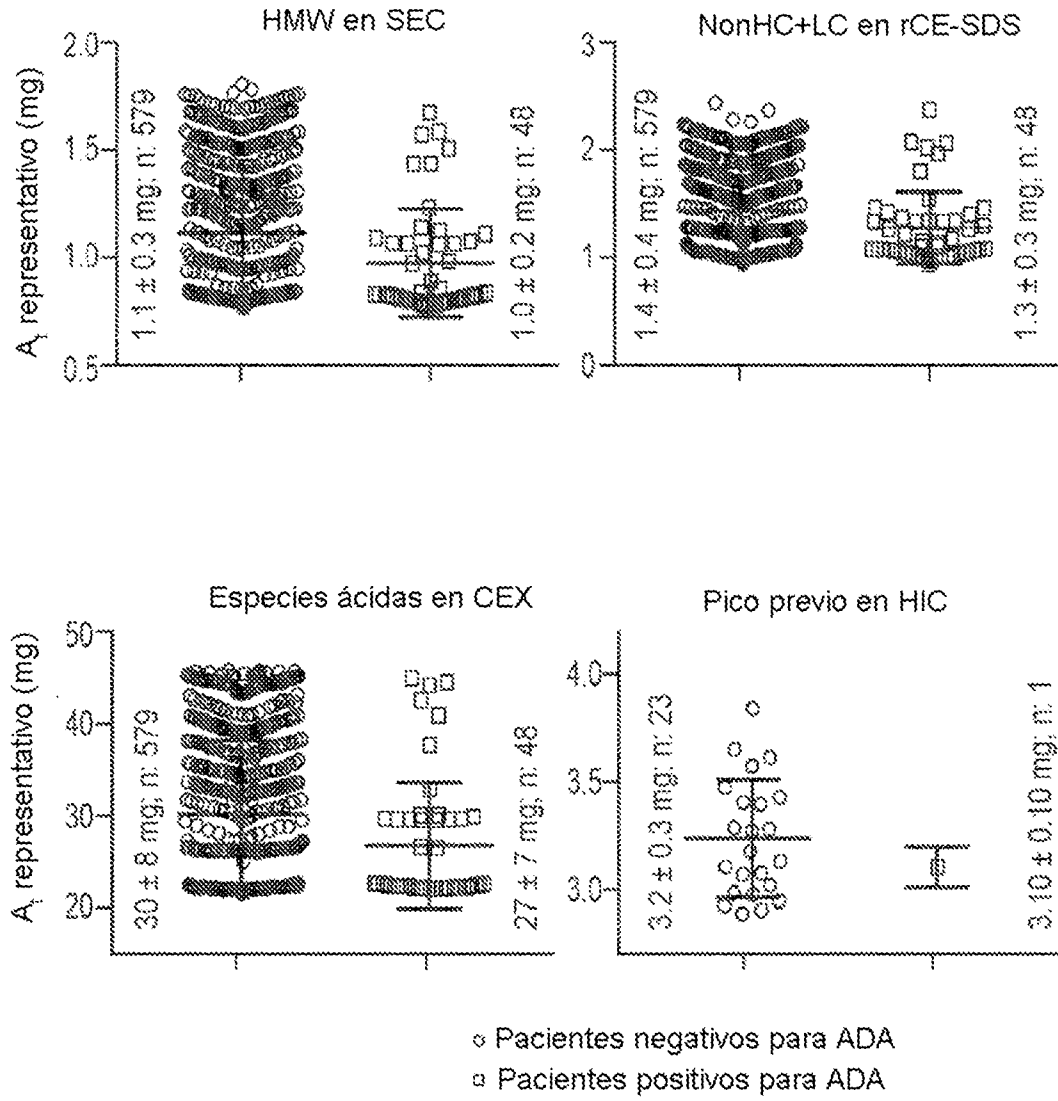


FIG. 7B

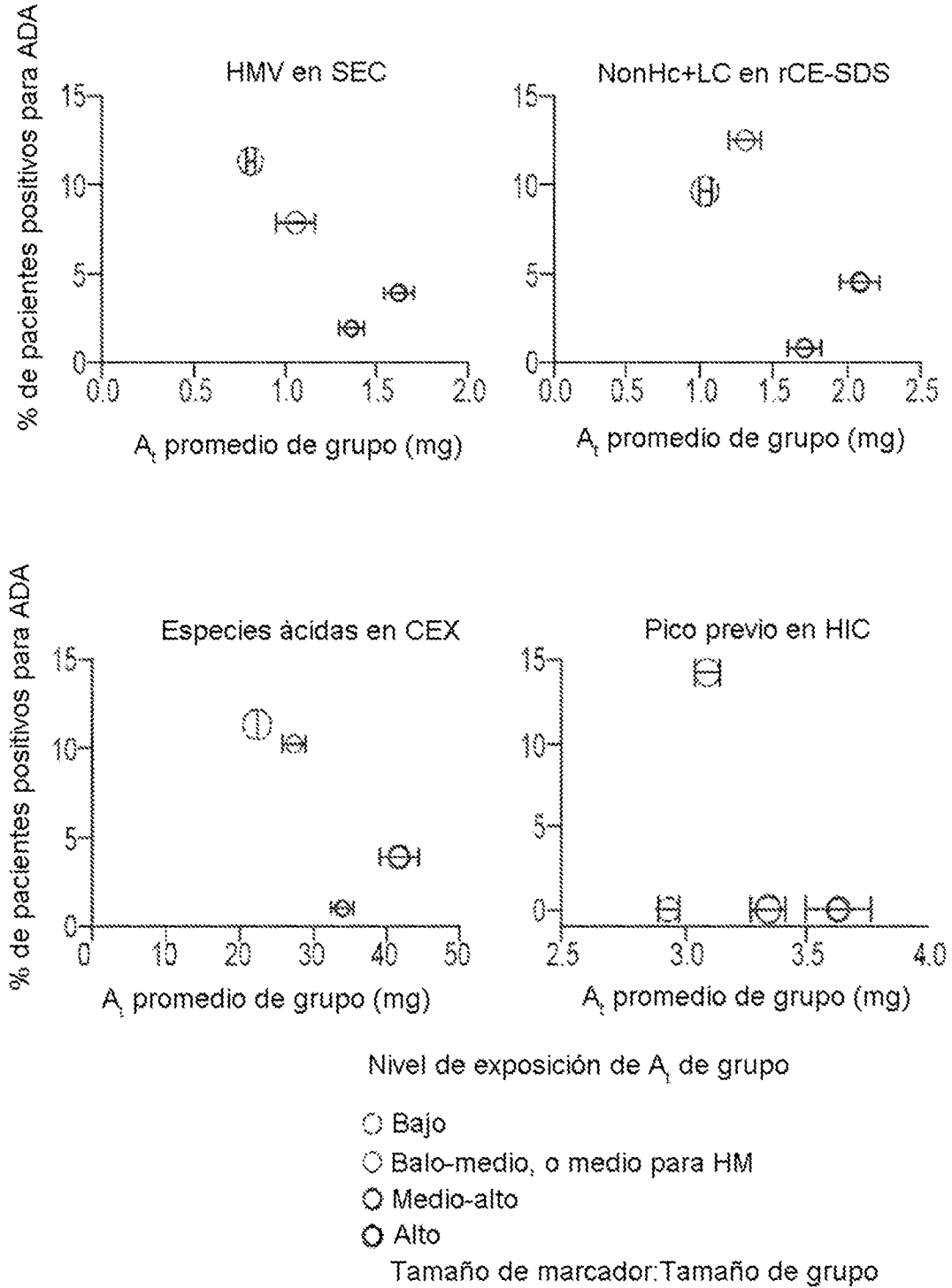


FIG. 8

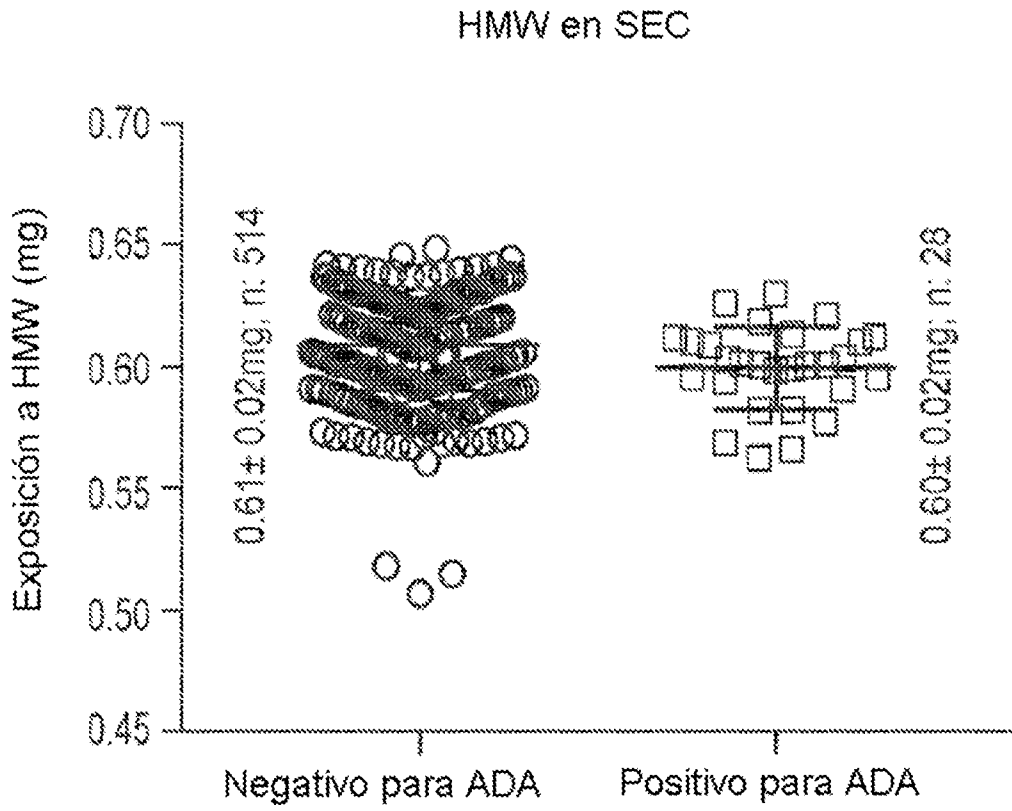
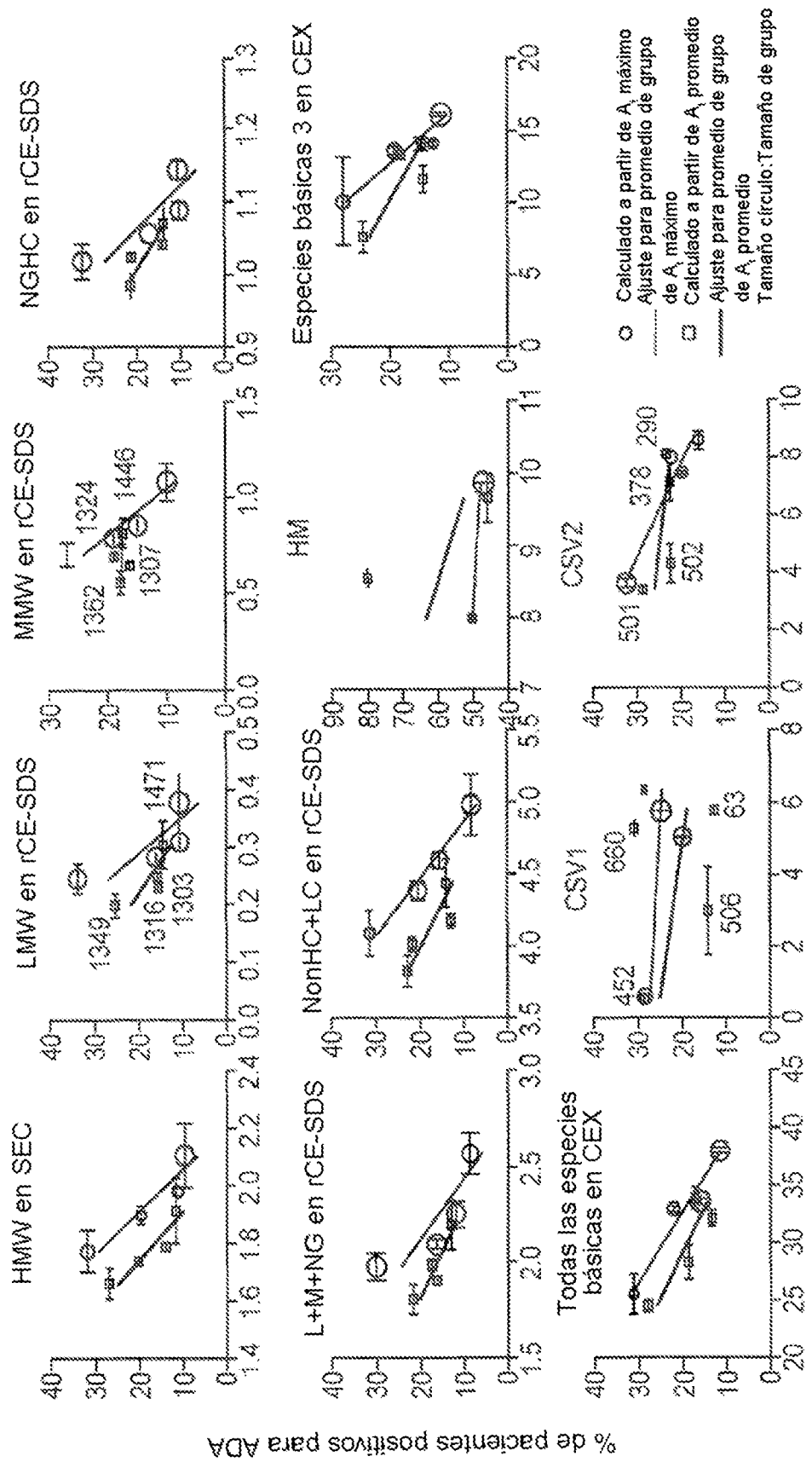


FIG. 9



Exposición de atributo promedio de grupo (mg)

FIG. 10A

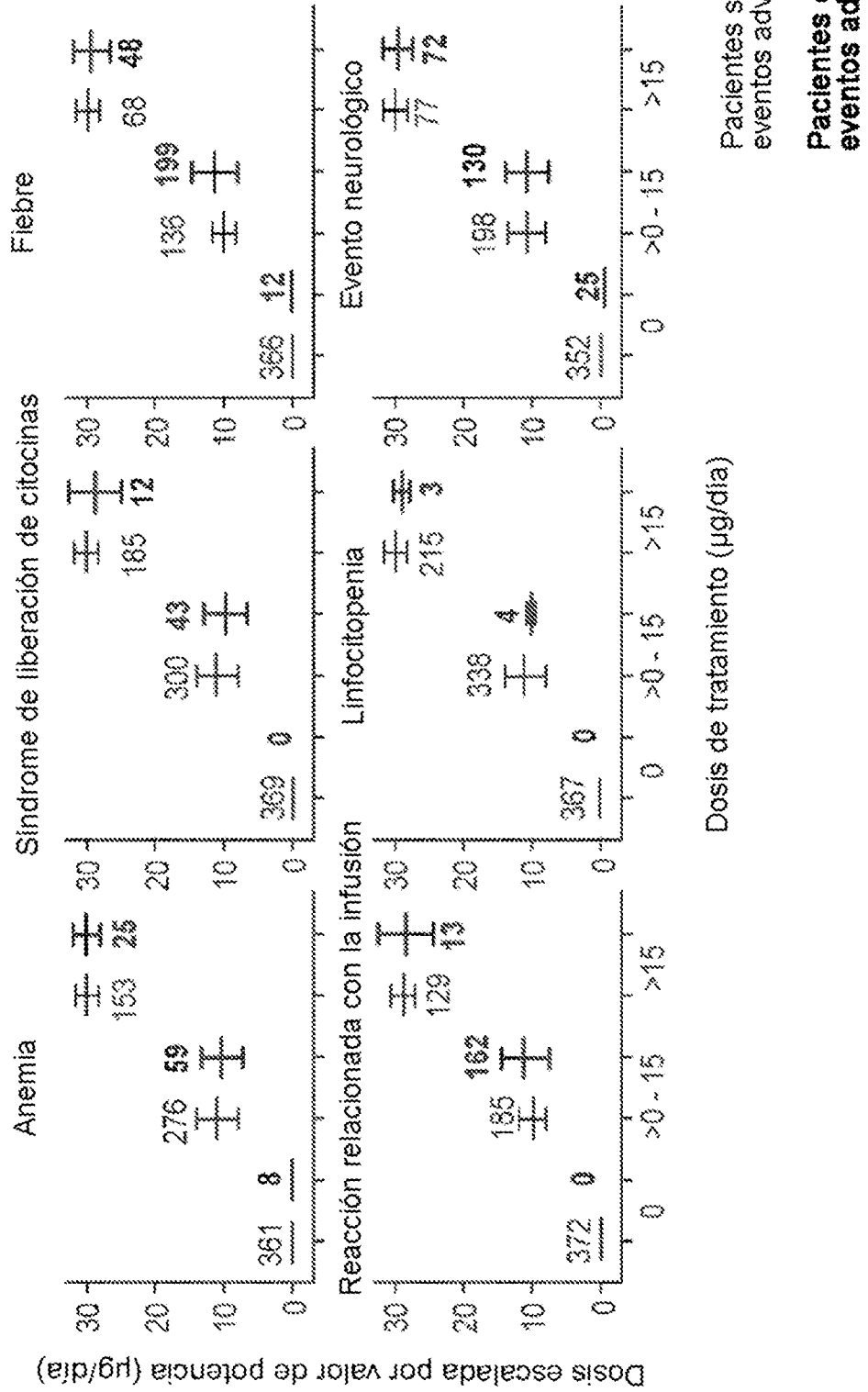
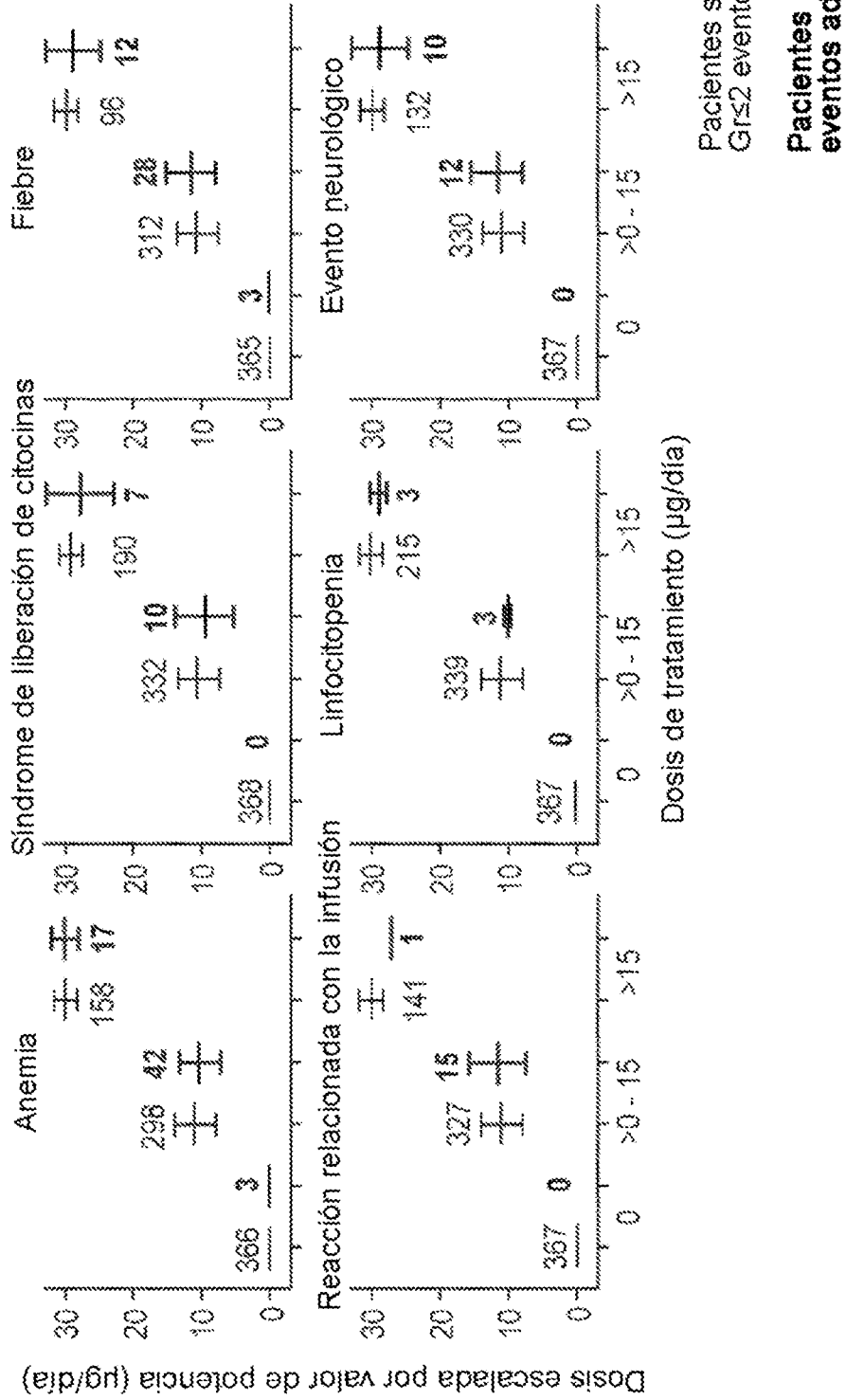
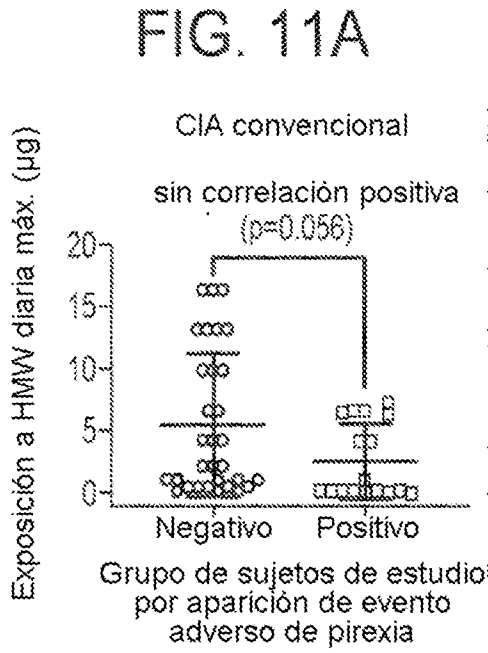


FIG. 10B

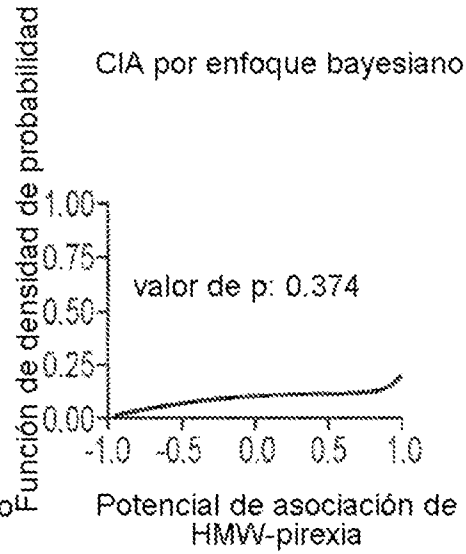


Conjunto de datos de CIA existentes que no muestra correlación entre HMW y pirexia

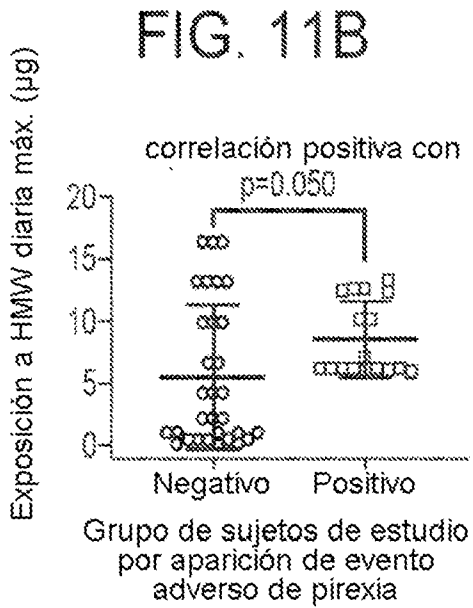


**FIG. 11C**

CIA por enfoque bayesiano



Conjunto de datos de CIA arbitrarios modelado para mostrar una correlación entre HMW y pirexia



**FIG. 11D**

Función de densidad de probabilidad

valor de  $p$ :  $1.06 \times 10^{-3}$

Potencial de asociación de HMW-pirexia