

Universidad de Granada



**Estudios de estabilidad de anticuerpos monoclonales terapéuticos:
evaluación de la formación de agregados mediante cromatografía
líquida analítica de exclusión por tamaños y de sus efectos biológicos
mediante ELISA y ensayos en cultivos celulares**

Departamento de Química Analítica (Facultad de Ciencias) y
Departamento de Anatomía y Embriología Humana (Facultad de
Medicina)

Programa de Doctorado en Biomedicina

Junio 2019

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: José Hernández Jiménez
ISBN: 978-84-1306-301-0
URI: <http://hdl.handle.net/10481/56865>

*El misterio es la cosa más bonita que podemos experimentar. Es la
fuente de todo arte y ciencia verdaderos*

(Albert Einstein)

Agradecimientos

Agradecimientos:

Como dice el dicho: *“Siempre es de bien nacidos el ser bien agradecidos”*, no podían faltar los agradecimientos de este largo camino que es la etapa previa al doctorado. Como si de un vehículo de tracción trasera se tratase, muchos habéis sido los que habéis hecho de motor de empuje en momentos difíciles para poder cumplir los objetivos. Por eso, como si de un árbol se tratase, he aquí mis agradecimientos.

Un árbol empieza por las raíces. En este caso, las raíces empiezan por mi familia, mi hogar, donde me he criado y donde he visto que, a través de la constancia y desde el esfuerzo, se consiguen alcanzar y cumplir las metas que se imponga cada uno. Ya desde pequeño, soñaba con ser un científico, y era raro el año que no me ponía una bata, o me ponía a investigar cualquier cosa desde el prisma del juego.

Junto a las raíces, continúa con el tronco. Aquí hay que mencionar a un profesor de secundaria (Pedro), que en las clases de optativa que trataban sobre una introducción muy básica de actividades vinculadas con el laboratorio fue el primero que me arrojó luz sobre la carrera de bioquímica. Por aquella época, tenía claro que quería ser científico. ¿Pero de qué? Tanto la química como la biología me gustaban, y fue él quien me enseñó esa posibilidad.

Junto con el tronco, nos encontramos con las hojas, repartidas en distintas ramas. Aquí nos encontramos con un pasado muy reciente y un presente que van haciendo que las hojas vayan creciendo y apareciendo flores. Entre estas distintas ramas, tengo que agradecer a todos mis

Agradecimientos

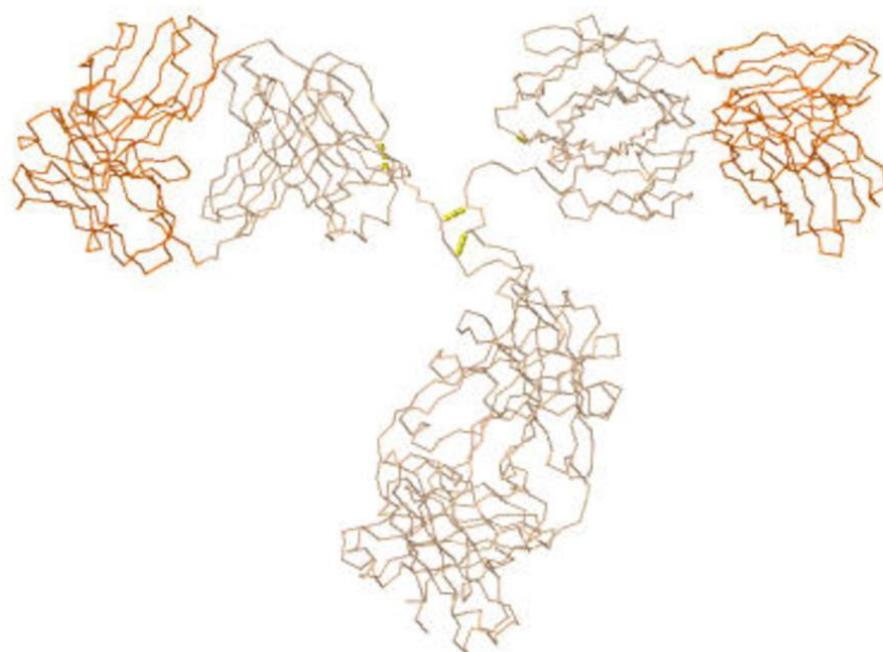
compañeros y amigos de carrera que me he ido encontrando por el camino, desde que empecé biología (hay que recordar que antes de la aparición de los grados, para ser Ldo. en bioquímica podías acceder al primer ciclo de una carrera y luego solicitar el cambio al segundo ciclo, ya que no existía el primer ciclo de esta carrera como tal) hasta que llegamos al segundo ciclo de bioquímica, donde nos encontramos un grupo muy multidisciplinar: biólogos, químicos, farmacéuticos... Fue la primera vez que me encontré en un ambiente multidisciplinar. Y en esa época, fue cuando empecé a introducirme en el mundo de la investigación. Desde aquí, agradecer a todos los miembros de los dos grupos de investigación (FQM-118 y CTS-107) y a mis Directores de Tesis (Natalia y Jose Carlos) y Tutora de Tesis (Celia) con los cuales he aprendido mucho, y han aguantado mis días de estrés, junto con mi familia, en el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Dentro de esas ramas, hay una especial mención a la música, mi otra vertiente. Empecé a los 9 años a asistir al Conservatorio, donde Emilio Romero fue el primero que me enseñó a tocar la guitarra, que se convirtió en mi especialidad como instrumentista. En el Grado Medio (actualmente Grado Profesional), me recibió Luis Vidueira que, curiosidades de la vida, empezó también a estudiar biología. Gracias a ellos, me introdujeron un “veneno” musical que se ha desarrollado hasta la actualidad, donde formo parte del Coro de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, con los que he disfrutado un montón en todos los aspectos, y, como si de otra familia se trataran, me han ayudado mucho consiguiendo que disfrutara de otra forma este camino.

Agradecimientos

Siguiendo con el símil, en una planta como cualquier ser vivo la fuente de alimentación es muy importante. De esta forma, agradezco a la fuente de financiación de esta Tesis Doctoral, la cual ha sido posible gracias a dos proyectos financiados por el Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades; Fondos de Investigación en Salud, FIS PI010-00201 y FIS PI17-00547), así como la cesión de todas las muestras analizadas por parte de la Unidad de Farmacia Hospitalaria del Hospital Clínico Universitario San Cecilio de Granada (conociendo todas sus instalaciones donde he conocido a un gran grupo de trabajadores profesionales y con un alto valor humano) y a toda su gente (laboratorio de análisis clínicos, técnicos y celadores), a los cuales también considero como miembros de mi familia.

Por todo esto, simplemente, muchas gracias a todos, que habéis puesto vuestro tiempo y dedicación, para que este árbol crezca y, en un futuro, las flores que se están formando proporcionen fruto.



Índice

Índice

ACRÓNIMOS	27
------------------------	-----------

OBJETIVOS	35
------------------------	-----------

INTRODUCCIÓN

1. MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS	45
--	-----------

1.1. DEFINICIÓN	45
-----------------------	----

1.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS. DIFERENCIAS CON LOS MEDICAMENTOS DE SÍNTESIS QUÍMICA.	47
--	----

1.3. MARCO LEGAL: LA REGULACIÓN DE LOS MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS.....	53
--	----

2. ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	54
---	-----------

2.1. DEFINICIÓN	55
-----------------------	----

2.2. ESTRUCTURA.....	56
----------------------	----

2.3. NOMENCLATURA.....	59
------------------------	----

2.4. OBTENCIÓN.....	60
---------------------	----

2.4.1. <i>Tecnologías para la producción de anticuerpos monoclonales terapéuticos</i>	61
---	----

2.4.1.1 <i>Generación de hibridomas</i>	61
---	----

2.5. MECANISMO DE ACCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES TERAPÉUTICOS	64
---	----

3. DESCRIPCIÓN DE LOS FBIOs ESTUDIADOS.....	66
--	-----------

3.1. BEVACIZUMAB	67
------------------------	----

3.1.1. <i>Procedimiento de obtención y características</i>	67
--	----

3.1.2. <i>Mecanismo de acción</i>	67
---	----

3.1.3. <i>Aplicaciones</i>	68
----------------------------------	----

Índice

3.1.4.	<i>Efectos adversos</i>	70
3.1.5.	<i>Forma farmacéutica, composición y excipientes</i>	70
3.2.	CETUXIMAB	70
3.2.1.	<i>Procedimiento de obtención y características</i>	71
3.2.2.	<i>Mecanismo de acción</i>	72
3.2.3.	<i>Aplicaciones</i>	73
3.2.4.	<i>Efectos adversos</i>	80
3.2.5.	<i>Forma farmacéutica, composición y excipientes</i>	82
3.3.	INFLIXIMAB	82
3.3.1.	<i>Procedimiento de obtención y características</i>	82
3.3.2.	<i>Mecanismo de acción</i>	83
3.3.3.	<i>Aplicaciones</i>	84
3.3.4.	<i>Efectos adversos</i>	85
3.3.5.	<i>Forma farmacéutica, composición y excipientes</i>	86
3.4.	RITUXIMAB	87
3.4.1.	<i>Procedimiento de obtención y características</i>	87
3.4.2.	<i>Mecanismo de acción</i>	87
3.4.3.	<i>Aplicaciones</i>	88
3.4.4.	<i>Efectos adversos</i>	89
3.4.5.	<i>Forma farmacéutica, composición y excipientes</i>	90
3.5.	TRASTUZUMAB.....	91
3.5.1.	<i>Procedimiento de obtención y características</i>	91
3.5.2.	<i>Mecanismo de acción</i>	92
3.5.3.	<i>Aplicaciones</i>	93
3.5.4.	<i>Efectos adversos</i>	97
3.5.5.	<i>Forma farmacéutica, composición y excipientes</i>	98
4.	AGREGACIÓN EN PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS	98

Índice

4.1. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD EN MEDICAMENTOS DE USO HUMANO. REQUERIMIENTOS OFICIALES. GUÍAS ICHs.	104
4.2. PERFIL INDICADOR DE ESTABILIDAD.....	109
4.3. TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DEL PERFIL DE AGREGACIÓN.....	111
4.4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN EN EL ANÁLISIS DE mAbs DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑOS.....	114
4.5. OTROS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE MABS TERAPÉUTICOS.....	119
5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES TERAPÉUTICOS	120
5.1. INMUNOENSAYOS. ELISA.....	121
5.2. CULTIVOS CELULARES	124
6. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE ANTICUERPOS MONOCLONALES TERAPÉUTICOS EN CONDICIONES DE USO HOSPITALARIO.....	129
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134

CAPÍTULO I: METODOLOGÍA EMPLEADA

1. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN	165
1.1. REACTIVOS: PRODUCTOS QUÍMICOS, PROTEÍNAS Y SUS DISOLUCIONES	165
1.1.1. <i>Productos químicos</i>	165
1.1.2. <i>Proteínas</i>	167
1.1.3. <i>Disoluciones empleadas</i>	170
1.2. ANTICUERPOS MONOCLONALES ESTUDIADOS	174

Índice

1.2.1.	<i>Bevacizumab (BVZ)</i>	175
1.2.2.	<i>Cetuximab (CTX)</i>	175
1.2.3.	<i>Infliximab (IFX)</i>	176
1.2.4.	<i>Rituximab (RTX)</i>	176
1.2.5.	<i>Trastuzumab (TTZ)</i>	177
1.2.6.	<i>Disoluciones estudas</i>	177
1.3.	INSTRUMENTOS Y EQUIPOS.....	178
1.3.1.	<i>Equipos de medida</i>	178
1.3.2.	<i>Instrumentos de medida</i>	181
1.3.3.	<i>Instrumentos de laboratorio</i>	182
1.4.	MATERIAL DE LABORATORIO	185
1.5.	SOFTWARES EMPLEADOS.....	188
2.	ENSAYOS DE DEGRADACIÓN ACELERADA DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	189
2.1.	ESTUDIO DE AGREGADOS	191
3.	METODOLOGÍA ANALÍTICA Y BIOLÓGICA EMPLEADA	191
3.1.	MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN DE EXCLUSION POR TAMAÑO CON DETECCION ULTRAVIOLETA MEDIANTE DETECTOR DE DIODOS EN FILA (SE)HPLC-DAD).....	192
3.2.	MÉTODOS ELISA	193
3.3.	MÉTODO DE DICROISMO CIRCULAR.....	195
3.4.	MÉTODOS BIOLÓGICOS BASADOS EN CULTIVOS CELULARES.....	196
3.4.1.	<i>Líneas celulares</i>	196
3.4.2.	<i>Condiciones del cultivo</i>	196
3.4.3.	<i>Mantenimiento de las líneas celulares</i>	197
3.4.4.	<i>Ensayo de proliferación celular</i>	198

Índice

4. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD EN EL TIEMPO.....	200
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	202

CAPÍTULO II: EFECTOS DE LA DEGRADACIÓN ACELERADA POR LUZ EN LA AGREGACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES TERAPÉUTICOS COMERCIALES

1. RESUMEN.....	209
2. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO HPLC	211
2.1. CALIBRACIÓN DE LA COLUMNA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO	212
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	213
3.1. PERFIL DE AGREGACIÓN DE LOS MEDICAMENTOS ..	213
3.2. ESTRÉS POR LUZ.....	215
3.2.1. Bevacizumab	216
3.2.2. Cetuximab	221
3.2.3. Infliximab.....	225
3.2.4. Rituximab.....	227
3.2.5. Trastuzumab	230
3.3. ANÁLISIS COMPARATIVO	233
4. CONCLUSIONES.....	237
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	241

CAPÍTULO III: ESTUDIOS DE LA AGREGACIÓN EN ANTICUERPOS MONOCLONALES SOMETIDOS A PRUEBAS DE ESTRÉS ACELERADO

1. RESUMEN.....	247
------------------------	------------

Índice

2. ANÁLISIS MEDIANTE (SE)HPLC-DAD	248
2.1. CALIBRACIÓN DE LA COLUMNA ANALÍTICA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑOS.....	248
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	250
3.1. PERFIL DE AGREGACIÓN SEC DE LOS MABS TERAPÉUTICOS NO DEGRADADOS: PERFILES DE CONTROL.....	250
3.1.1. <i>Perfiles de agregación SEC control de IFX.....</i>	<i>252</i>
3.1.2. <i>Perfiles de agregación SEC de control de RTX.....</i>	<i>253</i>
3.1.3. <i>Perfiles de agregación SEC de control de BVZ, CTX y TTZ</i>	<i>254</i>
3.2. PERFIL DE AGREGACIÓN SEC DE LOS MABS TERAPÉUTICOS SOMETIDOS A DEGRADACIÓN FORZADA.....	255
3.2.1. <i>Perfiles de agregación SEC de IFX. Degradación forzada</i>	<i>255</i>
3.2.2. <i>Perfiles de agregación SEC de RTX. Degradación forzada</i>	<i>257</i>
3.2.3. <i>Perfiles de agregación SEC de BVZ. Degradación forzada</i>	<i>259</i>
3.2.4. <i>Perfiles de agregación SEC de CTX. Degradación forzada</i>	<i>261</i>
3.2.5. <i>Perfiles de agregación SEC de TTZ. Degradación forzada</i>	<i>262</i>
4. CONCLUSIONES.....	268
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	271

Índice

CAPÍTULO IV: ESTUDIO DE LA AGREGACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES TERAPÉUTICOS COMERCIALES EN ESTUDIOS DE ESTABILIDAD EN EL TIEMPO

1. RESUMEN.....	277
2. ANÁLISIS MEDIANTE (SE)HPLC-DAD	278
3. RESULTADOS Y DISCUSSION	279
3.1. ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DE IFX: MEDICAMENTO (REMICADE®) Y DILUCIONES DE USO CLÍNICO	279
3.2. ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DE RTX: MEDICAMENTO (MABTHERA®) Y DILUCIONES DE USO CLÍNICO	283
3.3. ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DE BVZ: MEDICAMENTO (AVASTIN®)	286
3.4. ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DE CTX: MEDICAMENTO (ERBITUX®).....	287
3.5. ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DE TTZ: MEDICAMENTO (HERCEPTIN®).....	290
4. CONCLUSIONES.....	292
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	294

CAPÍTULO V: ESTUDIO DE ESTABILIDAD FUNCIONAL EN EL TIEMPO DE CETUXIMAB (ERBITUX®)

1. RESUMEN.....	299
2. ESTUDIO CONFORMACIONAL DE CTX MEDIANTE ESPECTROSCOPÍA DE DICROISMO CIRCULAR LEJANO	300
2.1. CARACTERÍSTICAS CONFORMACIONALES	300

Índice

2.2. ESTABILIDAD TÉRMICA	302
3. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA.....	310
3.1. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA EN EL TIEMPO MEDIANTE CULTIVOS CELULARES	311
3.2. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA EN EL TIEMPO MEDIANTE ELISA	315
4. CONCLUSIONES.....	318
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	321

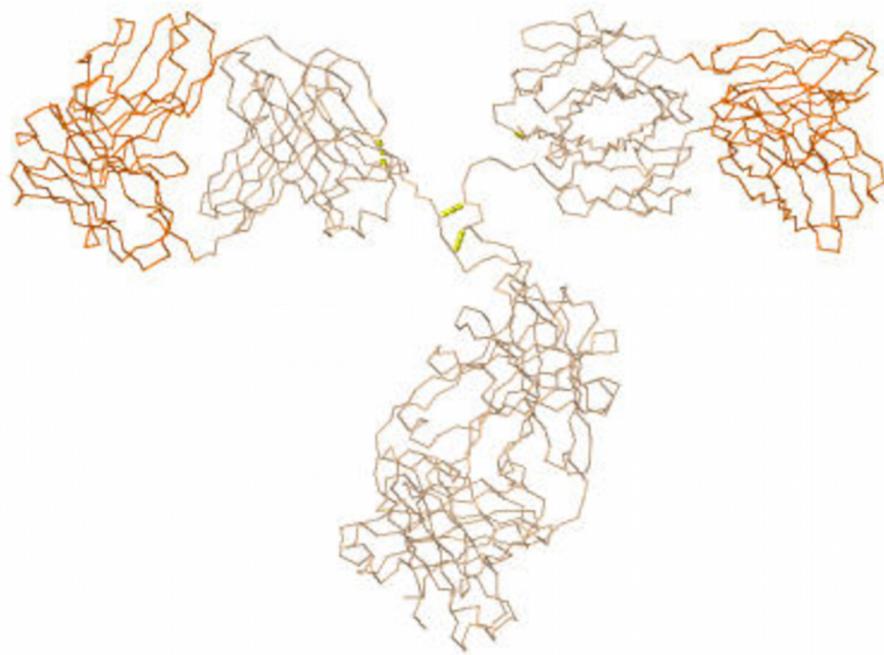
CAPÍTULO VI: ESTUDIO DE ESTABILIDAD FUNCIONAL EN EL TIEMPO DE TRASTUZUMAB (HERCEPTIN®)

1. RESUMEN.....	327
2. ESTUDIO CONFORMACIONAL DE TTZ MEDIANTE ESPECTROSCOPÍA DE DICROISMO CIRCULAR LEJANO....	329
2.1 CARACTERÍSTICAS CONFORMACIONALES	329
2.2. ESTABILIDAD TERMICA.	331
3. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA.....	338
3.1. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA EN EL TIEMPO MEDIANTE CULTIVOS CELULARES	339
3.2. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA EN EL TIEMPO MEDIANTE ELISA	342
4. CONCLUSIONES.....	345
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	348

Índice

CONCLUSIONES

1. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS	353
2. CONCLUSIONES GENERALES	362



Acrónimos

Acrónimos

5-FU	5-fluorouracilo
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
µg	Microgramo
µm	Micrómetro
µL	Microlitro
3CM-	Triple cáncer de mama negativo
Ab	Anticuerpo
ADCC	Citotoxicidad dependiente de anticuerpos
ADCP	Fagocitosis celular dependiente de anticuerpos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Antígeno
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ALAT	Enzima alanina aminotransferasa
AP	Artritis psoriásica
AR	Artritis reumatoide
ASAT	Enzima aspartato aminotransferasa
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AUC	Ultracentrifugación analítica
BVZ	Bevacizumab
CCECC	Cáncer de células escamosas de cabeza y cuello
CCHNP	Cáncer colorrectal hereditario no polipósico
CCNEP	Cáncer de células no escamosas de pulmón
CCR	Cáncer colorrectal
CCR	Cáncer colorrectal
CCReM	Carcinoma de células renales avanzado o metastásico
CCRm	Cáncer colorrectal metastásico
CDC	Citotoxicidad dependiente del complemento
CDR	<i>Complementary-Determining-Region</i> (Regiones determinantes de complementariedad)
CHO	Ovario de hámster chino
CHPM	<i>Committee for Human Medicinal Products</i> (Comité de medicamentos para uso humano)
cm	Centímetro
CMM	Cáncer de mama metastásico avanzado
CMP	Cáncer de mama precoz
CPCNP	Cáncer de pulmón de células no pequeñas o no microcítico
CPCP	Cáncer de pulmón de pequeñas células o microcítico

Acrónimos

CRS	Síndrome de liberación de citoquinas
CTX	Cetuximab
CU	Colitis ulcerosa
Cys	Cisteína
DAD	Diode Array Detector (Detector de diodos en fila)
DC	Dicroísmo circular
DCC	Gen deletado de cáncer de colon
DCI	Denominaciones comunes internacionales
DER	Desviación estándar relativa
DLBCL	Linfoma difuso de linfocitos B grandes
DLS	Dispersión dinámica de luz
DM1	Taxano
DMAE	Degeneración macular asociada a la edad
DMEM	Medio Dubelcco's Eagle modificado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DOX	Doxorrubicina
EA	Espondilitis anquilosante
EC	Enfermedad de Crohn
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE.UU.	Estados Unidos
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> (Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas)
EMA	Agencia Europea del Medicamento
ESI	Interfase de ionización por electrospray
Fab	Fragmento de unión al antígeno
FBS	Suero bovino fetal
Fc	Fragmento cristizable o constante
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Espectroscopia infrarroja
g	Gramo
H	Cadena pesada
HER2-	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano negativo

Acrónimos

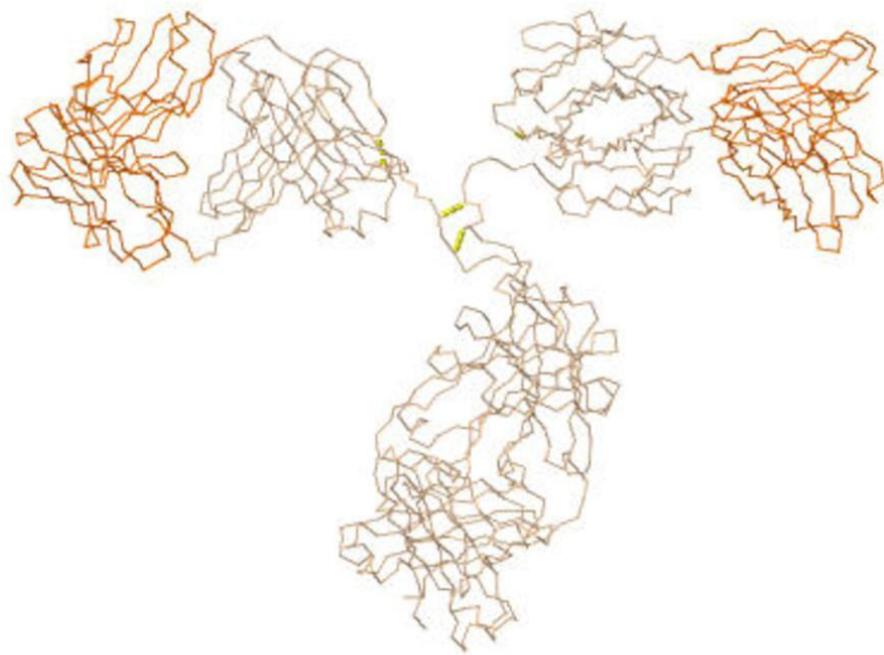
HER-2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i> (Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano)
HER2+	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano positivo
HIAC	Contador de partículas líquidas
HIC	<i>Hydrophobic Interaction Chromatography</i> (Cromatografía de interacción hidrofóbica)
HILIC	<i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i> (Cromatografía de interacción hidrofilia)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta resolución)
HPV-16	Virus del papiloma humano
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IEC o CEX	<i>Ion Exchange Chromatography</i> (Cromatografía de intercambio iónico)
IFX	Infliximab
Ig	Inmunoglobulina
IgA	Inmunoglobulina A
IgD	Inmunoglobulina D
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL-1	Interleucina 1
IL-8	Interleucina 8
INN	<i>International Nonproprietary Names</i>
κ	Kappa
Kd	Equilibrio dinámico
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramo
λ	Lambda
L	Cadena ligera
LES	Lupus eritematoso sistémico
M	Molar
mAb	Anticuerpo monoclonal
MFA	Microscopía de imagen de flujo
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro

Acrónimos

mM	Milimolar
MS	Espectrometría de masas
ng	Nanogramo
NK	<i>Natural Killer</i>
nm	Nanómetro
OPD	Orto-fenilendiamina dihidrocloruro
PAF	Poliposis adenomatosa familiar
PBS	Tampón fosfato salino
PEG	Polietilenglicol
Phe	Fenilalanina
PTX	Paclitaxel
r-DNA	Ácido desoxirribonucleico recombinante
RE-	Receptor de estrógenos negativo
RE+	Receptor de estrógenos positivo
RMN	Resonancia magnética nuclear
RP-	Receptor de estrógenos negativo
RP+	Receptor de progesterona positivo
RPC	<i>Reversed Phase Chromatography</i> (Cromatografía de fase reversa)
RTX	Rituximab
SD	Desviación estándar
SDS- PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
(SE)HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaños
SEC o SE	<i>Size Exclusion Chromatography</i> (Cromatografía de exclusión por tamaños)
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SRB	Sulforoamida-B
TCA	Ácido tricloroacético
TGF- α	Factor de crecimiento transformante alfa
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNM	Sistema de estadificación de cáncer de mayor prevalencia
Trp	Triptófano
TTZ	Trastuzumab
Tyr	Tirosina
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra altas prestaciones
UV-visible	Ultravioleta visible

Acrónimos

V	Voltio
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (Factor de crecimiento epidérmico vascular)



Objetivos

Objetivos

1. OBJETIVO GENERAL

El uso de proteínas terapéuticas como los anticuerpos monoclonales, está actualmente consolidado en el tratamiento de enfermedades de gran prevalencia (cáncer y enfermedades autoinmunes), siendo de uso hospitalario principalmente. Estos medicamentos biotecnológicos tienen en común su elevado precio que se traduce en el mayor impacto sobre el gasto farmacéutico hospitalario. Los estudios de estabilidad de la industria farmacéutica van dirigidos a cumplir los requisitos de comercialización, mientras que la estabilidad en las condiciones de la práctica clínica está frecuentemente limitada a 24 h. Dada la administración de estos medicamentos por peso del paciente, se generan importantes sobrantes de los mismos, que adecuadamente estudiados podrían ser reutilizados con total eficacia y seguridad. La complejidad a la hora de evaluar la estabilidad de estas proteínas es lo que frena este tipo de estudios.

Los objetivos de esta Tesis Doctoral se enmarcan dentro de los objetivos de dos proyectos financiados por el Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades; Fondos de Investigación en Salud, FIS PI010-00201 y FIS PI17-00547), mediante los cuales se está estudiando la estabilidad en el tiempo de sobrantes de este tipo de medicamentos biotecnológicos, seleccionándose aquellos cuyo impacto en la factura económica del Sistema Sanitario es elevado.

Los anticuerpos monoclonales objetivo de esta Tesis han sido bevacizumab, cetuximab, infliximab, rituximab y trastuzumab. Todos ellos han sido evaluados en sus medicamentos innovadores, es decir, los

Objetivos

medicamentos biotecnológicos objetivo de esta Tesis han sido Avastin®, Erbitux®, Remicade®, Mabthera® y Herceptin®, todos ellos medicamentos innovadores.

De los diferentes aspectos que los organismos reguladores internacionales indican que tienen que ser determinados en los estudios de estabilidad de los medicamentos biotecnológicos, esta Tesis ha tenido como objetivo los aspectos físico-químicos relacionados con el particulado de las disoluciones correspondiente a los menores estados de agregación, así como a la evaluación de la funcionalidad.

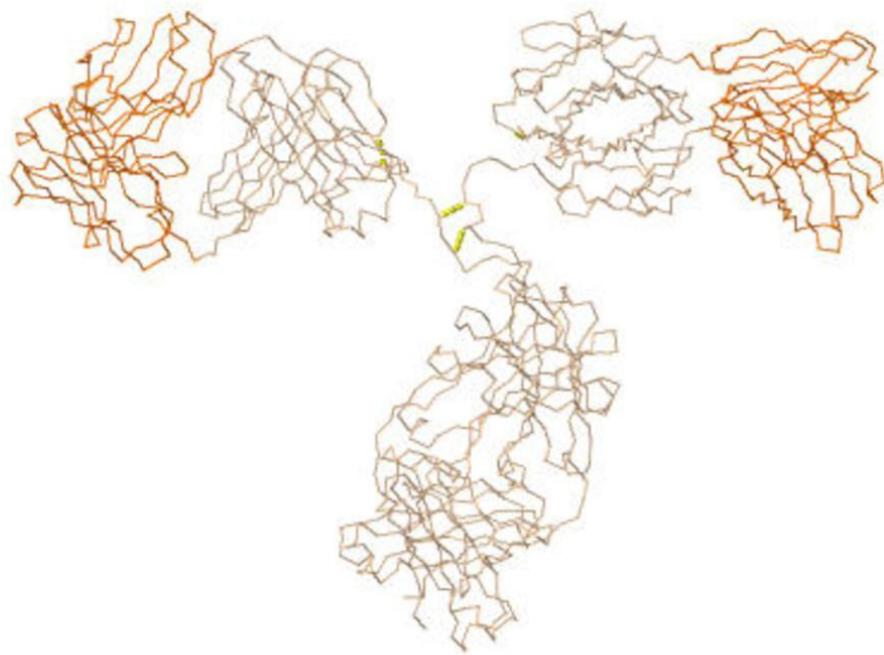
Por tanto, el objetivo general de esta tesis ha sido el estudio del proceso de agregación de los anticuerpos monoclonales a lo largo del tiempo -almacenados los medicamentos refrigerados a 4 °C, y abiertos los correspondiente viales contenedores del mismo- mediante el desarrollo de estrategias analíticas de cromatografía líquida de alta resolución con detección por diodos en fila; así como la evaluación de la funcionalidad de los mismos, y su posible relación con el proceso de agregación. Esto último, mediante inmunoensayos tipo ELISA y mediante estudios de inhibición del crecimiento de líneas celulares.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar y validar de un método de cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaños y detección mediante diodos en fila para el análisis robusto de monómeros, agregados de bajo orden y fragmentos de los anticuerpos monoclonales seleccionados.

Objetivos

- Determinar condiciones ambientales de degradación de los medicamentos por agregación, mediante estudios de degradación acelerada. Evaluar de manera detallada los efectos de la luz sobre los medicamentos y sus diluciones, por ser este un factor ambiental al que están sometidos durante su manipulación y administración al paciente.
- Determinar la estabilidad en el tiempo de los cinco medicamentos biotecnológicos innovadores seleccionados -almacenados los medicamentos refrigerados a 4 °C, y abiertos los correspondiente viales contenedores del mismo-, desde el punto de vista del proceso de agregación.
- Evaluar la funcionalidad en el tiempo de cetuximab (Erbix) y trastuzumab (Herceptin) –igualmente, almacenados los medicamentos refrigerados a 4 °C, y abiertos los correspondiente viales contenedores de los mismos- mediante estrategias ortogonales, como lo son los inmunoensayos ELISA y las estrategias basadas en estudios de crecimiento/inhibición de líneas celulares. Por tanto, ha sido objetivo la puesta a punta y optimización de dos ensayos específicos de crecimiento/inhibición de líneas celulares. Uno para evaluar cetuximab y otro para evaluar trastuzumab.
- Aportar datos de estabilidad en cuanto al proceso de agregación y funcionalidad biológica que contribuyan a la toma de decisiones sobre la reutilización de los sobrantes de estos medicamentos en condiciones de total seguridad y eficacia para el paciente.



Introducción

Introducción

Contenido

1. MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS	45
1.1. DEFINICIÓN.....	45
1.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS. DIFERENCIAS CON LOS MEDICAMENTOS DE SÍNTESIS QUÍMICA.	47
1.3. MARCO LEGAL: LA REGULACIÓN DE LOS MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS.....	53
2. ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	54
2.1. DEFINICIÓN.....	55
2.2. ESTRUCTURA.....	56
2.3. NOMENCLATURA.....	59
2.4. OBTENCIÓN.....	60
2.4.1. <i>Tecnologías para la producción de anticuerpos monoclonales terapéuticos</i>	61
2.4.1.1 <i>Generación de hibridomas</i>	61
2.5. MECANISMO DE ACCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES TERAPÉUTICOS	64
3. DESCRIPCIÓN DE LOS FBIOs ESTUDIADOS.....	66
3.1. BEVACIZUMAB.....	67
3.1.1. <i>Procedimiento de obtención y características</i>	67
3.1.2. <i>Mecanismo de acción</i>	67
3.1.3. <i>Aplicaciones</i>	68
3.1.4. <i>Efectos adversos</i>	70
3.1.5. <i>Forma farmacéutica, composición y excipientes</i>	70
3.2. CETUXIMAB	70
3.2.1. <i>Procedimiento de obtención y características</i>	71
3.2.2. <i>Mecanismo de acción</i>	72

Introducción

3.2.3.	<i>Aplicaciones</i>	73
3.2.4.	<i>Efectos adversos</i>	80
3.2.5.	<i>Forma farmacéutica, composición y excipientes</i>	82
3.3.	INFLIXIMAB	82
3.3.1.	<i>Procedimiento de obtención y características</i>	82
3.3.2.	<i>Mecanismo de acción</i>	83
3.3.3.	<i>Aplicaciones</i>	84
3.3.4.	<i>Efectos adversos</i>	85
3.3.5.	<i>Forma farmacéutica, composición y excipientes</i>	86
3.4.	RITUXIMAB	87
3.4.1.	<i>Procedimiento de obtención y características</i>	87
3.4.2.	<i>Mecanismo de acción</i>	87
3.4.3.	<i>Aplicaciones</i>	88
3.4.4.	<i>Efectos adversos</i>	89
3.4.5.	<i>Forma farmacéutica, composición y excipientes</i>	90
3.5.	TRASTUZUMAB.....	91
3.5.1.	<i>Procedimiento de obtención y características</i>	91
3.5.2.	<i>Mecanismo de acción</i>	92
3.5.3.	<i>Aplicaciones</i>	93
3.5.4.	<i>Efectos adversos</i>	97
3.5.5.	<i>Forma farmacéutica, composición y excipientes</i>	98
4.	AGREGACIÓN EN PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS	98
4.1.	ESTUDIOS DE ESTABILIDAD EN MEDICAMENTOS DE USO HUMANO. REQUERIMIENTOS OFICIALES. GUÍAS ICHs.	104
4.2.	PERFIL INDICADOR DE ESTABILIDAD	109
4.3.	TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DEL PERFIL DE AGREGACIÓN	111

Introducción

4.4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN EN EL ANÁLISIS DE mAbs DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑOS.....	114
4.5. OTROS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE MABS TERAPÉUTICOS	119
5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES TERAPÉUTICOS	120
5.1. INMUNOENSAYOS. ELISA.....	121
5.2. CULTIVOS CELULARES	124
6. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE ANTICUERPOS MONOCLONALES TERAPÉUTICOS EN CONDICIONES DE USO HOSPITALARIO.....	129
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134

Introducción

1. MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS

1.1. DEFINICIÓN

La definición de “*medicamentos biotecnológicos*” es tan amplia que se permite el uso indistintamente de los términos de medicamentos biológicos y medicamentos biotecnológicos. No hay una definición y clasificación de los mismos a nivel mundial, dejando dicha labor a la autoridad regulatoria sanitaria de cada país, los cuales se encargarán de realizar un seguimiento de los mismos tanto para llevar a cabo su registro correspondiente como su vigilancia en el mercado [1].

En Europa, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) [2] es la agencia sanitaria encargada de dicha labor. La definición que proporciona para medicamentos biotecnológicos incluye proteínas de distinta naturaleza (recombinantes, anticuerpos monoclonales (mAbs) y fragmentos funcionales de estos últimos, vectores para el transporte de material genético, ácidos nucleicos, oligonucleótidos, vacunas, entre otros), cuya característica primordial es la de desarrollar un efecto en la medicina y que para su obtención se utilizan técnicas del ámbito biotecnológico (r-DNA, expresión génica controlada, métodos basados en el anticuerpo (Ab), entre otros) [3].

En el caso de España, además de regirse en base a lo establecido en la EMA, los medicamentos biotecnológicos quedan definidos en el Real Decreto 1345 del año 2007, indicando que es un producto cuyo principio activo es biológico y cuyos materiales de partida son toda sustancia de origen biológico tales como los microorganismos, órganos y

Introducción

tejidos de origen vegetal o animal, las células o fluidos (incluyendo sangre y plasma) de origen humano o animal y los diseños celulares biotecnológicos (sustratos celulares sean o no recombinantes incluidas las células primarias) [4]. Posteriormente, dicho Real Decreto ha sido ampliado en la regulación de la farmacovigilancia (Real Decreto 577/2013).

Estos medicamentos, considerados como innovadores, son desarrollados para hacer frente a enfermedades con alto índice de mortandad y cuyo resultado sería más efectivo que el obtenido mediante el tratamiento con los medicamentos de síntesis química. De esta forma, constituyen la base para la prevención o tratamiento de enfermedades, permitiendo que se abran nuevas vías de exploración en el tratamiento de este tipo de enfermedades, cuyos recursos han crecido exponencialmente en los últimos años gracias a las últimas investigaciones.

Actualmente sólo el 20% de los fármacos catalogados como innovadores son obtenidos por técnicas biotecnológicas, porcentaje que se ve aumentado hasta el 50% si incluimos aquellos catalogados en fase de investigación clínica [3], cifras que se ven corroboradas cuando se comprueba que año tras año la investigación tanto experimental como clínica con medicamentos biotecnológicos superan a los de síntesis química. Desde el año 2002, el porcentaje de moléculas, obtenidas por biotecnología, autorizadas, supera a las obtenidas por síntesis química, estimándose que en la actualidad, los biofármacos representan alrededor del 15 % del arsenal terapéutico disponible. Cerca del 30-40 % de los proyectos internacionales de investigación que se están desarrollando se realizan con biomedicamentos, cifra que probablemente se incrementará

Introducción

en las próximas décadas [5]. De esta forma, los biofármacos orientados hacia líneas de investigación en el área de oncología, hematología, neurología, enfermedades inflamatorias y metabólicas parecen ser el futuro de la medicación denominada a la carta.

1.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS. DIFERENCIAS CON LOS MEDICAMENTOS DE SÍNTESIS QUÍMICA

Como se ha comentado anteriormente, para la obtención de los medicamentos biotecnológicos se emplean técnicas biotecnológicas - como por ejemplo las técnicas basadas en el ADN recombinante e hibridomas-, que incorporan información al material genético de organismos vivos (bacterias, hongos, etc.), con el cual éstos puedan sintetizar un producto terapéutico concreto, “a la carta”.

Debido a sus diferencias tanto en el origen como a nivel estructural con los medicamentos de síntesis química, presentan características propias a nivel de propiedades farmacológicas, uso clínico, aspectos regulatorios y seguridad entre otros aspectos, por lo que muchos conceptos de la farmacología clásica no pueden ser aplicables directamente en los medicamentos biotecnológicos. Un ejemplo es en la posibilidad de sustituir un fármaco por un genérico, situación diferente para el cambio de un medicamento biotecnológico por un biosimilar, debido a los peligros que conllevan la sustitución en el caso de los biofármacos [5].

Introducción

Las principales diferencias entre los medicamentos biotecnológicos y los de síntesis química son:

► **Los medicamentos biotecnológicos presentan un proceso de producción mucho más complejo.** Son sustancias terapéuticas generalmente de naturaleza proteica, que interactúan con las proteínas humanas. Dichas sustancias son producidas por organismos vivos o extractos de los mismos en el caso de bacterias, hongos o células de origen animal o humano, por lo que el primer paso para su obtención se trata de modificar el material genético de una célula o microorganismo introduciéndole la secuencia que produzca la proteína de interés. En función de la procedencia de la materia prima, los medicamentos biotecnológicos tienen dos orígenes:

A) Componente activo de origen biológico: extraído de microorganismos, órganos, tejidos de origen vegetal o animal, células o fluidos de origen humano o animal. Tradicionalmente, a estos son a los que hacen referencia los “medicamentos biológicos”.

B) Componente activo de origen biotecnológico: generalmente proteínas obtenidas a partir de células modificadas genéticamente para producirlas. A estos son a los que hacen referencia los “medicamentos biotecnológicos”.

Los medicamentos biotecnológicos parten de un cultivo celular que se desarrolla en un biorreactor que almacena grandes litros del mismo para poder producirlo en cantidades industriales, por lo que serán claves los pasos y etapas para la purificación del producto final [6, 7].

Introducción

Desde un punto de vista químico, la naturaleza de los principios activos de los medicamentos biotecnológicos es proteica, glucoproteica, o cadenas polipeptídicas cuyos procesos de obtención requieren etapas muy complejas, que conllevan definir la secuencia de ADN codificadora de la proteína de interés, selección de las células en el que se insertará dicha secuencia génica para su expresión en una proteína recombinante, y su posterior etapa de purificación y análisis. Es importante que los procesos de transcripción y traducción se realicen de forma adecuada para garantizar tanto la efectividad como la bioseguridad del producto [8]. Por tanto, el proceso de obtención es tan complejo que cada etapa es clave en el resultado final, de manera que cambios por pequeños que sean generen alteraciones clínicamente significativas en aspectos de bioseguridad y eficacia.

► **El componente activo de los medicamentos biotecnológicos es heterogéneo y presentan una estructura molecular de mayor complejidad y tamaño que los de síntesis química**, por lo que su análisis, caracterización y producción será más complicada que la de los fármacos de síntesis química, debido a que no pueden replicarse de forma exacta y que sus estructuras y propiedades dependerán de los procesos de producción elegidos, por lo que existe un grado de variabilidad controlada y admitida por las autoridades sanitarias entre lotes del mismo biofármaco [9].

Muchas de las proteínas que constituyen los biofármacos se modifican después de la traducción, entre los cuales se pueden nombrar la inclusión de carbohidratos, los plegamientos alfa-helicoidales y las hojas beta, influyendo en la complejidad y estructura tridimensional. En

Introducción

el caso de las glicoproteínas, en función del grado de glicosilación, permiten aumentar la variedad de fármacos biotecnológicos.[6]. Pero también, su complejidad estructural permite que distintas funciones sean llevadas a cabo por una sola molécula y que las funciones de la entidad proteica queden localizadas en determinadas regiones. Un ejemplo de esto son los anticuerpos monoclonales, donde el sitio de fijación del antígeno es diferente al lugar donde presenta el patrón de glicosilación, mediante el cual interacciona con macrófagos y se fija al complemento; es decir, dos funciones bien diferenciadas llevadas a cabo por una misma unidad proteica. Pero esto que es debido gracias a la complejidad estructural de las proteínas hace que el análisis para la identificación completa de un biofármaco sea un proceso complejo y muy extenso [5].

► **La inmunogenicidad es un riesgo a tener en cuenta, debido a su potencial de activar la respuesta inmunitaria conllevando a distintas reacciones adversas [6, 10].** Se trata de un proceso por el que el ser humano genera una respuesta frente a una proteína u otra sustancia que el organismo lo detecta como agente extraño, como no propio. La respuesta frente a este agente conlleva la producción de anticuerpos que se unen a la entidad extraña para inactivarla formando un complejo antígeno-anticuerpo, causante de los efectos adversos [3].

Este factor representa un aspecto muy importante de bioseguridad, estableciéndose unos requisitos de evaluación del potencial inmunogénico que aparecen redactados en directrices específicas (*Guideline on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins*) [11]. A pesar de ello, la inmunogenicidad sigue

Introducción

siendo el principal factor para el fracaso de los medicamentos en fases pre-clínicas.

Hay varios factores que influyen en la inmunogenicidad. Los más importantes a destacar son: la secuencia de aminoácidos del biofármaco, la naturaleza proteica (las proteínas endógenas generan menor inmunogenicidad que las proteínas exógenas), el patrón de glicosilación, la pureza del medicamento (por ejemplo, la ausencia de proteínas del ser vivo productor), los excipientes, su estabilidad (formación de agregados), además de la dosis (dosis elevadas generan mayor riesgo de inmunogenicidad), la vía de administración del biofármaco (la vía subcutánea es más propensa al riesgo inmunogénico que la intravenosa) [5, 12], y la duración del tratamiento (tratamientos prolongados pueden ocasionar inmunogenicidad).

El desarrollo de inmunogenicidad conlleva un amplio conjunto de consecuencias, desde las más leves como son un descenso o pérdida de eficacia a largo plazo fruto de la presencia de anticuerpos neutralizantes, o de mayor gravedad como son reacciones cruzadas con proteínas propias del paciente. Además, la reacción inmunitaria que puede provocar cada biofármaco es diferente debido a factores como el mayor tamaño, complejidad estructural y proceso de producción de los mismos [9].

► **El número de pruebas de control requeridas en un medicamento biotecnológico para garantizar su eficacia (250 pruebas) es mayor en comparación con las pruebas realizadas a los medicamentos basados en principios activos de síntesis química**

Introducción

(entre 40 y 50 pruebas) [13, 14]. Esto se debe a que los procesos de fermentación y purificación en los que están implicadas una línea de células modificadas genéticamente requieren un control estricto para garantizar la bioseguridad y la eficacia del biofármaco, por lo que cada medicamento biológico se puede considerar como único debido a la naturaleza de cada línea celular empleada y del proceso de fabricación seleccionado [9].

► **La mayoría de los biofármacos se administran por inyección o infusión en medio hospitalario** y no pueden administrarse por vía oral como ocurre con la mayoría de los fármacos de síntesis química [13].

► **El desarrollo del estudio farmacocinético de los biofármacos es complejo** [5, 14], debido a la similitud entre péptidos endógenos y proteínas de nutrientes, y los péptidos y proteínas de flujos biológicos. A pesar de ello, el desarrollo y mejora de las técnicas analíticas permiten que cada vez sea más factible debido al uso de técnicas más complejas como se tratan de inmunoensayos muy específicos y de técnicas avanzadas de espectrometría de masas [15].

A pesar de ello, no se conoce realmente la cantidad de biofármaco que llega al objetivo donde va actuar y sus posibles consecuencias, además de que el mecanismo de acción puede ser totalmente diferente al de las sustancias endógenas [5].

► En lo relativo al precio, **los medicamentos biotecnológicos son mucho más caros**, debido a la dificultad de su producción y la no

Introducción

existencia de alternativas más baratas pasa su producción en busca de una reducción de costes.

► **La bioseguridad y efectividad de los biofármacos dependen de los protocolos de calidad y su control durante su fabricación.** Las diferencias que radican en los perfiles de seguridad entre ambos fue revisada por los investigadores del *Utrecht Institute for Pharmaceutical Science* (Holanda) [5, 16], cuyos estudios han demostrado que en un periodo de 13 años 174 medicamentos biotecnológicos comercializados presentaron problemas de seguridad (el 50% de los efectos adversos) asociados con trastornos generales, problemas en el lugar de administración, infecciones e infestaciones, mientras que otros problemas fueron a nivel del sistema inmunológico y desarrollo de neoplasias de diversa índole (benignas, malignas y del tipo no específicas) [5, 17, 18].

1.3. MARCO LEGAL: LA REGULACIÓN DE LOS MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS

Desde 1995, la EMA es la encargada de la evaluación y autorización de los medicamentos biotecnológicos, agencia en el que están involucrados todos los países miembros de la Unión Europea. Dicha evaluación tiene lugar durante 210 días, tras los cuales el Comité de Medicamentos para Uso Humano (CHMP; *Committee for Human Medicinal Products*) elabora una opinión científica [5, 19].

Todos los pasos a seguir en el proceso centralizado de autorización por parte de la EMA fueron por primera vez descritos en la Regulación (EC) No. 726/2004 [20], el cual fue modificado posteriormente por la

Introducción

Directiva (UE) 2017/1572 [21] y que es obligatorio en los siguientes casos:

- Productos obtenidos mediante el uso de organismos vivos.
- Medicamentos de terapia avanzada (basados en la manipulación de genes, células o tejidos).
- Medicamentos para el tratamiento de enfermedades raras, denominados como medicamentos huérfanos.
- Productos que contengan alguna sustancia nueva cuyo fin sea el tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), cáncer, trastornos neurodegenerativos, diabetes u otras enfermedades de carácter inmunitario y enfermedades víricas.

2. ANTICUERPOS MONOCLONALES

En la primera mitad del siglo XX, se empezó a usar la terapia con suero, conocida también con el nombre de terapia Ab, frente a enfermedades de tipo inflamatorio crónico e infecciosas. Este fue el punto de partida para que la terapia con el uso de anticuerpos se desarrollase rápidamente hasta nuestros días, donde la producción de anticuerpos monoclonales recombinantes y fragmentos de los mismos, y recientemente los anticuerpos policlonales recombinantes para uso terapéutico, marcan la tendencia de evolución de la industria biotecnológica en el mundo sanitario.

Introducción

2.1. DEFINICIÓN

A principios del siglo XX, el uso de los anticuerpos a nivel sanitario consistía en el uso de sueros inmunes convencionales que consistía en una mezcla heterogénea procedente de distintas especies de origen animal de anticuerpos producidos por diferentes clones de linfocitos B, recibiendo el nombre de anticuerpos policlonales, cuya característica principal es la alta afinidad por el antígeno debido a su capacidad de reconocer diferentes epítomos a cambio de una baja especificidad. Por el contrario, aquellos producidos por un único linfocito B y sus clones, reciben el nombre de anticuerpos monoclonales y presentan la misma especificidad frente a un único antígeno [22]. De esta forma, se puede definir al *anticuerpo monoclonal como un anticuerpo homogéneo capaz de reconocer una parte del antígeno de forma específica, procedente de un único clon de células linfocitos B*. Dicho clon procede de una célula híbrida originada de la fusión de una célula madre del sistema inmune y otra plasmática de tipo tumoral.

Debido al hecho de proceder de un único tipo de linfocito B, los anticuerpos monoclonales son idénticos entre sí, que junto a la especificidad que presentan, son otra forma de terapia contra el cáncer, ampliando su espectro de acción a otros tipos de enfermedades como la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn entre otros. La mejora de las técnicas de producción de este tipo de anticuerpos permite aumentar la cantidad de producción de un anticuerpo en concreto frente a un antígeno determinado. En el caso de la inmunoterapia oncológica, los anticuerpos monoclonales actúan como moléculas bloqueantes de ligandos o como inmunomoduladores.

Introducción

Actualmente, los anticuerpos monoclonales terapéuticos están consolidados en el tratamiento de enfermedades inmunológicas y oncológicas, de tal manera que el número de ellos aprobados o en ensayos clínicos está en continua aumento [23].

2.2. ESTRUCTURA

Los anticuerpos monoclonales, como inmunoglobulinas que son, son proteínas altamente especializadas presentando estructuras muy específicas en función del antígeno que reconozcan.

Un mAbs consta de cuatro cadenas polipeptídicas iguales dos a dos denominadas ligeras (L) y pesadas (H), es decir, dos cadenas ligeras idénticas entre sí y dos cadenas pesadas iguales. Estas cadenas están unidas covalentemente por puentes disulfuro y la estructura tridimensional permanece estabilizada por enlaces de tipo no covalentes, como son los puentes de hidrógeno y las fuerzas de Van der Waals. Esta estructura recibe el nombre de monómero. Las cadenas pesadas y ligeras presentan diferencias entre sí, como por ejemplo en el número de dominios (de 3 a 4 dominios constantes en el caso de las cadenas pesadas y un único dominio en el caso de las cadenas ligeras) [24]. La Figura 1 representa gráficamente la estructura tridimensional de un anticuerpo monoclonal.

Introducción

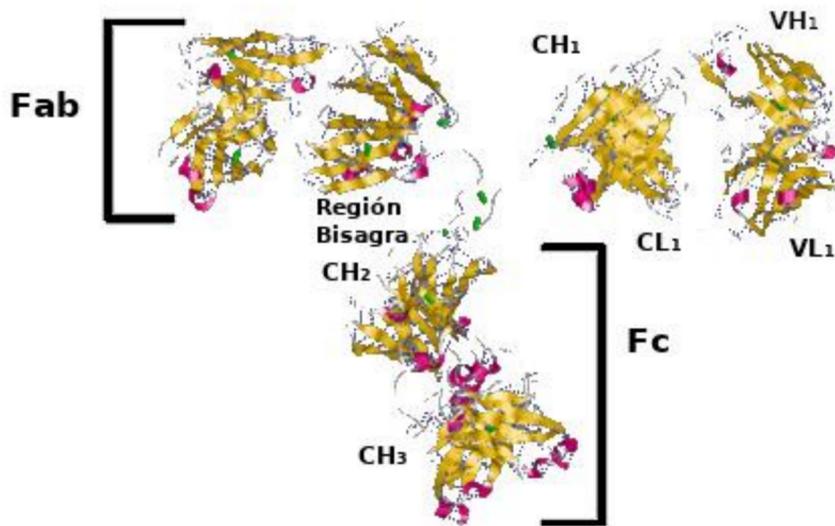


Figura 1. Representación tridimensional de la estructura de un anticuerpo monoclonal.

Las cadenas pesadas, cuyo peso molecular es de 55 a 77 kDa, constan de 450 a 550 aminoácidos con un 3 al 15% de carbohidratos necesarios para la estabilidad estructural del monómero y favorecer la activación del sistema del complemento y la unión a receptores Fc. Existen cinco clases o isotipos de cadenas pesadas, cuya diferencias estructurales entre sí se detectan a nivel de la región carboxiterminal. Su clasificación conlleva el uso de letras griegas, las cuales determinarán el tipo de inmunoglobulina: gamma (γ) presente en la IgG, mu (μ) en la IgM, alfa (α) en la IgA, delta (δ) en la IgD y épsilon (ϵ) en la IgE. Además, presentan una región bisagra cuyo aminoácido predominante es la prolina, ubicada entre los dominios CH1 y CH2. Su longitud es variable (entre 10 a 60 aminoácidos) en función del tipo de inmunoglobulina. La principal característica de esta región es la flexibilidad, factor necesario para la orientación espacial de los paratopos y clave para la eficiencia de la unión antígeno-anticuerpo.

Introducción

Las cadenas ligeras, cuyo peso molecular es en torno a 25 kDa, no presentan carbohidratos a diferencia de las cadenas pesadas. Constan de 220 aminoácidos aproximadamente, pudiéndose dividir en dos dominios: dominio variable en posición aminoterminal, y dominio constante en posición carboxiterminal. Variaciones estructurales en el CL carboxiterminal, permiten distinguir dos tipos de cadenas ligeras: kappa (κ) y lambda (λ). Una Ig nunca podrá tener ambas, solamente o κ o λ [24].

Los extremos aminoterminales de una cadena ligera y una cadena pesada constituyen el paratopo o sitio de unión para el antígeno, lo que quiere decir que existen dos sitios de combinación por monómero de inmunoglobulina. De esta forma, la inmunoglobulina tiene un carácter bivalente porque puede interactuar con dos epítomos idénticos.

Las regiones hipervariables, denominadas también como regiones determinantes de complementariedad (CDR: *Complementary-Determining-Region*) constan de unos 30 aminoácidos de cada cadena ligera y pesada ubicadas en la región variable. Se pueden dividir en distintos subgrupos en función de cada especie en base a su secuencia de aminoácidos, siendo en el caso de los humanos cuatro subgrupos para las cadenas kappa, seis para las cadenas lambda, y tres para las cadenas pesadas [24].

De las dos grandes regiones en las que se divide la estructura de un mAb, el fragmento de unión al antígeno (Fab) es el más importante desde el punto de vista funcional. Ubicado en la posición aminoterminal, permite la unión específica con el antígeno sin llevar a cabo su

Introducción

precipitación. La otra región en la que se divide el anticuerpo es el fragmento cristalizante (Fc), de unos 50 kDa de peso molecular, y cuyo nombre hace referencia a que fue la primera región detectada mediante cristalografía. Ubicado en el extremo carboxiterminal de la cadena pesada, realiza a cabo muchas funciones importantes, como la activación del sistema del complemento, activación de las células fagocíticas, citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC), inmunidad de mucosas, inmunidad neonatal, hipersensibilidad inmediata y regulación de la respuesta inmunogénica.

Existen cinco grandes tipos de anticuerpos o gammaglobulinas humana: Inmunoglobulinas G (IgG), A (IgA), M (IgM), E (IgE) y D (IgD) cuyas diferencias radican en tamaño, carga, composición de aminoácidos y contenido de carbohidratos en las cadenas pesadas [24]. Las gammaglobulinas IgG son los mayoritarios, pudiendo distribuirse por todo el organismo e, incluso, atravesar la placenta para la inmunidad fetal. Estas se subdividen en cuatro sub-tipos: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 en función del número de aminoácidos en la región bisagra y del número de puentes disulfuro entre cadenas pesadas [25]. El tipo IgG, es el más empleado con fines terapéuticos, y de entre las diferentes subclases, la 1 es la que presentan la mayoría de los comercializados, entre otras razones, por su larga vida media en los fluidos biológicos.

2.3. NOMENCLATURA

Según la OMS, existen más de 300 denominaciones comunes internacionales (DCI) para los anticuerpos monoclonales desde el año 1992. La nomenclatura está basada en una revisión del *International*

Introducción

Nonproprietary Names (INN) for biological and biotechnological substances [26, 27]. Las DCI para los anticuerpos monoclonales están compuestas de un prefijo, una partícula A, una partícula B (ambos un infijo) y un sufijo.

prefijo + infijo A (objetivo, órgano) + infijo B (origen) + sufijo

El prefijo debe ser al azar, y su único requisito es el de contribuir a un nombre eufónico (armonioso, que suene bien) y distintivo. La partícula A indica el tipo de objetivo (molécula, célula, órgano, enfermedad): -b (o -ba) es de objetivo bacteriano; -c (o -ci) es de objetivo cardiovascular; -t (o -tu) de objetivo tumoral; -l (o -li) su objetivo es ser inmunomodulador. La partícula B indica la especie sobre la que está basada la secuencia de Ig del mAb: (- o- ratón; -u- humano; -zu- humanizado; -xi- quimérico; -xizu- quimérico- humanizado; etc.) [27]. El sufijo (terminación) común para los mAbs es -mab.

2.4. OBTENCIÓN

La forma clásica de obtener anticuerpos frente a un antígeno es mediante el uso de animales, como el conejo o caballo (sueros con anticuerpos policlonales). De esta forma, se necesita inocular previamente al animal la sustancia frente a la que los anticuerpos que obtengamos sean funcionales. Tras ello, se extraen y aíslan los anticuerpos del suero, proceso denominado como inmunización [22].

Introducción

En 1975, Cesa Milstein, George Köhler y Niels K. Jerne, consiguieron desarrollar una técnica para la producción de anticuerpos procedentes de un único clon de linfocitos B, hecho que les permitió ser galardonados con el premio Nobel de Medicina en 1984, mediante el uso de hibridomas o células híbridas de linfocitos B con células plasmáticas tumorales de mieloma múltiple. Dicho hibridoma, presenta las propiedades idóneas de ambos para su utilidad: producción de un anticuerpo específico (linfocito B) y la inmortalidad con gran capacidad de crecimiento (mieloma). Las células usadas en un inicio fueron células de ratón, aunque en la actualidad el tipo celular usado para la producción de hibridomas son variadas. Posteriormente, se consiguieron erradicar reacciones adversas que se detectaban en muchos pacientes, gracias a las investigaciones de Gregory Winter y Richard Lerner que humanizaron los anticuerpos monoclonales [6].

2.4.1. Tecnologías para la producción de anticuerpos monoclonales terapéuticos

La producción de anticuerpos monoclonales se puede realizar a través de diferentes técnicas, siendo la más usada la técnica de generación de hibridomas mencionada anteriormente.

2.4.1.1 Generación de hibridomas

A finales del pasado siglo se desarrollaron modelos de ratones transgénicos a los que habían sido inoculados los genes para la producción de inmunoglobulinas humanas, los cuales permiten el desarrollo de linfocitos B en gran cantidad, productores de anticuerpos

Introducción

humanos. Para la obtención del anticuerpo monoclonal específico, se les inmunizaba con el antígeno para después usar sus bazos para la obtención de hibridomas siguiendo cualquier protocolo convencional [22].

Del bazo se extraen los linfocitos B, que se fusionan en presencia de polietilenglicol (PEG) con células tumorales de mieloma múltiple, consiguiendo que puedan crecer de forma indefinida en un cultivo celular. La unión de ambas células, constituyen el hibridoma, capaz de multiplicarse rápidamente e indefinidamente, y de producir gran cantidad de anticuerpos. Estos hibridomas son cultivados para obtener colonias capaces de producir un único tipo de anticuerpo, los cuales serán analizados para conocer la afinidad por un antígeno determinado para su selección y posterior aislamiento [6]. De esta forma, se obtienen poblaciones homogéneas de anticuerpos frente a un único antígeno.

A pesar de la gran efectividad para la obtención de anticuerpos monoclonales de tipo murino (procedente de ratón), no ocurre lo mismo con los anticuerpos monoclonales de tipo humano, por lo que se han desarrollado otras técnicas alternativas a la obtención de estos anticuerpos monoclonales humanos a partir de hibridomas.

Introducción

Entre estas tecnologías se encuentra la tecnología de los anticuerpos recombinantes, en la cual no es necesaria la inmunización del animal. Para ello, se requieren grandes bibliotecas de genes de anticuerpos, cuyo screening debe tener una eficiencia comparable a la del sistema inmune, mediante la exposición en la superficie de microorganismos los anticuerpos producidos [22].

Existen dos formas de obtención de fragmentos de anticuerpos a través de esta tecnología:

A) Tecnología *Phage-Display*: produce únicamente la parte del anticuerpo capaz de reconocer al antígeno, mediante el uso de *E. coli* u otras células, y ratones transgénicos para los genes de las inmunoglobulinas humanas. Gracias al uso de esta tecnología, el desarrollo de bibliotecas de fragmentos de anticuerpos o genotecas de expresión de fagos ha sido posible, que consisten en colecciones de fragmentos de anticuerpos variables para numerosos antígenos, siendo posible la generación de anticuerpos completamente humanos para uso terapéutico.

B) Tecnología del *Ribosome Display*: también consiste en la producción de fragmentos de anticuerpos monoclonales siendo posible la generación de bibliotecas de genes de anticuerpos, pero con la ventaja sobre el anterior de que la síntesis de los fragmentos de los anticuerpos monoclonales se realizan *in vitro*, sin depender del uso de células o fagos que podrían ejercer un factor limitante. Otras ventajas son la generación de diversidad y eficiencia en el desarrollo de anticuerpos terapéuticos [22].

Introducción

Otra alternativa son las plantas de producción de anticuerpos monoclonales, que conllevan ventajas como son la reducción de costes y el aumento de la productividad, utilizando para ello una gran variedad de especies de plantas como la planta del maíz, el arroz la planta del tabaco, *Arabidopsis thaliana* y *Lemna minor* [22].

En la actualidad, se producen mediante el uso de biorreactores donde células de ovario de hámster chino (CHO) se desarrollan en cultivo en suspensión sin suero. Estas células han sido transfectadas anteriormente con un vector de expresión que contiene la secuencia codificadora del mAb. Posteriormente, se procede a los procesos de purificación y control de calidad [28].

2.5. MECANISMO DE ACCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES TERAPÉUTICOS

De manera general, la acción terapéutica de los anticuerpos monoclonales tiene lugar mediante su participación en mecanismos como los de muerte celular y apoptosis, citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) mediante el uso de diferentes partes del anticuerpo [27, 29, 30]. De esta forma, las moléculas dianas de la región Fab interactúan mediante la unión, bloqueo o señalización [27, 29, 30], consiguiendo la interrupción de las funciones de la célula y sus interacciones con otras moléculas asociadas, conllevando a la activación de la muerte celular.

Introducción

La versatilidad de los anticuerpos monoclonales es tan grande, que pueden unirse a compuestos tóxicos para la célula, actuando el anticuerpo como un vehículo para poder destruir a células en concreto, recibiendo el nombre de inmunotoxinas. Esta sustancia como un portador de una sustancia tóxica para la célula diana basándose en la interacción específica con la célula tumoral. Cuando la inmunotoxina consigue interactuar con la célula diana, se consigue internalizar el ligando en el interior celular, donde desarrolla su acción citotóxica [6].

También, un anticuerpo monoclonal puede bloquear la unión de la célula diana con sus ligandos mediante el bloqueo de los receptores, lo que se traduce en la inhibición de la transducción de la señal y la proliferación celular. Por el contrario, el efecto terapéutico de algunos anticuerpos monoclonales depende de la similitud con el ligando, de tal forma que actúan como si de éste se tratase e inducen la transducción de señales, asociándose con la activación in vivo de las células diana y la liberación de citocinas.

La región Fc es la mediadora de las funciones efectoras a través de las interacciones con los receptores de células del sistema inmune, por lo que esta región es la encargada de la actividad citotóxica, siendo su potencia efectora dependiente del isotipo IgG, aunque también se requiere necesariamente la unión previa de las regiones Fab con el epítipo diana [27, 29, 31].

Por lo tanto, entre las funciones principales de los anticuerpos monoclonales terapéuticos se pueden destacar [30]:

Introducción

- Bloqueo de una respuesta, previniendo el acceso de mediadores solubles (citoquinas), por unión al mediador o a su receptor.
- Marcaje de células tumorales por unión a Ags específicos, permitiendo la opsonización y posterior destrucción de la célula, por lisis mediada por el mAb y dependiente del sistema del complemento.
- Desencadenamiento de señales intracelulares, inductoras de apoptosis a través de Abs antiidiotipo.
- Transporte de sustancias radiactivas o citostáticas.
- Potenciación de la respuesta inmunogénica de células T, dirigida contra Ags tumorales desconocidos. Entre estos se encuentran los anti-CD40, anti- D137, anti-CTLA-4, anti-BAT2.

3. DESCRIPCIÓN DE LOS FBIOs ESTUDIADOS

En esta Tesis Doctoral se han estudiado 5 mAbs terapéuticos empleando para ello su presentación comercial. Estos han sido: Bevacizumab (Avastin ®), Cetuximab (Erbix ®), Infliximab (Remicade ®), Rituximab (Mabthera ®) y Trastuzumab (Herceptin ®). A continuación se hace una descripción detallada de estos mAbs.

Introducción

3.1. BEVACIZUMAB

Bevacizumab (BVZ) es un anticuerpo monoclonal del tipo IgG1 recombinante humanizado cuya actividad es la neutralización de todas las funciones llevadas a cabo por el factor de crecimiento epidérmico vascular (VEGF) humano, como es la angiogénesis.

Debido a su carácter recombinante, presenta regiones humanas y regiones murinas, siendo estas últimas las regiones determinantes para la unión al VEGF.

3.1.1. Procedimiento de obtención y características

BVZ se produce mediante tecnología recombinante (mutagénesis dirigida) a partir de células ováricas de hámster chino (CHO). Con un peso molecular de 149 kDa, los aminoácidos que constituyen las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) y siete aminoácidos adicionales de origen de ratón se introdujeron en la secuencia consenso de una IgG1 humana, por lo que la parte humana corresponde a un 93% del total y la parte de ratón a un 7% del total del anticuerpo monoclonal. Este biofármaco presenta una afinidad al VEGF muy similar a la del anticuerpo original [32].

3.1.2. Mecanismo de acción

Se ha determinado que la efectividad del BVZ se debe a los impedimentos de tipo estérico sobre la interacción del VEGF con receptores [33, 34], neutralizando la capacidad del VEGF de unirse a su

Introducción

receptor, VEGF-1 (fit-1) y VEGF-2 (KDWflk-1), ubicados en la superficie de células endoteliales. VEGF-1 interviene en la proliferación celular, en la supervivencia y en la permeabilidad de la membrana, mientras que VEGF-2 participa en la migración celular y producción del factor tisular, por lo que la interacción de BVZ con estos receptores inhiben la acción mitógena de las células endoteliales, mejora la actividad de la permeabilidad vascular, y otras funciones involucradas en la angiogénesis [35]. En definitiva, inhibe la proliferación de la vascularización necesaria en procesos por ejemplo de desarrollo oncológico entre otros.

3.1.3. Aplicaciones

A partir de 2004 la FDA de los EE.UU aprobó su uso en pacientes de cáncer colorrectal metastásico (CCRm) en combinación con 5-fluorouracilo. También está permitido su uso por la FDA en pacientes con cáncer de mama metastásico avanzado no escamoso (CMM), cáncer de células no escamosas de pulmón (CCNEP), cáncer avanzado de ovario epitelial, trompa de Falopio o peritoneal primario y carcinoma de células renales avanzado o metastásico (CCReM) y como terapia de segunda línea para el glioblastoma multiforme en grandes ensayos clínicos aleatorios (2004; 2006; 2007; 2009 y 2011) y glioblastoma recurrente (2009) [36].

Diversos estudios realizados han permitido ver otras aplicaciones aún no reconocidas por la FDA. Un ejemplo son los casos de degeneración macular asociada a la edad (DMAE), retinopatía diabética proliferativa, edema macular diabético y oclusión venosa retiniana,

Introducción

donde se puede ver una relación entre la sobreexpresión de VEGF y la patogénesis. Se ha podido comprobar cómo el uso intravítreo de BVZ tiene una diana similar específica a ranibizumab, anticuerpo monoclonal específico para este tipo de patologías, pero con la ventaja del coste económico del uso del BVZ, siendo la primera vez que se usó con tal finalidad en el año 2005 [34, 37, 38].

A pesar de su gran utilidad, hay determinados casos de cáncer donde los resultados son irrelevantes. De esta forma, la FDA decidió en el año 2010 no aprobar el CMM como indicación para el uso de BVZ. Además, su uso como coadyuvante no ha dado mejores resultados, como son los casos de prevención de recaída en estadio temprano de cáncer colorrectal (CCR) o el triple cáncer de mama negativo (3CM-) [39, 40]. El hecho de solo ver efectos positivos en el estadio 1 sugiere que la angiogénesis presenta diferentes rutas bioquímicas en función del grado de progresión, por lo que tendrá que ser tratado de diferente forma [40, 41].

Este hecho permite que la búsqueda de anticuerpos frente al VEGF sea un campo activo de investigación junto con el de mejora de la aplicabilidad de BVZ. De esta forma, las bibliotecas de fragmentos de anticuerpos sobre fagos filamentosos han adquirido gran importancia para la obtención de anticuerpos humanos por su robustez, bajo coste y gran potencial de automatización.

Introducción

3.1.4. Efectos adversos

El efecto secundario a destacar es la toxicidad renal, junto con las perforaciones gastrointestinales (siendo menos del 2%) como una de las más graves a las que se pueda exponer el paciente [41]. Otros efectos secundarios son la regresión basal en el páncreas, la tráquea, el tiroides, y el intestino delgado, hemorragia, incluyendo hemorragia pulmonar / hemoptisis, más frecuente en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico y tromboembolismo arterial, microangiopatía trombótica y toxicidad hematológica resultante en trombopenia y leucopenia [42]. Las patologías asociadas por los efectos secundarios más frecuentes son hipertensión, proteinuria, fatiga o astenia, diarrea y dolor abdominal, siendo los dos primeros dependientes de dosis en base a los análisis de seguridad clínica [43].

3.1.5. Forma farmacéutica, composición y excipientes

La forma farmacéutica en la que se presenta BVZ en el medicamento Avastin® es como una solución para perfusión, incolora y transparente, a concentración de 25mg/mL. Los excipientes que contienen son trehalosa dihidrato, fosfato sódico, polisorbato 20 y agua para inyectables [34, 43, 44].

3.2. CETUXIMAB

Cetuximab (CTX) es un anticuerpo monoclonal del tipo IgG1 quimérico con un peso molecular de 152 kDa. Su acción consiste en intervenir en el control de la supervivencia celular, la progresión del ciclo

Introducción

celular, la angiogénesis, la migración celular y la invasión celular/metástasis a través de la unión al factor de crecimiento epidérmico (EGFR) siendo esta su proteína diana [45].

3.2.1. Procedimiento de obtención y características

CTX fue validado para su uso terapéutico en toda la UE el 29 de junio de 2004 [46]. Para su producción, se requiere el uso de células de mamíferos (Sp2/0) a través de la tecnología del ADN recombinante. Estos cultivos se disponen en biorreactores con capacidad para 10,000 o 12,000 litros en condiciones aeróbicas por agitación. Para favorecer la obtención de una mayor concentración se incluye una etapa de mantenimiento. Tras el cultivo se procede a la purificación a través de una diafiltración a 0,2 μm , clasificándolos en lotes de fermentación en base al concentrado a granel. La solución, una vez estéril, se puede almacenar durante 1 año entre 2 a 8 °C. El producto final consiste en la dilución del lote concentrado a granel a una concentración de 2 mg/mL en la disolución tampón de formulación.

Desde el punto de vista genético, la codificación del anticuerpo depende en base a la región, es decir, la región variable del anticuerpo murino M225 y las regiones constantes de kappa humana y gamma 1. Dichos ADN complementarios son insertados en un vector de expresión que contiene la información para la síntesis de las cadenas ligeras y pesadas. Está formado por cuatro cadenas polipeptídicas, de las cuales dos son cadenas pesadas idénticas de 449 aminoácidos cada una, y las otras dos son cadenas ligeras idénticas de 214 aminoácidos cada una,

Introducción

estabilizadas entre sí por la unión de enlaces de tipo covalente y no covalente [47, 48].

3.2.2. Mecanismo de acción

La diana terapéutica de CTX es el EGFR, glicoproteína transmembrana de 170 kDa de peso molecular perteneciente a la familia ErbB. Presenta un dominio extracelular de unión a ligando, un dominio transmembrana y un dominio intracelular con función tirosina kinasa. Su unión con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o de crecimiento transformante (TGF- α) provoca la activación de la actividad tirosina kinasa intracelular [49, 50] fosforilándose a sí mismo. Dicha fosforilación desencadena una cascada de señales de transducción cuyo final será afectar a la síntesis de ADN, crecimiento celular y mecanismos de apoptosis, por lo que está implicado en el control de la supervivencia celular, la progresión del ciclo celular, la angiogénesis, la migración, la invasión o metástasis celular y la reducción de la capacidad de apoptosis.

La afinidad de CTX por el EGFR es del orden de 5 a 10 veces mayor que el de los correspondientes ligandos, por lo que su competencia por el receptor será mayor por el receptor y favorece la inhibición de la función del receptor. A pesar de ello, dicha afinidad no se aprecia con otros receptores de la familia HER [45].

La unión entre CTX y EGFR se traduce en la pérdida de función del receptor. En términos biológicos, esto se traduce en la activación reducida de la actividad tirosina kinasa, por lo que las funciones implicadas en el crecimiento y la metástasis tumoral, la proliferación

Introducción

celular, la supervivencia celular, la reparación del ADN, la angiogenia tumoral, la motilidad celular y la invasión celular se verán bloqueadas [45, 47, 51].

Como antitumoral, CTX inhibe la progresión del ciclo celular en muchas líneas celulares a nivel de la fase G1 del ciclo celular. Esto se debe al aumento de la expresión de p27kip1, inhibidor del ciclo celular cuyo aumento es atribuido a la presencia de este anticuerpo monoclonal. P27kip1 se une a la citoquina Cdk2, cuyo complejo impide el cambio de fase del ciclo celular [52]. Además, se produce la internalización del receptor del EGF, actuando como señalización de células efectoras inmunitarias citotóxicas hacia las células tumorales que expresan EGFR (ADCC), consiguiendo reducir la progresión de la enfermedad [53].

3.2.3. Aplicaciones

EGFR es un oncogén celular que actúa como indicador de pronóstico de la progresión de un tumor sólido, de tal forma que altos niveles de expresión de dicho oncogén está correlacionado con un peor pronóstico de la enfermedad. Con anterioridad, los estudios realizados planteaban la hipótesis de que el bloqueo del receptor mediante el uso de un anticuerpo generaría la inhibición del crecimiento celular y sería un buen agente terapéutico [54, 55].

Los datos disponibles sobre la efectividad de CTX en distintos tipos tumorales muestran inhiben el crecimiento de diversas líneas celulares cancerígenas de origen humano, entre las que se incluyen colon, cabeza y cuello, vejiga, mama y riñón. Los resultados in vivo son

Introducción

superiores a los obtenidos en estudios *in vitro*, indicando que CTX interviene en más funciones a parte de las descritas anteriormente. Su uso en combinación con quimioterapia citotóxica o radioterapia, demuestran que su actividad varía en función del tiempo y de la administración en paralelo de otros agentes quimioterápicos [47], obteniéndose mejores resultados su uso combinado.

Según fichas técnicas, su uso está autorizado para el tratamiento de pacientes con CCRm, con expresión del EGFR, con gen RAS de tipo nativo, en combinación con quimioterapia basada en irinotecán, en primera línea en combinación con FOLFOX y en monoterapia en aquellos pacientes en los que haya fracasado el tratamiento con oxaliplatino e irinotecán y que no toleren irinotecán.

El cáncer colorrectal es a nivel mundial el tercer tipo de cáncer más común en hombres, (10% del total de casos de cáncer) y, el segundo en mujeres (9,2% del total) [56]. En España (Figura 2) por el contrario, representa el cáncer más diagnosticado con un 14,98% del total de casos [57].

Introducción

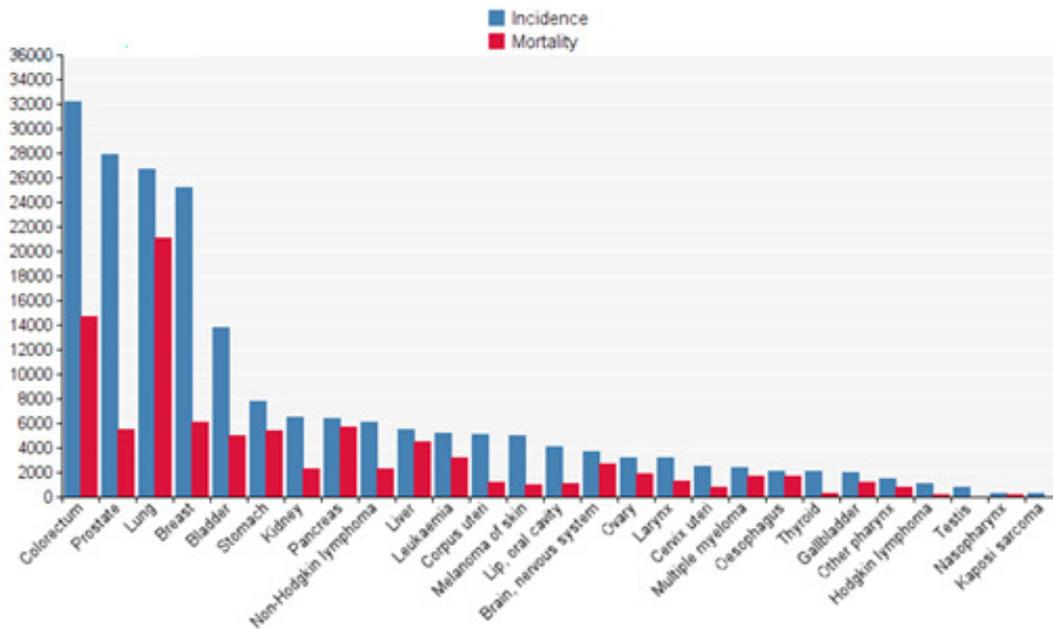


Figura 2. Incidencia y mortalidad del cáncer en España. (Fuente: GLOBOCAN, 2012).

En cuanto a los factores de riesgo del cáncer colorrectal se sabe que suelen estar relacionados entre sí. Así, cabe destacar la edad (más de 50 años) [58] y el estilo de vida, influyendo decisivamente el consumo de dietas hipercalóricas constituidas por carnes rojas, carbohidratos y almidones refinados, unidas al sedentarismo, consumo de tabaco y alcohol [59, 60]. Por otra parte, los factores genéticos representan un 15-20% de todos los casos de cáncer colorrectal destacando entre ellos los de componente hereditario como la poliposis adenomatosa familiar (PAF), cáncer colorrectal hereditario no polipósico (CCHNP) o las variantes I y II del síndrome de Lynch y una historia clínica de colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn [61]. Los genes que podemos encontrar alterados son los genes supresores de tumores como P53 y el gen deleciónado de cáncer de colon (DCC), protooncogenes como K-Ras o genes relacionados con la reparación del ADN como hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 y hMSH6.

Introducción

Por último y desde un punto de vista histológico, el adenocarcinoma es el más cáncer colorrectal más común (90-95% de los casos), cáncer que se origina a partir de un pólipo adenomatoso o adenoma de origen epitelial que mediante la acumulación de mutaciones pasa de ser un tumor benigno a convertirse en maligno llegando al nivel de adenocarcinoma. En la actualidad el cáncer colorrectal se estadifica mediante la clasificación TNM establecida por la AJCC [62].

El tratamiento del adenocarcinoma colorrectal depende del estadio TNM de la enfermedad. Este se basa en la cirugía, combinada o no con quimioterapia, radioterapia, ablación local o terapias dirigidas. La resección tumoral se realiza mediante técnicas de laparoscopia, que presenta grandes ventajas como son la reducción del dolor y el tiempo postoperatorio de recuperación. La radioterapia, a diferencia de la cirugía y quimioterapia, sólo está recomendada para cáncer de recto, aunque puede ser recomendada en T4 o cuando existe enfermedad residual tras la intervención quirúrgica, perforación local u obstrucción.

En cáncer de colon en estadios “0”, I y II, el tratamiento inicial es quirúrgico, realizándose la resección del tumor y en muchos casos de los nódulos linfáticos primarios y regionales mediante técnicas de laparoscopia. En el estadio III, el tratamiento consiste en cirugía y quimioterapia adyuvante. La combinación de fármacos denominada FOLFOX que está compuesta por leucovorina cálcica (ácido folínico), 5-FU y oxaliplatino es el tratamiento de elección. Por último, el tratamiento en el estadio IV depende de la localización de la metástasis y de la existencia de recidivas. En este estadio existen diferentes fármacos para quimioterapia y terapia dirigida que pueden usarse tanto solos como en

Introducción

combinación. Estos son el 5-FU, capecitabina, irinotecán, oxaliplatino, bevacizumab, FOLFOXIRI (combinación de irinotecán, oxaliplatino, leucovorina y 5-FU), cetuximab, aflibercept, ramucirumab, panitumumab, regorafenib y TAS-102 [63]. Entre ellos, el CTX, sobre todo en pacientes con resistencia a la quimioterapia [64-67] siempre y cuando sean portadores de tumores con KRAS no mutado [68-71] está ofreciendo una alternativa terapéutica de gran proyección para la mejora del pronóstico de estos pacientes.

El cáncer de pulmón (Figura 3) es el cáncer más frecuente a nivel mundial, manifestándose más en hombres que en mujeres y poseyendo la tasa de mortalidad más alta; una de cada cinco muertes producidas por cáncer es debida al cáncer de pulmón [56]. El principal factor de riesgo en el cáncer de pulmón es el tabaco, que contiene 60 carcinógenos reconocidos por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer [72]. Se estima que en individuos fumadores el riesgo de padecer cáncer de pulmón es unas diez veces mayor que en personas no fumadoras y que un 18% de los fumadores desarrollará la enfermedad. Según la clasificación histológica de la Organización Mundial de la Salud existen dos tipos de cáncer de pulmón: el cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) o microcítico y el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) o no microcítico [73]. El primero de ellos representa el 20% de los casos de cáncer de pulmón. Es el tipo más agresivo, y suele estar muy diseminado en el momento del diagnóstico [74]. El CPCNP por el contrario representa el 80% de los casos de cáncer de pulmón. Responde peor al tratamiento por quimioterapia y radioterapia en comparación con el tipo anterior, aunque es menos agresivo ya que su crecimiento y diseminación es más lento.

Introducción

Su tratamiento depende del estadio TNM en el que se encuentre el tumor. Los tumores quirúrgicamente resecables, son los tumores del estadio I, II y algunos del estadio III. En la enfermedad avanzada local, si el tumor es resecable, se puede aplicar t quimioterapia antes o después de la intervención y no son resecables se combinan quimioterapia y radioterapia, utilizando como fármacos de primera línea cisplatino y carboplatino en combinación con paclitaxel (PTX), gemcitabina o docetaxel. En cuanto al cáncer de pulmón metastásico incluyendo el estadio M1 se utiliza radioterapia sobre el tumor primario o quimioterapia combinando el platino con otros fármacos como son gemcitabina, docetaxel, paclitaxel o vinorelbina [75]. Estudios realizados con adenocarcinoma pulmonar humano, han sugerido que el uso de CTX permite reducir la expresión de los biomarcadores de la angiogénesis: VEGF y de IL-8. Cuando se usa endostatina en combinación con CTX su efecto antiangiogénico y antitumoral se ve incrementado [76]. Otras investigaciones demostraron que el uso de CTX agregado con un tratamiento estándar amplió el tiempo de supervivencia de los pacientes con este tipo de cáncer 1,5 meses más, con una tasa de supervivencia del 45% un año después de recibir dicho tratamiento [77].

Introducción

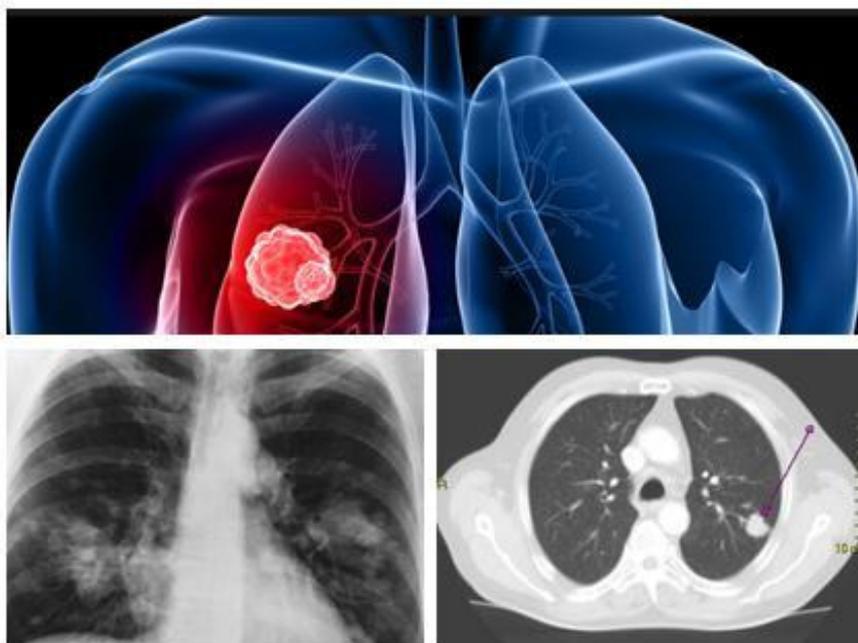


Figura 3. Representación de la localización de un tumor primario de pulmón. Detección de este tipo tumoral mediante radiografía (izquierda) y tomografía axial computarizada derecha).

El cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC) es el sexto más común en todo el mundo, cuyos principales factores de riesgo son el tabaco y consumo de alcohol, además por una infección subclínica por el virus del papiloma humano (HPV-16). El tratamiento clásico consiste en la quimiorradiación mediante el uso de cisplatino, desarrollando recurrencias locales y regionales en la mayoría de los pacientes y un 20 a 30% de metástasis. De esta forma, se está potenciando el uso de la combinación de agentes nuevos con los quimioterápicos convencionales, entre los que se incluye el CTX, en combinación con radioterapia para pacientes con la enfermedad localmente avanzada, y en combinación con quimioterapia basada en platino para aquellos pacientes en los que la enfermedad ha metastatizado. En pacientes con CCECC localmente avanzado, el uso de CTX tiene lugar una semana antes de la radioterapia, usándose hasta el

Introducción

final del tratamiento. El uso de CTX permite un aumento de la esperanza de vida (hasta 49 meses) [78]. En caso de que el paciente tenga metástasis, es tratado con CTX en combinación con la quimioterapia del cisplatino, siendo necesario esperar una hora tras la finalización de la perfusión de CTX para poder ser tratado con la quimioterapia, tras el cual se sigue usando CTX como un tratamiento de mantenimiento [45]. En este último grupo de pacientes, se ha visto que el uso combinado de CTX se traduce en una mejora de la supervivencia (hasta 10 meses) y una mejora de respuesta al tratamiento hasta el 36% superior en comparación con aquellos tratados únicamente con el agente quimioterapéutico [78].

3.2.4. Efectos adversos

Entre los efectos secundarios clínicamente relevantes más comunes de CTX se encuentran:

- Reacciones relacionadas con la perfusión, incluyendo reacciones anafilácticas, con resultado de muerte en algunos casos. Algunas de estas reacciones pueden corresponder a un síndrome de liberación de citoquinas (CRS). Los síntomas como broncoespasmo, urticaria, aumento o disminución de la tensión arterial, pérdida del conocimiento o shock pueden aparecer durante la primera perfusión y hasta varias horas después o en perfusiones posteriores. Las reacciones leves o moderadas relacionadas con la perfusión son muy frecuentes, incluyendo síntomas como fiebre, escalofríos, mareo o disnea, y presentan una relación temporal próxima sobre todo con la primera perfusión de CTX.

Introducción

- Trastornos respiratorios: se han notificado casos de enfermedad intersticial pulmonar, siendo la mayoría de los pacientes de población japonesa.

- Trastornos hepatobiliares: aumento leve a moderado en los niveles de enzimas hepáticas (ASAT, ALAT, fosfatasa alcalina) [46].

- Reacciones cutáneas: afectan a un 80 % de los pacientes aproximadamente [46] y que pueden volverse graves, especialmente en combinación con quimioterapia. Aumenta el riesgo de infecciones secundarias (principalmente bacterianas) y se han notificado casos del síndrome de la piel escaldada por estafilococos, fascitis necrotizante y sepsis, que en algunos casos pueden producir la muerte.

- Mucositis leve a moderada, detectado en el 93 % de pacientes con efectos secundarios [46].

- Alteraciones electrolíticas: hipomagnesemia grave (reversible después de interrumpir el tratamiento con CTX); hipopotasemia a consecuencia de la diarrea; hipocalcemia (aumentada cuando se utiliza en combinación con quimioterapia basada en platino).

- Neutropenia y complicaciones infecciosas relacionadas neutropenia febril, neumonía o sepsis.

- Trastornos cardiovasculares: frecuencia aumentada de acontecimientos cardiovasculares graves y a veces mortales y de muertes

Introducción

surgidas a raíz del tratamiento en la terapia para el cáncer de pulmón no microcítico, el CCECC y el CCR.

- Trastornos oculares: queratitis, inflamación ocular, lagrimeo, sensibilidad a la luz, visión borrosa, dolor ocular y/o enrojecimiento ocular.

3.2.5. Forma farmacéutica, composición y excipientes

Su formulación consiste en un concentrado incoloro, en el que cada vial de 20 mL y 100 mL contienen 100 mg y 500 mg de CTX respectivamente en el medicamento Erbitux®, de manera que la concentración final es de 5 mg/mL. Como excipientes contiene cloruro de sodio; glicina polisorbato 80; ácido cítrico monohidrato; hidróxido de sodio y agua para preparaciones inyectables [45].

3.3. INFLIXIMAB

Infliximab (IFX) es un anticuerpo monoclonal del tipo IgG1 quimérico con capacidad de unión al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), participe de procesos inflamatorios y autoinmunes, así como en el transcurso de infecciones [79].

3.3.1. Procedimiento de obtención y características

IFX se obtiene mediante el empleo de células recombinantes cultivadas en perfusión continua, procedimiento por el que se combina la

Introducción

región variable de un anticuerpo monoclonal de ratón con las regiones constantes de las cadenas pesadas y ligeras de la IgG1 humana, consiguiendo así que los porcentajes de origen murino y humano sea del 75% humano y 25% murino en la molécula.

3.3.2. Mecanismo de acción

La molécula diana, el TNF- α , es producida por las células en procesos inflamatorios, predominantemente por macrófagos y linfocitos. En la mayoría de las células y tejidos del ser humano existen dos receptores para el TNF: TNF-RI y TNF-RII, a los que se une el TNF- α para llevar a cabo el proceso inflamatorio. El IFX se une al TNF- α tanto en su forma soluble como una vez unido a su receptor bloqueando sus efectos, interrumpiendo la cascada de activación de las vías inflamatorias. Dicha unión tiene lugar a través de la región variable Fab, actuando la región constante Fc para reducir la antigenicidad.

La unión entre IFX y TNF- α es tan específica, que el anticuerpo monoclonal forma complejos de gran estabilidad que no se disocian tras la unión [79-82]. También actúa en la CDC y ADCC. Su peso molecular es de 149 kDa. Dos moléculas de TNF- α son capaces de unirse a una molécula de IFX, y en caso de homotrímero de TNF- α pueden ser unidos por hasta tres anticuerpos de IFX, bloqueando de esta forma todos los receptores de unión de TNF- α [79].

Dicha unión permite disminuir la inflamación por la reducción de componentes proinflamatorios en suero como la proteína C reactiva y la

Introducción

interleukina-6, acompañado de un descenso de células CD3 y CD68, moléculas de adhesión vascular 1, intercelular 1 y E-selectina.

3.3.3. Aplicaciones

El TNF- α , al ser el mediador principal en procesos inflamatorios y autoinmunes y participar en otros procesos como las infecciones, está involucrado en numerosas patologías como la enfermedad de Crohn (EC), artritis reumatoide (AR), artritis psoriásica, (APs), espondilitis anquilosante (EA), entre otras.

Desde que fue autorizado a ser usado, su empleo en el tratamiento de patologías en las que el TNF- α participa ha aumentado. En la siguiente Tabla hay una representación del conjunto de enfermedades a las que se aplican [83-88]:

Tabla 1. Enfermedades a las que se puede aplicar IFX y el resultado obtenido tras la aplicación.

ENFERMEDAD	RESULTADO
AR y otras enfermedades reumatológicas	Remisión de la sintomatología en los casos refractarios al tratamiento habitual, junto con bajo perfil inmunogénico
Enfermedad inflamatoria intestinal (EII), colitis ulcerosa (CU) y EC	Remisión de síntomas y descenso de fistulas en EC; descenso de inflamación en CU
sacroidosis sistémica complicada y enfermedad de Still	Remisión de la enfermedad

Introducción

(Continuación Tabla 1)

ENFERMEDAD	RESULTADO
síndrome de Behçet	Remisión de la enfermedad entre 10 semanas y 6 meses
lupus eritematoso sistémico (LES)	Restablecimiento niveles de IL-1 y de TNF mediante uso de IFX y Pentoxifilina
enfermedades dermatológicas	Eliminación de efectos adversos y tóxicos y remisión de la enfermedad tras 1 mes de tratamiento
Enfermedades neurológicas	Control del avance de la enfermedad

3.3.4. Efectos adversos

Los efectos adversos producidos por el uso de IFX hasta el momento son [89-93]:

- Reacciones en el punto de inyección (más frecuentes): eritemas, urticaria, prurito, etc.[80, 94, 95].

- Reacciones en la infusión: urticaria, prurito, dolor de cabeza, fiebre, escalofríos, taquicardia o disnea, lo que obliga en estos casos a recibir pre-medicación como antihistamínicos, paracetamol, o corticosteroides [80, 95].

- Infecciones respiratorias altas

- Cefaleas

Introducción

- Sinusitis

- Exantemas

- Infecciones graves: neumonías,

- Tuberculosis

- Neoplasias (Tumores sólidos y linfomas)

- Reacciones de hipersensibilidad aguda y retardada: fiebre, escalofríos, prurito, urticaria, disnea, hipo o hipertensión, etc.

- Problemas cardiovasculares

- Citopenias

3.3.5. Forma farmacéutica, composición y excipientes

IFX, en el medicamento Remicade® se presenta en estado liofilizado, conteniendo cada vial 100 mg de IFX, para ser reconstituido posteriormente con disolución para perfusión en 10 mL de agua para preparaciones inyectables, siendo por tanto la concentración del medicamento de 10 mg/mL. Una vez reconstituido, presenta un aspecto incoloro. Los excipientes que contiene son sacarosa; polisorbato 80; fosfato sódico monobásico y fosfato sódico dibásico [91].

3.4. RITUXIMAB

Rituximab (RTX) es un anticuerpo monoclonal quimérico del tipo IgG1 cuya función es la unión al antígeno CD20, que es una proteína transmembrana que forma un tetramero consistente en un canal de iones calcio que participa de la regulación de la activación de linfocitos B [96].

3.4.1. Procedimiento de obtención y características

RTX se obtiene mediante el uso de la ingeniería genética, a través de la cual se combina la región variable de un anticuerpo monoclonal murino con las regiones constantes de la IgG1 humana en un cultivo de células CHO en la forma de cultivo en suspensión, el cual se purifica mediante cromatografía de afinidad y de intercambio iónico junto con procesos de eliminación viral.

3.4.2. Mecanismo de acción

El mecanismo de acción involucra la unión de RTX a través de la región variable con el antígeno CD20 sobre-expresado en linfocitos B malignizados. Dicha unión presenta una afinidad y especificidad elevadas, cuantificada en 5,2 nmol/L [97]. Su peso molecular es de 145 kDa.

La unión antígeno-anticuerpo se ve involucrada en cuatro rutas encargadas de estas células cancerosas: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpo, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y efectos

Introducción

antitumorales producto de la apoptosis u otras rutas de muerte celular [97, 98]. La unión del fragmento constante (Fc) a las células cancerosas genera la reorganización de los antígenos CD20 en balsas lipídicas que provocan la activación de la ruta clásica del complemento, por lo que se activa la citotoxicidad dependiente del complemento, lisis de las células tumorales y se favorece un incremento de la actividad fagocítica. La interacción entre el fragmento constante Fc con receptores Fc gamma expresada en determinadas células como son las células NK, granulocitos y macrófagos, conlleva la activación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo [97].

3.4.3. Aplicaciones

RTX está indicado para los siguientes pacientes [89, 97, 99-102]:

Tabla 2. Relación de aplicaciones de RTX.

Enfermedad	Uso
Linfoma folicular	<ul style="list-style-type: none">- Paciente con linfoma no Hodgkin de baja recurrencia- Pacientes de progresión rápida de la enfermedad- Pacientes en estadio III-IV en monoterapia, quimiorresistentes o en recidiva tras quimioterapia
Linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL)	<ul style="list-style-type: none">- Pacientes con DLBCL en combinación con agentes quimioterápicos no tratados- Pacientes con recidiva en estadio III

Introducción

(Continuación Tabla 2)

Enfermedad	Uso
Leucemia linfocítica crónica	- Todos grupos de pacientes en combinación con agentes quimioterápicos
Artritis Reumatoide	- Pacientes con respuesta inadecuada o intolerante a inhibidores TNF en combinación con metotrexato
Granulomatosis con poliangéitis y poliangéitis microscópica	- En combinación con glucocorticoides

También se ha demostrado el desarrollo de anticuerpos anti-RTX en pacientes tratados con RTX, los cuales pueden sufrir reacciones alérgicas al ser tratados con posterioridad con otros anticuerpos. Se está investigando sobre el modo de superar dicha resistencia, siendo fundamentalmente el uso de adyuvantes inhibidores de las vías antiapoptóticas, entre los que se encuentran inhibidores de la histona deacetilasa, inhibidores químicos dirigidos, inhibidores del proteosoma, inhibidores selectivos de productos génicos antiapoptóticos y microRNAs [102], o el uso combinado con lenalidomida, inmunomodulador que potencia la ADCC, observando mejoría en pacientes con resistencia a RTX [103-106].

3.4.4. Efectos adversos

Las más comunes suelen ser reacciones relacionadas con la infusión [97]. Las más severas, incluyen broncoespasmos e hipertensión (en el 12% de los pacientes) [97]. Debido a esto, se recomienda una

Introducción

vigilancia durante las primeras 24 horas del tratamiento, momento en el que suelen aparecer este tipo de reacciones que, en caso de ser de mayor gravedad, se considera la suspensión del tratamiento [97].

Otros efectos adversos consisten en infecciones y efectos a nivel del sistema circulatorio y cardíaco [97]. También se han detectado casos en los que se ha reactivado el virus de la Hepatitis B, desarrollando hepatitis fulminante, insuficiencia hepática y muerte en algunos casos [97].

En tratamientos monoterápicos de 4 semanas con RTX, se han detectado citopenias leves y reversibles, acompañados de neutropenia, leucopenia y trombocitopenia [97]. Otros eventos incluyen trastornos del sistema respiratorio, trastornos gastrointestinales, trastornos cutáneos, trastornos metabólicos y trastornos del sistema nervioso [97, 99].

3.4.5. Forma farmacéutica, composición y excipientes

RTX se presenta en una disolución concentrada para preparar a partir de ella una disolución más diluida para perfusión. El aspecto de ambas disoluciones es de un líquido transparente e incoloro. Cada vial contiene 100 mg de RTX disueltos en 10 mL, por tanto su concentración es de 10 mg/mL. Los excipientes que contiene son citrato sódico, polisorbato 80, cloruro sódico, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico y agua para inyectables [99].

3.5. TRASTUZUMAB

Trastuzumab (TTZ) es un anticuerpo monoclonal del tipo IgG1 humanizado cuya diana terapéutica es el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2), receptor que estimula el crecimiento de las células tumorales que lo presentan y cuya sobreexpresión se observa en el 20 al 30% de los cánceres de mama primarios [107].

3.5.1. Procedimiento de obtención y características

TTZ es un anticuerpo monoclonal recombinante murino-humano, de 148 kDa de peso molecular, del tipo IgG1 kappa humanizado recombinante, con regiones estructurales humanas correspondiente a la estructura consenso de una IgG1 humana y regiones determinantes de complementariedad de un anticuerpo de tipo murino [108]. Su hallazgo se debe a Ullrich y colaboradores, que comprobaron su capacidad de bloqueo de la activación de HER-2 [109].

Para su producción es necesario el uso de células de ovario de hámster chino (CHO) obtenidas mediante ingeniería genética. Mediante técnicas recombinantes estandarizadas se procede a la inserción de la secuencia de ADN codificadora de TTZ en las células CHO. Dichas células son cultivadas en suspensión en un medio con gentamicina (un antibiótico que no es detectable en el producto final), donde el TTZ será secretado. Su producción conlleva un proceso de purificación mediante métodos cromatográficos, en concreto cromatografía de afinidad e

Introducción

intercambio iónico, junto con otros procesos como la inactivación viral específica y filtración [108].

3.5.2. Mecanismo de acción

La diana de TTZ es el HER-2, conocido también como c-erbB-2 o p185 Her-2/neu. Consiste en una glicoproteína transmembrana de 185 kDa de peso molecular con actividad tirosina kinasa. El gen que lo codifica presenta un alto potencial cancerígeno, relacionando su sobreexpresión con el desarrollo del cáncer.

La acción terapéutica de TTZ consiste en la activación del sistema inmunitario del organismo, y el bloqueo de la vía de señalización de HER-2, permitiendo la destrucción selectiva de las células cancerosas. A pesar de esto, existen diferencias entre los resultados obtenidos en estudios *in vitro* con los de estudios *in vivo*, por lo que su mecanismo de acción no está totalmente conocido [110]; aunque esto no afecta la alta afinidad y especificidad de TTZ con el subdominio IV ubicado en la región yuxtamembrana del dominio extracelular de HER-2. Además de conseguir la inhibición de la vía de señalización de HER-2, consigue evitar la activación de HER-2 mediante división proteolítica de su dominio extracelular.

El bloqueo de la señalización de HER-2 da lugar a una interrupción del ciclo celular en la fase G1. Estudios *in vitro* han demostrado otros cambios como el descenso en la modulación del receptor HER-2, inhibición del crecimiento de células tumorales, reversión de la actividad TK y reducción de la expresión de los factores

Introducción

de crecimiento [111]. También TTZ activa la respuesta ADCC donde intervienen células NK, macrófagos y neutrófilos, siendo mayor la capacidad de respuesta en células tumorales que sobre-expresan HER-2 que en aquellas en las que no lo sobre-expresan [107, 112, 113].

3.5.3. Aplicaciones

Son diversos los tipos de cáncer que contienen receptores de HER-2 en su superficie celular. Uno de ellos es el cáncer de mama, neoplasia maligna de elevada frecuencia, cuyo número de nuevos casos van aumentando (una media de 1,4 millones de nuevos casos por año). En España se diagnostican entre 15.000 a 20.000 nuevos casos cada año. Debido a la elevada cantidad de HER-2 en la superficie tumoral, se suele hablar de “positividad para HER-2”, detectada en el 15 al 20% de los casos, el cual es una forma muy agresiva del cáncer de mama [111].

El cáncer de mama es el segundo tipo de tumor más común a nivel mundial y el más frecuente en mujeres (25% de todos los cánceres diagnosticados) siendo la quinta causa por muerte por cáncer en ambos sexos [56].

Entre sus factores de riesgo destacan el sexo y la edad, afectando principalmente a mujeres (99% de los casos) [114] mayores de 40 años. Los antecedentes familiares (5-10% de los casos) y la predisposición genética (4-5% de los casos) son también factores de riesgo [115] Entre los genes más importantes implicados en esta predisposición genética se encuentran los protooncogenes BRCA1 y BRCA2 que una vez mutados aumentan el riesgo hasta un 60-85% y un 40-85%, respectivamente

Introducción

[115]. Por último, el componente hormonal (niveles anormalmente altos de estrógenos y hormonas sexuales esteroideas), la exposición a radiación o el estilo de vida (dieta poco saludable, tabaquismo, alcohol y sedentarismo) también están relacionados con su desarrollo [116].

La clasificación por estadios del cáncer de mama se establece fundamentalmente en base al tamaño del tumor y su capacidad de diseminación, siendo su estado TNM esencial para prescribir el tratamiento [117]. Los estadios TNM marcan la pauta de tratamiento de forma que en estadios tempranos el tratamiento de elección es la cirugía [117] tras la que se puede aplicar también radioterapia y terapia sistémica. De hecho, la radioterapia ha demostrado que junto a la cirugía conservadora de la mama consigue una supervivencia similar a la mastectomía radical [118]. La terapia sistémica depende del estadio y del patrón molecular [119] siendo de usos habitual el tamoxifeno (pacientes RE+ o RP+), tratamientos hormonales (pacientes RE+ o RP+), trastuzumab (pacientes HER2+) o quimioterápicos (pacientes RE-, RP- y HER2- “cáncer de mama triple negativo”) como paclitaxel, docetaxel, doxorubicina (DOX), epirrubicina o ciclofosfámidica en combinación con docetaxel. En cuanto al cáncer de mama metastásico el tratamiento se basa en terapia hormonal (tamoxifeno e inhibidores de la aromatasas generalmente para pacientes postmenopáusicas), terapias dirigidas (trastuzumab, lapatinib, etc.), quimioterapia (antraciclinas, taxanos, fluoropirimidinas, etc.) y cirugía más radioterapia en metástasis sintomáticas limitadas [117]. La FDA aprobó su uso para el cáncer de mama metastásico (CMM) que sean HER-2 positivos, debido a que el biofármaco tiene actividad antitumoral sólo en aquellas células con sobre-expresión de HER-2 [120]. En este caso, TTZ puede ser

Introducción

administrado en monoterapia para el tratamiento de aquellos pacientes que hayan recibido al menos dos regímenes quimioterápicos para su enfermedad metastásica, en combinación con paclitaxel para el tratamiento de aquellos pacientes que no hayan recibido quimioterapia para su enfermedad metastásica y en los cuales no esté indicado un tratamiento con antraciclinas, en combinación con docetaxel para el tratamiento de aquellos pacientes que no hayan recibido quimioterapia para su enfermedad metastásica, y en combinación con un inhibidor de la aromatasas para el tratamiento de pacientes posmenopáusicas con CMM y receptor hormonal positivo, que no hayan sido previamente tratadas con TTZ [107]. En caso de monoterapia, la quimioterapia previa debe haber incluido una antraciclina y un taxano siempre y cuando su uso esté permitido en el paciente.

TTZ también está indicado para el tratamiento de pacientes adultos con cáncer de mama precoz (CMP) con positividad de HER-2 después de cirugía, quimioterapia (adyuvante o neoadyuvante) y radioterapia (si procede), después de quimioterapia adyuvante con doxorubicina y ciclofosfámidas, en combinación con paclitaxel o docetaxel, en combinación con quimioterapia adyuvante consistente en docetaxel y carboplatino, y en combinación con quimioterapia neoadyuvante seguido de tratamiento en adyuvancia con Herceptin® para enfermedad localmente avanzada (incluyendo enfermedad inflamatoria) o tumores con un diámetro superior a 2 cm.

El uso de TTZ, tanto en monoterapia como en combinación con los agentes quimioterápicos tradicionales, ha permitido mejorar la supervivencia global, la tasa de respuesta y la supervivencia sin

Introducción

enfermedad, manteniendo a la vez la calidad de vida de pacientes con cáncer de mama con positividad de HER-2, demostrando de esta manera su eficacia independientemente del estadio tumoral [120, 121].

También se está usando una combinación entre TTZ y DM1, un citotóxico inhibidor de microtúbulos derivado de la maitansina, un macrólido que puede aislarse de las plantas del género *Maytenus*. Ambos estarían unidos entre sí mediante enlaces del tipo covalente. Sus propiedades farmacodinámicas indican que presenta la misma afinidad por HER-2 que el monoclonal por sí sólo, mientras que estudios in vitro han demostrado diferencias a nivel de la actividad antiproliferativa y citotóxica, siendo mayor para el conjugado. Incluso, el uso de este conjugado ha demostrado su efectividad antiproliferativa en células resistentes al tratamiento con TTZ.

Su uso está indicado en pacientes adultos con cáncer de mama positivo para HER-2 en situación metastásica que hayan sido tratados con TTZ y un taxano tanto por separado como en combinación, siempre y cuando cumplan uno de los siguientes requisitos:

- haber recibido tratamiento previo para la enfermedad localmente avanzada o metastásica
- haber manifestado recurrencia de la enfermedad durante el tratamiento adyuvante o en los seis meses siguientes a su terminación.

La dosis recomendada del conjugado es 3,6 mg/kg de peso del paciente, el cual se administra por perfusión en ciclos de 21 días, los

Introducción

cuales continuarán hasta progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable [122-124].

3.5.4. Efectos adversos

Por lo general, TTZ suele ser bien tolerado por la inmensa mayoría de los pacientes. A pesar de ello, existen algunos efectos secundarios a tener en cuenta [107, 108, 121]:

Tabla 3.Efectos adversos TTZ.

Momento	Síntomas
Perfusión	<ul style="list-style-type: none">- Escalofríos- Fiebre- Náuseas- Vómitos- Aumento de la tensión muscular- Dolor de cabeza- Dificultad respiratoria- Respiración silbante o “pitos”- Arritmias- Latido cardíaco irregular- Anafilaxia- Hinchazón de cara y labios- Enrojecimiento- Sensación de cansancio
No perfusión	<ul style="list-style-type: none">- Problemas cardíacos por debilitamiento del músculo cardíaco

Introducción

(Continuación Tabla 3)

Momento	Síntomas
En general	<ul style="list-style-type: none">- Diarrea- Debilidad- Dolor torácico y abdominal- Dolor de articulaciones- Reacciones alérgicas- Descenso de células sanguíneas- Hematotoxicidad- Estreñimiento- Dispepsia- Infecciones- Alteración renal- Insomnio- Somnolencia- Hemorragias nasales- Problemas respiratorios- Depresión

3.5.5. Forma farmacéutica, composición y excipientes

TTZ se presenta como polvo liofilizado de color blanco pálido para ser reconstituida con agua estéril hasta una concentración final de 21 mg/mL por cada vial. Los excipientes que contienen son L-histidina hidrocloreto; L-histidina; α,α -trehalosa dihidrato y polisorbato 20 [107].

4. AGREGACIÓN EN PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS

En el caso de las proteínas terapéuticas, los agregados son un factor de riesgo importante para las respuestas inmunitarias dañinas en los pacientes y pueden ser el resultado de diversos mecanismos. Por lo

Introducción

tanto, el control de la agregación puede permitir un mejor diseño de la estabilidad terapéutica de la proteína, además de las estrategias existentes que abordan las estructuras y funciones de la proteína, subrayando la importancia de equilibrar el entorno proteico con la tendencia a la agregación de cadenas de polipéptidos.

Los agregados se consideran una impureza que debe permanecer dentro de las especificaciones del producto para cumplir con los requisitos reglamentarios, aunque algunos coexisten con la forma monomérica, como es el caso de BVZ, donde la forma agregada se considera como un agregado natural fruto de la elevada concentración [125, 126]. Sin embargo, recientemente, ha habido una creciente preocupación y evidencia de que la presencia de proteínas agregadas (incluyendo proteínas humanizadas o totalmente humanizadas) puede aumentar significativamente el riesgo de que un paciente desarrolle una respuesta inmunogénica al monómero de la proteína activa. Esto puede llevar a que el paciente se vuelva "inmune" al medicamento, es decir, que el medicamento ya no sea eficaz para el paciente, y en raras ocasiones también pueda conducir a graves problemas de seguridad [127].

Es importante destacar la existencia de dos tipos de agregaciones: reversible e irreversible. A partir del estado monomérico plegado, las proteínas pueden formar reversiblemente pequeños dímeros y oligómeros que son complejos estables que pueden separarse del monómero o están en equilibrio dinámico (K_d) con el estado monomérico:

$$K_d = \frac{[\text{monómero}]^2}{[\text{dímero}]}$$

Introducción

Cuando se trabaja en concentraciones cercanas al valor de K_d para una proteína dada, el monómero y el dímero coexisten en cantidades similares en solución. Cuando se trabaja en concentraciones muy por debajo de K_d , los dímeros son metaestables a los monómeros. Los medicamentos biotecnológicos, como los mAbs, suelen tener altos valores de K_d [128]. Por lo tanto, no se observan dímeros y oligómeros nativos hasta concentraciones muy altas, o no se observan en absoluto hasta el límite de solubilidad de la proteína [129, 130]. En algunos casos, los dímeros y oligómeros estables son una especie predominante y duradera [128].

Los núcleos se definen como el tamaño de agregado irreversible neto más pequeño; el crecimiento de los núcleos para formar agregados solubles que abarcan escalas de longitud del orden de 10 a 102 nm ocurre principalmente mediante la adición de otros monómeros parcialmente desplegados (arriba a la derecha) o por la aglomeración de agregados existentes (abajo a la derecha). Los agregados pueden hacerse visibles a simple vista si son lo suficientemente grandes y / o se someten a una separación de fases. Si el despliegue / agregación está mediado por la adsorción de proteínas a interfaces en masa, y / o cambios químicos como la desamidación, oxidación y otras reacciones o fragmentación. Los pasos adicionales también pueden ser cinéticamente importantes en los posibles mecanismos de agregación.

Además, se pueden agregar proteínas para formar especies irreversibles que no son fácilmente dissociables a menos que estén expuestas a concentraciones extremadamente altas de desnaturalizantes químicos [131, 132], presión [128] y/o temperatura [131]. En estos casos,

Introducción

las proteínas agregadas han perdido parte o toda su estructura nativa secundaria y/o terciaria, lo que les permite establecer contactos múltiples muy fuertes (por ejemplo, interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno) entre proteínas mediante la intercodificación de múltiples cadenas de proteínas.

La Figura 4 ilustra que el proceso de iniciación de estos agregados "no nativos" implica que dos o más proteínas están "mal dobladas" para formar una red estable e irreversible que puede agrandarse a través de diferentes mecanismos, [128], de tal forma que los agregados pueden finalmente formar partículas macroscópicas [128]. El proceso de nucleación, paso necesario para la formación de este tipo de agregados, suele ser un proceso limitado cinéticamente que puede llevar escalas de tiempo extremadamente largas (de minutos a años). En muchos casos la nucleación consiste en el despliegue parcial de las formas monoméricas seguida de una asociación lenta de dos o más cadenas para formar los núcleos [128], asumiendo que a altas concentraciones de proteínas la asociación ocurre antes del despliegue [133]. Si el crecimiento de estos agregados se logra añadiendo monómeros, entonces aquellos parcialmente desplegados pueden añadirse más fácilmente a los agregados existentes [134]. En cualquier caso, el cambio en las interacciones entre las diferentes especies en solución (monómeros, agregados de diferentes tamaños) varía la velocidad de cada fase del proceso. Además, los agregados irreversibles o estables pueden provocar cambios inesperados en la viscosidad de la solución en función de la concentración de proteínas [128].

Introducción

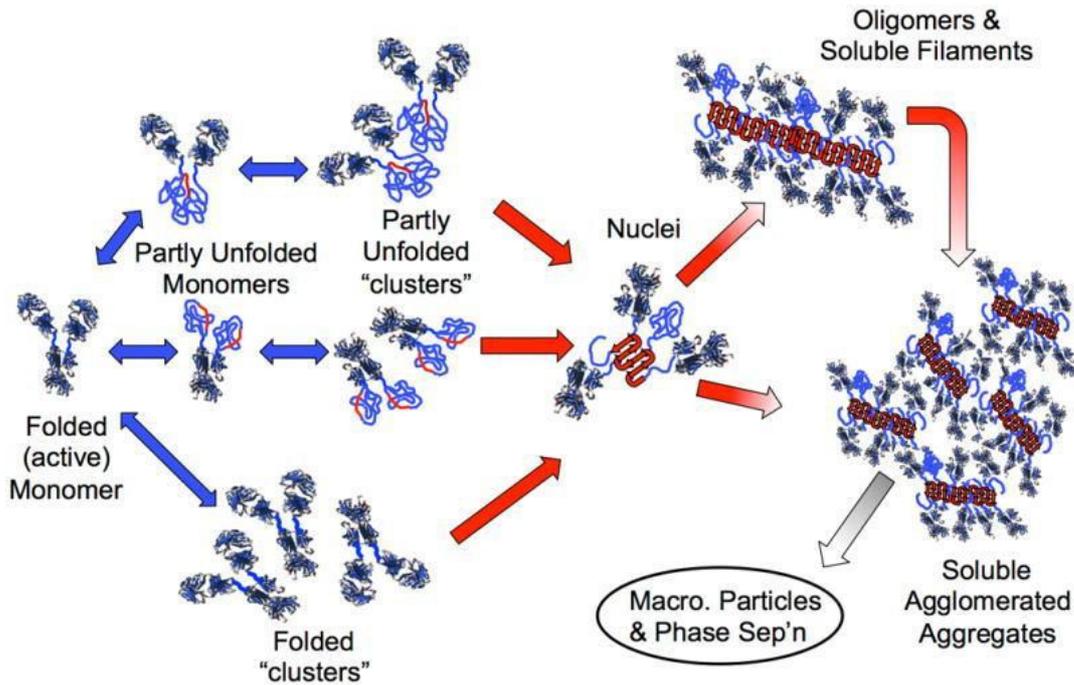


Figura 4. Múltiples vías de agregación no nativas para una proteína de múltiples dominios (ejemplo un mAb). Las hebras rojas denotan secuencias de "puntos calientes" que son propensas a formar contactos interproteicos fuertes y efectivamente irreversibles que estabilizan los agregados, pero que están principalmente ocultas en monómeros completamente plegados. (Fuente: Roberts et al. (2014)).

En algunos casos, la agregación reversible nativa es una ventaja importante para la calidad del producto, ya que los oligómeros nativos tienen una mayor estabilidad y una solubilidad potencialmente mayor que sus homólogos monómeros. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la agregación se considera una desventaja potencial para la calidad del producto. Si la proteína permanece plegada después de la agregación (y por lo tanto es probable que se produzca una agregación reversible), los principales problemas de agregación son típicamente uno o más de los siguientes: i) solubilidad limitada, que puede, por tanto, requerir concentraciones bajas de proteínas y limitar la dosis máxima que puede administrarse por vía intravenosa o por vía subcutánea, ii) cambios en la

Introducción

viscosidad de la solución que pueden afectar en su administración. En el caso (ii) si los agregados son compactos (por ejemplo, microcristales o nanopartículas amorfas densas [135]), la viscosidad debería disminuir con la agregación, ya que las proteínas tienen un menor volumen neto excluido. Sin embargo, si consideramos los agregados que se comportan como estructuras extendidas que pueden entrelazarse entre sí, se prevé un aumento de la viscosidad como resultado de la formación del agregado [130]. Esto resalta que la "naturaleza" de los agregados formados es también importante para la predicción cualitativa del impacto positivo o negativo de la agregación en la calidad del producto. Si los agregados son irreversibles, se consideran al menos como un producto de degradación que debe controlarse a un nivel muy bajo (normalmente un poco más o menos de un porcentaje, dependiendo de la masa proteica total). Además, de la preocupación sobre el riesgo de que los pacientes desarrollen respuestas inmunogénicas al fármaco si permanecen en la sangre agregados irreversibles parcialmente plegados y provocan una respuesta inmunitaria [128]. En este caso, los pacientes pueden volverse "inmunes" al medicamento o, en el peor de los casos el paciente puede desarrollar una enfermedad de tipo autoinmune [128].

Por tanto, el conocimiento de los factores que afectan a la agregación de los mAbs terapéuticos así como su control, es crucial durante todo el ciclo de vida de los mismos, desde su producción hasta su administración al paciente, para garantizar tanto la eficacia como la seguridad del correspondiente medicamento biotecnológico.

Introducción

4.1. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD EN MEDICAMENTOS DE USO HUMANO. REQUERIMIENTOS OFICIALES. GUÍAS ICHs

Para hablar sobre la estabilidad de un medicamento en primer lugar habría que definir el concepto de “estabilidad” del mismo, que es la capacidad que tiene un medicamento o un principio activo de mantener por un determinado tiempo sus propiedades originales dentro de las especificaciones de calidad existentes. Íntimamente unido a este concepto se encuentra “la fecha de caducidad” que se define como el periodo de tiempo durante el cual el medicamento mantiene un mínimo del 90 % de principio activo sin que se aprecien modificaciones físicas ni desarrollo microbiano [136].

En el caso de los medicamentos biotecnológicos, debido a su naturaleza proteica o polipeptídica, su estabilidad es bastante más compleja que la de los medicamentos tradicionales dado que son estructuras cuya actividad biológica y/o funcional depende de fuerzas tanto covalentes como no covalentes que fácilmente pueden ser desequilibradas. De tal forma, son más sensibles a factores ambientales como son la temperatura, humedad y luz, a la oxidación, al contenido iónico y agitación que los fármacos de síntesis química, por lo que se requieren unas condiciones estrictas de almacenamiento para evitar su degradación y conseguir mantener la actividad biológica [137].

Esta inestabilidad puede ser originada por numerosos aspectos que pueden agruparse en varios tipos como se indica en la siguiente Tabla:

Introducción

Tabla 4. Factores que causan la inestabilidad (Fuente: Suárez, 2017).

TIPO DE INESTABILIDAD	DEFINICIÓN
Físico	Alteración de las propiedades mecánicas y el aspecto de las diferentes formas de dosificación
Químico	Degradación del principio activo que conllevan a la pérdida de la eficacia y/o formación de productos de degradación tóxicos que, además de alterar la eficacia, puede conllevar riesgos para la salud del paciente
Biológica	Pérdida de actividad del medicamento y producción de desarrollo microbiano por encima de los límites permitidos
Biofarmacéutica	Cambios en la biodisponibilidad del medicamento

Debido a la gran diversidad de factores que influyen en la inestabilidad, los estudios para asegurar su eficacia, calidad y bioseguridad a lo largo de todas las etapas son de vital importancia, por lo que cualquier modificación realizada en el medicamento tiene que ser revisado y evaluado bajo estos conceptos. Por la complejidad estructural que los biofármacos presentan, las pruebas de evaluación de la estabilidad requieren de numerosos métodos analíticos, que son

Introducción

complejos en muchos casos y necesitan ser-ortogonales entre sí, debido a que se tiene que comprobar una amplia variedad de características físico-químicas y funcionales. Por todo ello, han de incluirse en los estudios análisis inmunoquímicos, análisis de diferentes aspectos de la entidad molecular (la proteína) así como detección cualitativa y cuantitativa de los productos de degradación, entre otros.

Existen diferentes organismos internacionales que se ocupan de la seguridad de los medicamentos de uso humano que se comercializan, y por tanto de los requerimientos para el cumplimiento de la estabilidad de los mismos. En 1990 tuvo lugar la constitución de la *International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use* para armonizar la normativa mundial de seguridad, efectividad y calidad de los medicamentos desarrollados y registrados para uso humano [138]. Desde entonces, en esta conferencia participan las agencias del medicamento de Europa, Japón y EE.UU, constituyéndose en una organización internacional generadora de guías y recomendaciones unificadas para su cumplimiento por parte de las industrias farmacéuticas, de manera que se asegure la calidad de los medicamentos comercializados en los países que adoptan el cumplimiento de lo indicado en las correspondientes guías.

Existen además otros organismos internacionales que establecen recomendaciones para la evaluación de los medicamentos biotecnológicos, como es la FDA [139] o al EMA [2] o incluso sistemas nacionales de salud, como el NHS (National Health System) del Reino

Introducción

Unido [140]. No obstante, en general, todos ellos parten de las indicaciones generales recogidas en las guías de la organización ICH.

Entre otras, las guías ICH establecen recomendaciones sobre el desarrollo de los estudios de estabilidad en biofármacos. Concretamente, las guías Q5A a Q5E [141] están dirigidas a la calidad de los productos biotecnológicos (Quality of Biotechnological Products). Dentro de ellas, la guía Q5C [141] tiene como propósito armonizar sobre los estudios requeridos para la evaluación de la estabilidad de los productos biotecnológicos/biológicos (Stability Testing of Biotechnological/Biological Products). Y concretamente la guía Q6B [141] (Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products) indica qué tipo de caracterización y qué tipo de análisis deben de realizarse para poder realizar una adecuada descripción de la estabilidad de un medicamento y/o producto farmacéutico biotecnológico. Se destacan en ella, como aspectos importantes en la caracterización de los medicamentos y productos biotecnológicos, el estudio de propiedades físico-químicas y de la actividad biológica. De forma explícita recomienda **el empleo de la cromatografía líquida de exclusión por tamaños (SEC) para el estudio de los pesos moleculares o del tamaño (detección de agregados)** así como del empleo de **ensayos biológicos basados en el empleo de cultivos celulares y/o ensayos bioquímicos basados en interacciones inmunológicas** (técnicas de inmunoensayo, por ejemplo ELISA). Son estos dos aspectos de crucial importancia en la caracterización de anticuerpos monoclonales terapéuticos los que se abordan en esta Tesis Doctoral.

Introducción

Una vez indicados los aspectos necesarios a ser evaluados en la caracterización de este tipo de productos biotecnológicos, la guía ICH Q2R1 (*Validation of analytical procedures: test and methodology*) [141] establece las recomendaciones a la hora de validar los métodos de análisis empleados en la caracterización de los biofármacos. Aspecto distintivo de introducido en esta guía, es la necesidad de realizar estudios específicos de degradación controlada del medicamento, con dos objetivos fundamentales:

- (1) Establecer pautas de degradación que abunden en su conocimiento, para por ejemplo, establecer adecuadas recomendaciones de uso del mismo.
- (2) Validar el propio método de análisis para el objetivo requerido. En el caso de esta Tesis Doctoral, validar el método para la detección de agregados, de manera que cuando estos estén presentes en posteriores estudios de estabilidad, pueden ser identificados incluso en presencia de producto sin degradar, de monómero.

Los estudios de degradación controlada, acelerada o estudios de estrés son por tanto cruciales en los estudios de desarrollo de medicamentos, incluidos los biotecnológicos [142]. En el caso concreto de la degradación por efecto de la luz visible, existe una guía de recomendaciones sobre como degradar controladamente el medicamento: la ICH Q1B (*Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products*) [141]. En ella se establecen las características de fotoestabilidad a evaluar para evitar daños por exposiciones

Introducción

inadecuadas a la luz [143], lo cual va a permite detectar los posibles cambios en las propiedades físicas del mismo o la producción de degradación fotoquímica [143-145], que con mucha probabilidad va a implicar la formación de agregados del mAb terapéutico. Este aspecto también ha sido considerado en esta Tesis, tanto degradación acelerada por efecto de la luz, como la degradación por efecto de diversos factores que permiten un mayor conocimiento del comportamiento de los medicamentos estudiados, siempre desde la perspectiva de la formación de órdenes superiores de la proteína, como lo son los agregados.

4.2. PERFIL INDICADOR DE ESTABILIDAD

Dada la complejidad estructural de los fármacos biotecnológicos, y tal y como acaba de ser indicado anteriormente, son varios los parámetros que actúan como indicadores de estabilidad de un biofármaco [137], por lo que el *perfil indicador de estabilidad* será establecido para cada medicamento en función de sus características particulares. Este perfil de estabilidad debe de permitir detectar pequeños cambios en cuanto a la identidad, pureza y actividad biológica. La evaluación de la pureza absoluta de un producto biotecnológico es difícil de determinar debido a multitud de reacciones que pueden darse, como reacciones post-traslacionales de glucosilación, desamidación, entre otras. Una estrategia para evaluar la estabilidad, es determinar la pureza en base a métodos de determinación de productos de degradación, por lo que nuevamente los estudios de degradación acelerada son de especial interés.

De esta forma, los métodos empleados para la caracterización físico-química, bioquímica e inmunoquímica de un fármaco

Introducción

biotecnológico conforman el conjunto de métodos del *perfil indicador de estabilidad* de dicho compuesto. Estos métodos deben permitir evaluar tanto aspectos intrínsecos al propio fármaco (peso molecular, carga, hidrofobicidad), como los productos formados por procesos degradativos fruto de reacciones de diversa índole, como desamidación, oxidación, sulfo-oxidación, agregación o fragmentación durante el almacenamiento, así como la actividad biológica del medicamento en su forma de comercialización. Junto con estos métodos, que en general van a implicar un cierto o elevado grado de complejidad, un análisis de cambio visual del producto, como cambios de color, textura y aparición de partículas visibles en disoluciones, ha siempre de llevarse a cabo.

Por otra parte, para el establecimiento de las fechas de caducidad, también se indica el uso de los estudios de degradación aceleradas los cuales proporcionan datos útiles no sólo para establecer la fecha de caducidad del producto, sino también -como ya ha sido indicado previamente- en aspectos sobre su estabilidad, en la validación de métodos analíticos para el estudio de estabilidad, o generar información que pueda ayudar a elucidar el perfil de degradación del fármaco o del medicamento biotecnológico. El conjunto de métodos comprendidos en el *perfil indicador de estabilidad* han de emplearse en cualquier tipo de estudios de estabilidad, que podrá hacerse de forma más o menos rigurosa dependiendo de la situación estudiada, comercialización o uso hospitalario [137].

Para un anticuerpo monoclonal terapéuticos, algunas de las propiedades físico-químicas que definirán su *perfil de estabilidad* son el **peso molecular**, el perfil de isoformas, **el perfil de agregación**, y el

Introducción

contenido de proteína entre otras. Desde un punto de vista estructural, la estabilidad de una proteína vendrá dada por el mantenimiento de la estructura primaria, secundaria y terciaria. Los estudios de la actividad biológica también formarán parte siempre del *perfil indicador de estabilidad* de este tipo biofármacos.

Los métodos empleados en el *perfil indicador de estabilidad*, independientemente de su número, deben cumplir unas especificaciones particulares para cada uno, y poder ser validados como indicadores de estabilidad, siguiendo con los dictámenes de las guías ICH anteriormente citadas. Entre los procedimientos para validar estos métodos, los estudios de degradación acelerada son fundamentales, ya que permiten evaluar, además de las rutas de degradación del mAbs, la propia capacidad del método de análisis para “distinguir” el mAbs sin degradar de la fracción degradada. Un método de análisis que no demuestre su capacidad de detección de agregados y fragmento no es viable en un estudio de estabilidad centrado en la detección del proceso de agregación, por ejemplo. Y no siempre un método de análisis va a poder ser validado para analizar diferentes aspectos requeridos en el perfil de estabilidad de los mAbs.

4.3. TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DEL PERFIL DE AGREGACIÓN

El estudio de agregaciones y/o degradaciones ha sido llevado a cabo clásicamente mediante la cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaños ((SE)HPLC o SEC) acoplada a detector de ultravioleta visible. Actualmente es la técnica de elección en el control de

Introducción

calidad de los procesos de fabricación de proteínas terapéuticas, dada su gran sensibilidad y eficacia en el análisis de monómeros, dímeros y estados menores de agregación.

No obstante, la técnica SEC está limitada a la detección de estados menores de agregación, no llegando a las 10 unidades de monómeros debido a las especificaciones técnicas de las columnas SEC analíticas desarrolladas actualmente. Esta técnica es idónea por tanto para la determinación y cuantificación de monómeros, dímeros y ordenes hasta 8/10 entidades de proteína (mAbs) agregadas, dependiendo de la columna cromatográfica empleada. Presenta el inconveniente por tanto de no detectar órdenes mayores de agregación, entre los que se encuentran los que dan lugar a la respuesta inmunogénica grave (tamaño aproximadamente de 50 μm).

Dado que en una disolución de un proteína, como lo son los mAbs, pueden encontrarse partículas en un amplio intervalo de distribución de tamaños, desde los monómeros hasta los agregados visibles, para un estudio exhaustivo del particulado de las disoluciones de los mAbs terapéuticos deben de ser empleadas un conjunto de técnicas que cubran todo le intervalo de tamaños posibles, es decir, desde el tamaño de los monómeros (del orden de los nanometros) hasta los agregados visibles (mayores de 100 μm). En la Tabla 5 se recoge algunas de las técnicas empleadas actualmente en el estudio del particulado, indicando algunas de sus ventajas así como el intervalo de tamaño que permiten evaluar. A destacar entre estas técnicas, por su amplio uso la dispersión dinámica de luz (DLS), que permiten obtener una estimación de la distribución del particulado presente en la disolución, aunque

Introducción

presenta como desventaja el ser una técnica cualitativa, no pudiendo cuantificar, lo cual sí es posible mediante SEC. La ultra centrifugación analítica (AUC) es también habitual en el estudio de los tamaños de los agregados de proteínas, y se obtiene una estimación del peso molecular correspondiente, no obstante presenta como desventaja que es una técnica cara, requiere de habilidades del operador y la cuantificación tampoco es posible. Mediante la técnica de microscopía de imagen de flujo (MFA) se pueden analizar agregados de orden superior, los denominados agregados insolubles, la resolución de la técnica va a depender fuertemente de la cámara empleada.

Tabla 5. Características de diferentes técnicas empleadas para la caracterización de agregados/particulado.

	SEC	DLS	AUC	MFA
Sensibilidad	Alta	Alta	Baja	Baja
Tamaño de detección	1-50 nm	1-5 μm	1-100 nm	1-400 μm
Objetivo	Agregados solubles pequeños (monómeros, dímeros, hasta 8 unidades según columna)	Agregados solubles pequeños hasta grandes	Agregados solubles pequeños a tamaño intermedios	Agregados insolubles

Introducción

(Continuación Tabla 5)

	SEC	DLS	AUC	MFA
Información	<p>Cuantificación</p> <p>Estimación del tamaño</p>	<p>Estimación de la distribución de tamaños</p> <p>Radio hidrodinámico</p>	<p>Estimación del tamaño</p>	<p>Estimación de la forma y tamaño</p>

(1) Cromatografía de exclusión por tamaño; (2) Dispersión dinámica de la luz; (3) Ultra centrifugación analítica; (4) Microscopía de imagen de flujo.

No obstante, y aceptando que ninguna técnica es válida para analiza toda la distribución de tamaños a que da lugar el proceso de agregación proteica, la gran ventaja de la SEC es su alta reproducibilidad y la posibilidad de abordar la cuantificación de los monómeros con elevados grados de exactitud y sensibilidad, así como la completa discriminación de estos de los dímeros, etc.

4.4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN EN EL ANALISIS DE mAbs DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑOS

Según la definición de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines, se define cromatografía como el método físico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases: fase estacionaria y fase móvil, siendo la primera fija y la segunda en movimiento continuado en un sentido determinado [146]. La

Introducción

cromatografía líquida de alta resolución acoplada a diversos detectores (UV-visible, fluorescencia, o espectrómetro de masas) es una técnica bien establecida y conocida para la caracterización físico-química de proteínas en general y de mAbs terapéuticos en particular. [147].

En función de la propiedad físico-química estudiada de las proteínas (tamaño, carga, adsorción, solubilidad, estabilidad térmica, entre otros) se utilizan diferentes tipos de cromatografía líquida [148-150]. Así pues, entre otras, se encuentran:

- *Cromatografía de intercambio iónico (Ion Exchange Chromatography, IEC)*: permite la separación de las moléculas en función de la carga iónica neta mediante el uso de polímeros de intercambio iónico, los cuales retienen a los solutos gracias a fuerzas electrostáticas. La fase estacionaria lleva en su superficie cargas electrostáticas fijas que retienen contraiones móviles, los cuales pueden intercambiarse por iones de la fase móvil. De esta forma, la separación se lleva a cabo por competencia entre proteínas con distinta carga superficial por grupos con carga opuesta sobre una matriz de intercambio iónico. En la actualidad, se trata de unas de las técnicas con fines de purificación más usadas, tanto en cromatografía de tipo preparativa [147-149] como en cromatografía analítica, cuya finalidad es el análisis de isoformas de un mismo o distintos anticuerpos monoclonales [151-153].

- *Cromatografía de afinidad*: basada en la inmovilización de un polímero de tipo líquido sobre un sólido inerte sobre enlaces covalentes, es la forma más eficaz de separación de proteínas procedentes de una mezcla. Debido al uso de ligandos específicos para una determinada

Introducción

proteína, hacen que esta técnica sea muy cara [154], por lo que su uso comercial es menor.

- *Cromatografía de interacción hidrofóbica (Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC)*: se basa en la presencia de fuerzas no covalentes como son las fuerzas hidrofóbicas, las cuales participan en procesos importantes como la estabilización de la estructura de proteínas, la unión enzimática con el sustrato y el repliegamiento de proteínas [138, 147, 155]. Es uno de los métodos de purificación de macromoléculas más utilizado, y que comienza a tener importancia en la cromatografía analítica.

- *Cromatografía de fase reversa (Reversed Phase Chromatography, RPC)*: Está basada en interacciones de tipo hidrofóbico. La fase estacionaria es de naturaleza apolar, mientras que la fase móvil es polar. Es una de las más usadas, a pesar de encontrarse limitado por determinados factores como el uso de solventes no compatibles con las proteínas y a que requiere siempre realizar los análisis en condiciones desnaturizantes, además, hasta hace pocos años en donde se han desarrollado nuevos materiales de relleno de columna más eficaces, se producían bajos porcentajes de recuperación [147, 148, 156]. Sin embargo, la aplicabilidad analítica destaca por su uso en cuantificación de anticuerpos monoclonales terapéuticos [126, 137, 157, 158], o la detección de desamidaciones tras la digestión enzimática del anticuerpo monoclonal [159].

Introducción

- **Cromatografía de interacción hidrofília** (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, HILIC): está basada en el empleo de una fase estacionaria polar y una fase móvil con alto porcentaje de disolvente orgánico (superior al 60%), agua y tampón de tipo acuoso u otro disolvente polar; la separación se basa en interacciones de tipo hidrofílico, debido a que el agua de la fase móvil forma una capa acuosa adsorbida sobre la superficie de la fase estacionaria polar en la que se produce el reparto entre los analitos a separar. Su uso se centra en el análisis de los glicanos de los mAbs terapéuticos, para ello requiere el empleo de detectores de fluorescencia o de espectrometría de masas [146]. La ventaja que presenta es la fuerte retención de compuestos de naturaleza polar hidrofílicos, los cuales no son retenidos en cromatografía de fase inversa.

- **Cromatografía de exclusión por tamaños** (*Size Exclusion Chromatography*, SEC): su nombre alude a su función, que consiste en la separación de partículas en función de su tamaño o peso molecular (Figura 5). Se ha empleado bastante para comprobar la pureza de las proteínas. Las separaciones preparativas mediante SEC actúan como un paso de purificación del producto, utilizando para ello matrices de SEC de baja presión que permitan la separación de mezclas de proteínas con diferentes pesos moleculares, proteínas de otras macromoléculas biológicas y para la separación de proteínas agregadas de monómeros [138, 143, 147-149]; mientras que en las separaciones analíticas es la de elección para el estudio de agregación de anticuerpos monoclonales terapéuticos [125], tal y como ya ha sido indicado previamente.

Introducción

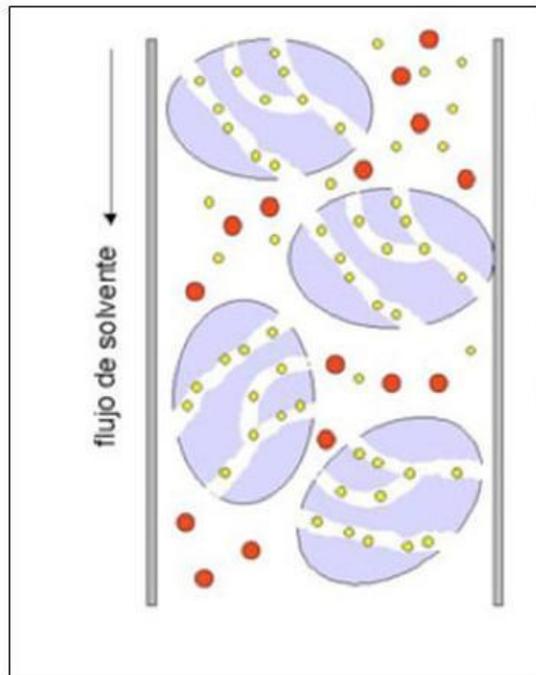


Figura 5. Representación gráfica de cromatografía SEC. Las partículas de mayor tamaño (rojas) salen antes que las de menor tamaño (amarillas) que quedan retenidas más tiempo por el relleno de la columna. (Fuente: slideplayer.es).

La técnica de (SE)HPLC se acopla al detector de ultravioleta visible, dado que la fase móvil presenta un contenido en sales que es incompatible con la detección por espectrometría de masas. La composición de la fase móvil tienen la ventaja que permite el análisis de las proteínas, de los mAbs, en condiciones naturales, es decir, con la proteína no desnaturalizada. Esta ha sido un gran valor añadido de esta técnica con respecto a otros modos en los que se produce una desnaturalización, y denominados modos “no naturales” de análisis de los mAbs. No obstante, los avances continuos que se están produciendo en las técnicas y métodos de análisis de los mAbs terapéuticos, han permitido muy recientemente el acoplamiento de la cromatografía líquida de ultra altas prestaciones (UHPLC) a la espectrometría de masas de alta

Introducción

resolución [160, 161], pudiéndose en este caso determinar el perfil de agregación en masa de los diferentes monómeros (isoformas) dímeros, etc. y todo ello en estado nativo.

4.5. OTROS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE MABS TERAPÉUTICOS

Dada la gran variedad de parámetros que son necesarios evaluar para la estabilidad de un mAbs terapéutico, además de las ya indicadas, también es común el empleo de otras técnicas analíticas, algunas de las cuales sólo se citan a continuación.

La espectrometría de masas (MS) es una técnica que ha experimentado un crecimiento exponencial en cuanto a aplicabilidad se refiere en el ámbito de los biofármacos constituyendo hoy en día una herramienta indispensable para la caracterización estructural de los mismos. Permite obtener información estructural de gran valor gracias a su acoplamiento con la cromatografía líquida de ultra altas prestaciones (UHPLC) mediante una interfase de ionización por electrospray (ESI). Se obtiene información sobre la estructura intacta, detección e identificación de microvariaciones o cambios conformacionales [162, 163].

La ultrafiltración analítica (AUC) (comentada en Tabla 5) es una técnica que permite la separación de proteínas en función de su tamaño, por lo que se emplea para la caracterización de los agregados, está basada en la diferente velocidad de sedimentación de las proteínas en función de su tamaño [164].

Introducción

Otra técnicas que también se emplea en estudios conformacionales tridimensionales de proteínas y que es muy prometedora es **la resonancia magnética nuclear (RMN)** [165, 166].

La electroforesis es la técnica cuyo fundamento permitió el desarrollo de gran número de pruebas analíticas para el estudio y análisis de proteínas [167]. Es de especial importancia el destacar el uso actual de la electroforesis capilar, técnica cuyo fundamento es la migración diferencial de moléculas sujetas a campo eléctrico (de 100 a 500 V/cm) a través de un capilar cuyo diámetro es menor de 50 μm [168-170].

Esta técnica se viene empleando también de manera habitual para la caracterización de mAbs terapéuticos, sobre todo para la caracterización de las variantes de carga [162, 171, 172].

5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES TERAPÉUTICOS

Las pruebas para la determinación de las propiedades biológicas y funcionales de un anticuerpo monoclonal con finalidad terapéutica es un paso fundamental, tal y como indica la ICH Q6B (*Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological products*) [173]. Esta información es de vital importancia ya que indica la especificidad de un determinado producto biotecnológico para desarrollar la acción biológica concreta para la cual ha sido “diseñado”.

Introducción

En principio, la evaluación de las propiedades biológicas puede ser realizada mediante cualquier ensayo biológico que demuestre su efectividad para tal fin. Entre ellos cabe destacar, tal y como hace la guía ICH Q6B, los siguientes:

- Ensayos biológicos basados en animales los cuales miden la respuesta biológica de un organismo frente al producto biotecnológico.
- Ensayos estrictamente bioquímicos, los cuales miden la actividad biológica a través de la medida de reacciones enzimáticas inducidas por interacciones inmunológicas e inmunoensayos.
- Ensayos biológicos basados en cultivos celulares, en los cuales se mide una respuesta bioquímica o fisiológica a nivel celular promovida por el fármaco biotecnológico.

Los procedimientos basados en ensayos bioquímicos, concretamente la técnica ELSA, y los basados en cultivos celulares, son los elegidos en esta Tesis Doctoral para evaluar la actividad biológica de los mAbs seleccionados (cetuximab y trastuzumab).

5.1. INMUNOENSAYOS. ELISA

Los inmunoensayos son técnicas bioanalíticas basadas en el uso de anticuerpos, empleadas ampliamente tanto en investigación como en el diagnóstico clínico [174]. Consisten en pruebas inmunoquímicas con

Introducción

un grado aceptable de exactitud y precisión, basadas en la formación de complejos antígeno-anticuerpo cuya extensión de la reacción es la base para un análisis cualitativo o cuantitativo de analitos. Este tipo de ensayos se caracterizan por una elevada selectividad. debido a la selectividad propia de la reacción antígeno-anticuerpo, que además puede ser detectada mediante diversas técnicas de detección (UV-visible, fluorescencia o radioactivas) proporcionando un resultado directamente proporcional al de la concentración [174, 175] de un analito. Una de sus grandes ventajas analíticas es la cuantificación de compuestos a concentraciones muy pequeñas, del orden de ng/mL e incluso pg/mL [148]. Precisamente por su sensibilidad, hay que extremar mucho el cuidado de su ejecución, porque existe la posibilidad de reacciones de tipo cruzada entre metabolitos o sustancias cuya estructura sea similar al compuesto de interés analizado [148].

Existe una gran variedad de formatos para llevar a cabo los inmunoensayos. Se pueden dividir en principio en dos grandes tipos, los inmunoensayos heterogéneos y homogéneos. Los primeros, los heterogéneos, requieren al menos una etapa de separación de las moléculas de la fracción libre (moléculas que no están unidas a ningún elemento) de la fracción ligada, debido a que no se obtendría diferencia de señal en cuanto al analito problema se refiere [174]. Por tanto, se basan en la medición del complejo antígeno-anticuerpo que genera una señal en un medio diferente al de origen para evitar efecto matriz [148, 174]. En el de los heterogéneos, la señal generada no requiere la separación previa del complejo antígeno-anticuerpo de la fracción libre, sino que se mide de forma directa en el mismo medio donde tendrá lugar la formación del complejo inmunológico [174]. Destacan por su rapidez

Introducción

y por su capacidad de detección de analitos de pequeño tamaño, como hormonas, medicamentos o drogas.

De entre las técnicas más empleadas actualmente para abordar los estudios de la actividad biológica de los mAbs terapéuticos, se encuentra el enzimoimmunoanálisis denominado ELISA, acrónimo del término inglés *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*, ELISA. La técnica ELISA es el método usado para la evaluación de la actividad biológica de anticuerpos monoclonales, debido a sus propiedades inherentes. Permite la cualificación y cuantificación de anticuerpos, antígenos, hormonas, citoquinas entre otros [176]. Destacan por su precisión, sensibilidad y especificidad, características importantes en el análisis de la concentración activa de los anticuerpos monoclonales en suero de pacientes y estudios farmacocinéticos [177, 178].

La técnica ELISA se basa en la identificación de inmunocomplejos mediante el uso de enzimas unidas al antígeno o al anticuerpo que esté adsorbido a un soporte polimérico sólido. Las distintas etapas requeridas para ejecutar un ELISA se pueden realizar de forma manual, mediante el uso de micropipetas etc, o de forma automatizada, dada la gran cantidad de muestras que hay que procesar y analizar y por la mejor repetitividad que proporcionan los resultados [179]. De cualquier manera, las etapas que contempla un ELISA son:

- 1) Unión del antígeno (o del anticuerpo) a los pocillos, es decir, a la superficie de plásticos tratados, paso que se realiza con facilidad pues tienen gran afinidad por proteínas.

Introducción

2) Bloqueo para asegurar la unión del antígeno (o del anticuerpo) a los pocillos e inactivar los sitios de unión del material plástico no ocupados por el antígeno (o anticuerpo).

3) Formación de una o más capas de inmunocomplejos. En el caso del antígeno unido a la placa se puede detectar mediante un anticuerpo anti-antígeno marcado (ELISA directo) o empleando un anticuerpo primario anti-antígeno y un secundario anti-primario marcado (ELISA indirecto).

4) Revelado de la reacción enzimática. Después de un lavado para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos, se añade el sustrato enzimático en solución. Se deja reaccionar y se lee la absorbancia empleando un espectrofotómetro lector de placas [180].

5.2. CULTIVOS CELULARES

Según el Instituto Nacional del Cáncer de EE.UU., se puede definir un cultivo celular como el crecimiento de microorganismos (bacterias, levaduras, etc) o células de origen vegetal o animal en el laboratorio, con el cual se pueden realizar labores de diagnóstico de infecciones, prueba de medicamentos nuevos e investigación [181]. De esta forma, según esta definición, consiste en una herramienta potencial tanto para la producción de medicamentos como para sus posteriores pruebas control de eficacia.

Introducción

Como se ha descrito en la sección de los biofármacos a estudiar, alguno de ellos no son igual de efectivos en función de la presencia o ausencia de determinadas mutaciones. Así, los pacientes con mutaciones en los genes que codifican para las proteínas participantes en la cascada de señalización de HER2 muestran deficiencias en la efectividad del anticuerpo monoclonal TTZ [182]. Este hecho que se puede comprobar mediante el uso de las líneas celulares sin necesidad de recurrir al uso de un modelo animal [183, 184]. Por lo tanto, se pueden comprobar aspectos que mediante una prueba de tipo ELISA no se aprecian en su totalidad, al basarse esta únicamente en la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Es por ello que en esta Tesis Doctoral se emplean de forma paralela dos estrategias diferentes para evaluar y cuantificar la actividad biológica/funcionalidad de los mAbs terapéuticos seleccionados.

Se pueden distinguir varios tipos de cultivos en función de su inicio: cultivo de órganos, explantes primarios y cultivo celular primario. El cultivo de órganos permite conservar tanto la estructura como las interacciones histológicas del tejido de origen aunque existe una reducida capacidad de proliferación celular. Los explantes primarios consisten en un fragmento de un tejido u órgano que se coloca en una interfase del tipo sólido-líquido, con el objetivo de que las células se adhieran a la superficie consiguiendo la proliferación y migración—de las células de la periferia. Por último, el cultivo celular primario, tiene como paso previo de disgregación celular (enzimática o mecánica) que elimina o reduce las interacciones célula-célula y las relaciones de la célula con la matriz extracelular. Este proceso permite a las células proliferar hasta alcanzar un estado de confluencia, en el cual las células cubren toda la superficie del cultivo inhibiéndose su proliferación por el contacto célula-célula. Al

Introducción

alcanzar esta situación, se procede a realizar un subcultivo o pase, que no es más que el trasplante celular a otro soporte [167, 185].

En función del tipo de anclaje y disposición de las células en el cultivo, los cultivos primarios pueden ser de dos tipos:

- **Cultivos en monocapa:** Las células se distribuyen de forma homogénea en un soporte de naturaleza sólida, el cual puede ser vidrio o plástico, sobre el cual las células quedan adheridas y desarrollan su crecimiento y proliferación, por lo que el anclaje al sustrato por parte de las células es un paso necesario [167, 185].

- **Cultivos en suspensión:** Desarrollado para aquellos tipos celulares que no se pueden cultivar en monocapa, como por ejemplo las células hematopoyéticas [167, 185]. En este caso, las células crecen dispersas por el medio sin adherirse a ninguna superficie, por lo que se alcanzará el estado de confluencia cuando se agoten los nutrientes del medio [167, 185].

El mantenimiento de los cultivos a través de pases o subcultivos permite un cierto proceso de selección en base al predominio proliferativo de determinados tipos celulares. Este proceso conduce a la obtención de las denominadas líneas celulares [186], que aun no siendo estables ni puras permite su aplicación en procesos de investigación. En función del tipo celular, el número de pases puede variar entre 20 a 100 [167, 184], tras lo cual las células suelen perder su capacidad proliferativa y entrar en la etapa de apoptosis celular, recibiendo este proceso el nombre de senescencia. No obstante, en algunos casos el

Introducción

cultivo primario se mantiene a lo largo del tiempo convirtiéndose en lo que se denomina un cultivo primario estable o líneas celulares continuas [167, 185], no estando dilucidado el mecanismo por el que este proceso acontece. Este tipo de cultivos también pueden ser obtenidos de forma artificial a través del uso de transfecciones virales, uso de mutagénicos o cuando el cultivo primario es obtenido a partir de una biopsia de un tumor del que las propias células poseen mecanismos, generalmente relacionados con la alteración del ciclo celular, que las hacen escapar del proceso de apoptosis. Este tipo de líneas presentan un crecimiento indefinido, hasta el punto de denominarlas como células inmortales; su crecimiento es aberrante por la pérdida de inhibición por contacto, limitación de la densidad celular y dependencia del anclaje: son heteroploides presentando aberraciones cromosómicas por lo que son genéticamente inestables. Es debido a este crecimiento desmedido que pueden invadir otros tejidos y desarrollarse en otras partes, ocasionando metástasis [167, 187].

La elección de la línea celular para evaluar la actividad biológica dependerá por completo de la proteína diana para la cual el mAb ha sido diseñado y para la cual presente afinidad. Así, se puede poner de manifiesto el efecto que desencadena la unión antígeno-anticuerpo sobre la propia célula, es decir, qué procesos desencadenan la unión con la proteína objetivo del anticuerpo monoclonal [187]. El efecto más usado para su evaluación y relación con actividad biológica es la capacidad citotóxica a través de comprobar su actuación en la ADCC [173, 174, 188-191].

Introducción

Esta estrategia basada en los cultivos celulares presenta una serie de ventajas. Por un lado, permite el control de las condiciones físico-químicas (pH, temperatura, presión osmótica y parcial de oxígeno y dióxido de carbono) y fisiológicas (hormonas, factores de crecimiento, densidad celular, entre otros). En base a los requerimientos del cultivo, se han desarrollado medios definidos para algunos tipos celulares, es decir, un conjunto de sustancias de la que se conoce su composición con exactitud. Un problema que existe con respecto a los medios definidos es el desconocimiento de las necesidades nutritivas de determinadas líneas celulares, las cuales utilizan medios suplementados con disoluciones complejas que contienen factores hormonales y nutritivos de cantidades desconocidas [167, 187].

Otra ventaja se debe a la homogeneidad de un cultivo celular, a diferencia de una muestra de tejido que consiste en una muestra heterogénea. Debido a la uniformidad en cuanto a composición y morfología, se pueden obtener réplicas de cada subcultivo, que en condiciones de conservación correctas, pueden ser usadas en una misma prueba para comprobar aspectos estadísticos como la reproductibilidad [167, 187].

También existen ventajas desde el punto de vista económico, debido al empleo de disoluciones menos concentradas que en el caso del uso de animales. Por otro lado, se pueden obtener resultados de la aplicación de la sustancia tal cual sin que sufra ningún tipo de modificación por efecto metabólico. Desde el punto de vista ético también presenta ventajas, como una alternativa válida al uso de animales de experimentación [167, 185].

Introducción

Pero como todas las técnicas, presenta también una serie de desventajas. Por un lado, se requiere que las condiciones del laboratorio sean estrictamente de asepsia, debido al crecimiento rápido de aquellos microorganismos considerados como contaminantes, entre los que se encuentran hongos, levaduras, bacterias y micoplasmas. Esto da a lugar a que la técnica se caracterice por su alta sensibilidad a la contaminación. Por otro lado, en ocasiones las líneas celulares continuas presentan inestabilidad adquiriendo aneuploidía, por lo que su velocidad de crecimiento y diferenciación se verán afectados. Para evitarlo, es conveniente resembrar las líneas celulares cada cierto tiempo, o el uso de un subcultivo congelado una vez superado un número determinado de pases [167, 185].

6. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE ANTICUERPOS MONOCLONALES TERAPÉUTICOS EN CONDICIONES DE USO HOSPITALARIO

Como se ha descrito anteriormente, es de vital importancia la realización de estudios de estabilidad para comprobar la posibilidad de uso de los sobrantes en condiciones de seguridad, reduciendo así costes sin que la salud de los pacientes se vea comprometida. En este contexto, de estudios de estabilidad, es donde se enmarca el objetivo último de la investigación realizada en la presente Tesis Doctoral.

Los medicamentos biotecnológicos fueron una revolución en el tratamiento de muchas enfermedades graves que tenían pocas alternativas terapéuticas. Sin embargo, es necesario tener en cuenta la considerable inversión en investigación y desarrollo y los altos costes del complejo

Introducción

proceso de producción para el desarrollo de un nuevo medicamento biotecnológico, así como los estrictos controles de calidad que deben llevarse a cabo durante la producción del nuevo medicamento biotecnológico y los costos de distribución [192]. Además, cabe señalar que la protección mediante patente de estos medicamentos ha dado lugar a precios elevados, algunos rondando los 100.000 euros por tratamiento de paciente [193, 194].

Además de los costes en producción, también hay que tener en cuenta que la forma de administración a los pacientes supone también un gasto que repercute en el sistema de salud. La mayoría de estos medicamentos biotecnológicos son administradas por vía intravenosa, mediante infusión [195]. Estos medicamentos normalmente se dosifican por peso del paciente tras una dilución en suero fisiológico. Lo que da lugar a importantes sobrantes. Los 5 medicamentos seleccionados en esta Tesis Doctoral para su estudio son de este tipo. Por tanto, el interés de su estabilidad en condiciones de uso hospitalario ha sido un tema importante sobre el que se han llevado a cabo diversos estudios.

Tal es la importancia, que numerosos estudios de estabilidad se han realizado a lo largo del tiempo. En algunos casos, el interés radica en la posibilidad de otras aplicaciones distintas para las que fueron diseñadas en un principio. Es el caso de BVZ, el cual se emplea en la actualidad para el tratamiento de la degeneración macular del ojo, a pesar de que las indicaciones de comercialización no la incluían entre las enfermedades a tratar. Por ejemplo, se estudió su estabilidad mediante las técnicas (SE)HPLC y DLS en nanopartículas de diferentes tipos de matriz (hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, alcohol

Introducción

polivinílico y ácido poliacrílico) que contienen el BVZ, junto con un estudio in vivo de la efectividad de dichas nanopartículas [196], observando de esta forma otras formas para vehicular este biofármacos. Además, también se han publicado estudios sobre la estabilidad del almacenamiento en jeringas de policarbonato y propileno durante 6 meses con las técnicas de electroforesis en gel SDS-PAGE y (SE)HPLC, almacenadas durante 4 semanas a -80 °C, y temperatura ambiente durante 2 horas [197].

En cuanto a ejemplos de estudios de estabilidad en el tiempo de CTX, este ha sido estudiado diluido a la concentración de 0,5 mg/mL mediante (SE)HPLC a temperatura ambiente durante 24 horas, refrigerado a 4 °C durante 48 horas, y en tres ciclos de congelación-descongelación [198]. La evaluación la estabilidad de su contenido fue analizada mediante (RP)HPLC-DAD [157] y demostró mantenerse constante en el mes de estudio.

Como ejemplos de estudios de IFX, para las caracterizaciones de la estabilidad físico-química y estructura de IFX en otros grupos de investigación, fueron usadas la inspección visual, el recuento subvisible de partículas (HIAC), dispersión dinámica de la luz (DLS), cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) y cromatografía de intercambio catiónico (CEX), junto con la huella peptídica, espectroscopia infrarroja (FTIR) y espectroscopia UV – estas últimas para la determinación de las estructuras secundarias y terciarias respectivamente– a diferentes temperaturas de almacenamiento y concentraciones [199]. Se han llevado a cabo estudios también con biosimilares del IFX, como el caso de PF-06438179/GP1111 (PF-SZ-

Introducción

IFX), el cual fue estudiado a concentraciones diluidas con respecto al medicamento (contracciones de uso clínico) y a la concentración del medicamento tras su reconstitución; se evaluó la estabilidad en el tiempo analizando tanto propiedades físico-químicas mediante turbidimetría, capilaridad, (SE)HPLC y SDS-PAGE como funcionales, mediante un estudio *in vitro*; este estudio se llevó a cabo en bolsas de infusión intravenosa en dos condiciones de almacenamiento, a 4 °C durante 30 días y a temperatura ambiente durante 14 días [200]. Recientemente ha sido estudiada la estabilidad en el tiempo de IFX y el biosimilar CT-P13 a diferentes concentraciones de uso clínico y diferentes almacenamiento encontrando altos grados de similaridad en todos los parámetros ensayados así como en la estabilidad que se ha determinado en al menos dos semanas [160].

También RTX ha sido objeto de estudio, por ejemplo ha sido estudiado a través de turbidimetría, (SE)HPLC y CEX almacenados en bolsas de poliolefina a 25 °C y 4 °C [201]. Siguiendo una estrategia parecida, han sido también estudiadas las estabilidades en el tiempo de sus biosimilares, como el caso del biosimilar Sandoz, del cual fue estudiada su estabilidad físico-química y biológica mediante (SE)HPLC, CEX, electroforesis en gel, huella peptídica y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) de muestras cercanas a su fecha de caducidad; estas muestras fueron expuestas a temperatura ambiente y luz durante 14 días a la concentración del medicamento, tras lo cual fueron diluidas a la concentración de 1 mg/mL en NaCl al 0,9% en bolsas de polipropileno o polietileno y refrigeradas durante 1 mes a 4 °C seguidas de 24 horas adicionales a temperatura ambiente con el objetivo de imitar su manipulación [202]. También ha sido estudiada la estabilidad en el

Introducción

tiempo de RTX mediante (RP)HPLC-DAD evaluando la consistencia de su contenido [158] así como su estructura por huella peptídica generada mediante espectrometría de masas de tiempo de vuelo con ionización asistida por matriz (MALDI-TOFMS) [203]. En ambos estudios se encontró altos grados de estabilidad de RTX en sus preparaciones de uso clínico.

En cuanto a la estabilidad en el tiempo de TTZ en diversas condiciones de uso clínico, también ha sido ampliamente estudiado. Por ejemplo, bolsas de infusión de disoluciones de TTZ diluidas, almacenadas a temperatura ambiente y refrigerado a 4 °C, durante 6 meses, han sido analizadas por (SE)HPLC, CEX, DLS, turbidimetría y espectrometría FTIR [204]; de manera similar que su biosimilar CT-P6, cuya estabilidad fue estudiada a tres concentraciones (21 mg/mL, 2,4 mg/mL y 0,8 mg/mL) almacenadas en bolsas de poliolefina a 4 °C y 22 °C durante 3 meses, mediante las técnicas de turbidimetría, espectroscopia FTIR, cromatografía ((SE)HPLC y CEX), dispersión de luz dinámica (DLS), todo ello principalmente enfocado a la evaluación de la estabilidad termodinámica y detección del particulado [205].

También, y de forma particular, la estabilidad funcional, evaluada a partir de la actividad biológica de los anticuerpos BVZ, CTX, IFX, RTX y TTZ, fue analizada en el tiempo en sobrantes de medicamentos, los cuales no demostraron tanta estabilidad como cuando se analizan las propiedades físico-químicas [180, 206].

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] M.L. Franco Fraguas, E. Savio Quevedo, Medicamentos biotecnológicos. Conceptos básicos y relevancia en el contexto clínico, Tendencias en Medicina (2008) 5-12.
- [2] Agencia Europea del Medicamento (EMA). <https://www.ema.europa.eu/>. (Consultado 8 Abril 2019).
- [3] Biotecnológicos y biosimilares en farmacia hospitalaria, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. Prácticas tuteladas (2017).
- [4] Real Decreto 1345/2007 Jefatura de Estado BOE nº 275 de 7/11/2007.
- [5] Informe INESME (Instituto de Estudios Médico Científicos). Equivalencias terapéuticas de los medicamentos biotecnológicos, Madrid, 2009.
- [6] A.F.U.H. Saeed, R. Wang, S. Ling, S. Wang, Antibody engineering for pursuing a healthier future, Front Microbiol 8 (2017) 495-523.
- [7] L. Loo, M.K. Robinson, G.P. Adams, Antibody engineering principles and applications, Cancer J 14(3) (2008) 149-153.
- [8] M.C. Iglesias-Osma, J. Gonzalez-Correa, U. Moreno, T. Tejerina, Desarrollo y Regulación de Medicamentos Biotecnológicos, AFT 2013.
- [9] Asociación Española de Bioempresas (ASEBIO). Medicamentos biológicos. www.asebio.com. (Consultado 8 Abril 2019).
- [10] S. Zarei, A.A. Bayat, R. Hadavi, A.R. Mahmoudi, B. Tavangar, Y. Vojgani, M. Jeddi-Tehrani, Z. Amirghofran, Production and characterization of a peptide-based monoclonal antibody against CD44 variant 6, Monoclon Antib Immunodiagn Immunother 34(1) (2015) 36-43.

Introducción

[11] Guideline on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins.

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003946.pdf. (Consultado 9 Abril 2019).

[12] I.C. Macdougall, N. Casadevall, F. Locatelli, C. Combe, G.M. London, S. Di Paolo, A. Kribben, D. Fliser, H. Messner, J. McNeil, P. Stevens, A. Santoro, A.L. De Francisco, P. Percheson, A. Potamianou, A. Foucher, D. Fife, V. Merit, E. Vercammen, *Nephrol Dial Transplant* 30(3) (2015) 451-460.

[13] International Federation of Pharmaceutical Manufacturers & Associations (IFPA). Productos Bioterapéuticos Similares. International Federation of Pharmaceutical Manufacturers & Associations. (Consultado 8 Abril 2019).

[14] W.S. Putnam, S. Prabhu, Y. Zheng, M. Subramanyam, Y.M. Wang, Pharmacokinetic, pharmacodynamic and immunogenicity comparability assessment strategies for monoclonal antibodies, *Trends Biotechnol* 28(10) (2010) 509-516.

[15] N. Goyal, The Role of Drug Exposure in Clinical Development: To What Extent Is Pharmacokinetic Assessment Needed in a Drug Development Programme?, *Clin Pharmacokinet* 54(10) (2015) 985-987.

[16] Guideline on Similar Biological Medicinal Products. CHMP/437/04 Rev 1, Agencia Europea del Medicamento (EMA), 2014.

[17] T.J. Giezen, A.K. Mantel-Teeuwisse, S.M. Straus, H. Schellekens, H.G. Leufkens, A.C. Egberts, Safety-related regulatory actions for biologicals approved in the United States and the European Union, *Jama* 300(16) (2008) 1887-1896.

Introducción

- [18] H.E. Heemstra, T.J. Giezen, A.K. Mantel-Teeuwisse, R.L. de Vrueth, H.G. Leufkens, Safety-related regulatory actions for orphan drugs in the US and EU: a cohort study, *Drug Saf* 33(2) (2010) 127-137.
- [19] B. Calvo, L. Zúñiga, Medicamentos Biotecnológicos: Requisitos Exigidos para el Desarrollo y Aprobación de Biosimilares, *Inf Tecnol* 21 (2010) 125-132.
- [20] Reglamento (CE) nº 726/2004: Procedimientos de la UE para la autorización y el control de los medicamentos de uso humano y veterinario y por el que se crea la Agencia Europea de Medicamentos, Agencia Europea del Medicamento (EMA).
- [21] Directiva (UE) 2017/1572, Agencia Europea del Medicamento (EMA), 2017.
- [22] Anticuerpos monoclonales terapéuticos. Informe de Vigilancia Tecnológica, Genoma España y Fundación General de la Universidad Autónoma de Madrid (FUAM) (2007).
- [23] J. Soliveri, Nuevas Tendencias en la Investigación de Medicamentos Biotecnológicos, Universidad de Alcalá, 2017.
- [24] H. Ledford, Cocktails for cancer with a measure of immunotherapy, *Nature* 532(7598) (2016) 162-164.
- [25] G. Vidarsson, G. Dekkers, T. Rispens, IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions, *Front Immunol* 5 (2014) 520-520.
- [26] International Nonproprietary Names (INN) for biological and biotechnological substances (a review), World Health Organization (WHO), 2016, p. 80.
- [27] J. Ai, A. Advani, Current status of antibody therapy in ALL, *Br J Haematol* 168(4) (2015) 471-480.

Introducción

- [28] C.L. Gaughan, The present state of the art in expression, production and characterization of monoclonal antibodies, *Mol Divers* 20(1) (2016) 255-270.
- [29] V.K. Denmark, L. Mayer, Current status of monoclonal antibody therapy for the treatment of inflammatory bowel disease: an update, *Expert Rev Clin Immunol* 9(1) (2013) 77-92.
- [30] H.M. Shepard, G.L. Phillips, D.T. C, M. Feldmann, Developments in therapy with monoclonal antibodies and related proteins, *Clin Med* 17(3) (2017) 220-232.
- [31] N. Gul, M. van Egmond, Antibody-dependent phagocytosis of tumor cells by macrophages: a potent effector mechanism of monoclonal antibody therapy of cancer, *Cancer Res* 75(23) (2015) 5008-5013.
- [32] N. Ferrara, K.J. Hillan, H.P. Gerber, W. Novotny, Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer, *Nat Rev Drug Discov* 3(5) (2004) 391-400.
- [33] C. Wiesmann, G. Fuh, H.W. Christinger, C. Eigenbrot, J.A. Wells, A.M. de Vos, Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor, *Cell* 91(5) (1997) 695-704.
- [34] H. Lamdan Ordas, Obtención de un fragmento de anticuerpo humano neutralizante contra un nuevo epítipo del factor de crecimiento del endotelio vascular, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, 2015.
- [35] R. Ronca, M. Benkheil, S. Mitola, S. Struyf, S. Liekens, Tumor angiogenesis revisited: Regulators and clinical implications, *Med Res Rev* 37(6) (2017) 1231-1274.

Introducción

- [36] V. Sini, A. Cassano, D. Corsi, M. De Laurentiis, T. Gamucci, M. Mauri, G. Naso, M. Roselli, E.M. Ruggeri, G. Tonini, P. Vici, G. Zampa, P. Marchetti, Bevacizumab as first-line treatment in HER2-negative advanced breast cancer: pros and cons, *Tumori* 102(5) (2016) 472-480.
- [37] G.M. El-Mollayess, B.N. Noureddine, Z.F. Bashshur, Bevacizumab and neovascular age related macular degeneration: pathogenesis and treatment, *Semin Ophthalmol* 26(3) (2011) 69-76.
- [38] L. Signorello, S. Pucciarelli, G. Bonacucina, V. Polzonetti, M. Cespi, D.R. Perinelli, G.F. Palmieri, R. Pettinari, C. Pettinari, G. Fiorentini, S. Vincenzetti, Quantification, microbial contamination, physico-chemical stability of repackaged bevacizumab stored under different conditions, *Curr Pharm Biotechnol* 15(2) (2014) 113-119.
- [39] C.J. Allegra, G. Yothers, M.J. O'Connell, S. Sharif, N.J. Petrelli, L.H. Colangelo, J.N. Atkins, T.E. Seay, L. Fehrenbacher, R.M. Goldberg, S. O'Reilly, L. Chu, C.A. Azar, S. Lopa, N. Wolmark, Phase III trial assessing bevacizumab in stages II and III carcinoma of the colon: results of NSABP protocol C-08, *J Clin Oncol* 29(1) (2011) 11-16.
- [40] F. Chionh, D. Lau, Y. Yeung, T. Price, N. Tebbutt, Oral versus intravenous fluoropyrimidines for colorectal cancer, *Cochrane Database Syst Rev*7 (2017) Cd008398.
- [41] D.L. Richardson, F.J. Backes, J.D. Hurt, L.G. Seamon, L.J. Copeland, J.M. Fowler, D.E. Cohn, D.M. O'Malley, Which factors predict bowel complications in patients with recurrent epithelial ovarian cancer being treated with bevacizumab?, *Gynecol Oncol* 118(1) (2010) 47-51.
- [42] S.K. Riaz, Y. Iqbal, M.F. Malik, Diagnostic and therapeutic implications of the vascular endothelial growth factor family in cancer, *Asian Pac J Cancer Prev* 16(5) (2015) 1677-1682.

Introducción

[43] Ficha técnica de BVZ.

https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/avastin-epar-product-information_es.pdf. (Consultado 9 Abril 2019).

[44] G. Mountzios, G. Pentheroudakis, P. Carmeliet, Bevacizumab and micrometastases: revisiting the preclinical and clinical rollercoaster, *Pharmacol Ther* 141(2) (2014) 117-124.

[45] Ficha técnica de CTX.

https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/erbitux-epar-product-information_es.pdf. (Consultado 9 Abril 2019).

[46] Resolución del Secretario Autonómico de Sanidad de declaración como MAISE de cetuximab. Director General de Farmacia y Productos Sanitarios, PAISE, Consejería de Sanidad Generalitat Valenciana, 2014.

[47] M. Carretero Colomer, Cetuximab. Inhibidor del crecimiento del cáncer colorrectal. *Actualidad científica.*, Medicamentos de Vanguardia OFFARM 24(6) (2005) 126-130.

[48] J. Hantash, M. Smidt, R.R. Bowsher, The development, optimization and validation of an ELISA bioanalytical method for the determination of Cetuximab in human serum, *Anal Methods* 1 (2009) 144-148.

[49] P. Kirkpatrick, J. Graham, M. Muhsin, Cetuximab, *Nat Rev Drug Discov* 3 (2004) 549-550.

[50] W. Bou-Assaly, S. Mukherji, Cetuximab (Erbitux), *Am J Neuroradiol* 31(4) (2010) 626-627.

[51] Scientific discussion of Erbitux, 2004.

https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-discussion/erbitux-epar-scientific-discussion_en.pdf. (Consultado 10 Abril 2019).

[52] C. Moon, Y.K. Chae, J. Lee, Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer: lessons learned from cetuximab, *Exp Biol Med* 235(8) (2010) 907-920.

Introducción

- [53] C. Gómez, Impacto del tratamiento del cáncer colorrectal metastásico con Erbitux (Cetuximab), 2005.
- [54] S. Moradi-Kalbolandi, A. Hosseinzade, M. Salehi, P. Merikhian, L. Farahmand, Monoclonal antibody-based therapeutics, targeting the epidermal growth factor receptor family: from herceptin to Pan HER, *J Pharm Pharmacol* 70(7) (2018) 841-854.
- [55] Q.B. Song, Q. Wang, W.G. Hu, Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis, *World J Gastroenterol* 21(14) (2015) 4365-4372.
- [56] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J Clin* 68(6) (2018) 394-424.
- [57] Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), Las cifras del cáncer en España, 2016.
- [58] T.N. El-Bolkainy, M.A. Sakr, A.A. Nouh, N.H. El-Din, A comparative study of rectal and colonic carcinoma: demographic, pathologic and TNM staging analysis, *J Egypt Natl Canc Inst* 18(3) (2006) 258-263.
- [59] S.C. Chang, W.V. Yang, Hyperglycemia, tumorigenesis, and chronic inflammation, *Crit Rev Oncol Hematol* 108 (2016) 146-153.
- [60] A.R. Marley, H. Nan, Epidemiology of colorectal cancer, *Int J Mol Epidemiol Genet* 7(3) (2016) 105-114.
- [61] A.S. Butterworth, J.P. Higgins, P. Pharoah, Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: a meta-analysis, *Eur J Cancer* 42(2) (2006) 216-227.
- [62] Cáncer colorrectal - Versión para profesionales de salud, Instituto Nacional del Cancer (NIH), 2017a.

Introducción

- [63] I. Marmol, C. Sanchez-de-Diego, A. Pradilla Dieste, E. Cerrada, M.J. Rodriguez Yoldi, Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer, *Int J Mol Sci* 18(1) (2017) 197-236.
- [64] A. Bertotti, F. Sassi, Molecular pathways: sensitivity and resistance to anti-EGFR antibodies, *Clin Cancer Res* 21(15) (2015) 3377-3383.
- [65] L.B. Saltz, N.J. Meropol, P.J. Loehrer, Sr., M.N. Needle, J. Kopit, R.J. Mayer, Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor, *J Clin Oncol* 22(7) (2004) 1201-1208.
- [66] S. Mocellin, Z. Baretta, I.F.M. Roque, I. Sola, M. Martin-Richard, S. Hallum, X. Bonfill Cosp, Second-line systemic therapy for metastatic colorectal cancer, *Cochrane Database Syst Rev* 1 (2017) 1465-1858.
- [67] F. Wen, Q. Li, Treatment dilemmas of cetuximab combined with chemotherapy for metastatic colorectal cancer, *World J Gastroenterol* 22(23) (2016) 5332-5341.
- [68] L.E. Benjamin, Commentary on "KRAS Mutation Status Is Predictive of Response to Cetuximab Therapy in Colorectal Cancer", *Cancer Res* 76(15) (2016) 4309-4310.
- [69] A. Lievre, J.B. Bachet, D. Le Corre, V. Boige, B. Landi, J.F. Emile, J.F. Cote, G. Tomasic, C. Penna, M. Ducreux, P. Rougier, F. Penault-Llorca, P. Laurent-Puig, KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer, *Cancer Res* 66(8) (2006) 3992-3995.
- [70] E. Martinelli, F. Morgillo, T. Troiani, F. Ciardiello, Cancer resistance to therapies against the EGFR-RAS-RAF pathway: The role of MEK, *Cancer Treat Rev* 53 (2017) 61-69.

Introducción

[71] X.X. Li, L. Liang, L.Y. Huang, S.J. Cai, Standard chemotherapy with cetuximab for treatment of colorectal cancer, *World J Gastroenterol* 21(22) (2015) 7022-7035.

[72] D. Hoffmann, I. Hoffmann, K. El-Bayoumy, The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder, *Chem Res Toxicol* 14(7) (2001) 767-790.

[73] J.P. Sullivan, J.D. Minna, J.W. Shay, Evidence for self-renewing lung cancer stem cells and their implications in tumor initiation, progression, and targeted therapy, *Cancer Metastasis Rev* 29(1) (2010) 61-72.

[74] M. Pelayo Alvarez, O. Gallego Rubio, X. Bonfill Cosp, Y. Agra Varela, Chemotherapy versus best supportive care for extensive small cell lung cancer, *Cochrane Database Syst Rev* (4) (2009) Cd001990.

[75] F. Grossi, C. Gridelli, M. Aita, F. De Marinis, Identifying an optimum treatment strategy for patients with advanced non-small cell lung cancer, *Crit Rev Oncol Hematol* 67(1) (2008) 16-26.

[76] Y.F. Yu, Z.W. Chen, Z.M. Li, Z.H. Li, S. Lu, The effects of cetuximab alone and in combination with endostatin on vascular endothelial growth factor and interleukin-8 expression in human lung adenocarcinoma cells, *Curr Ther Res Clin Exp* 70(2) (2009) 116-128.

[77] Z.Y. Yang, L. Liu, C. Mao, X.Y. Wu, Y.F. Huang, X.F. Hu, J.L. Tang, Chemotherapy with cetuximab versus chemotherapy alone for chemotherapy-naive advanced non-small cell lung cancer, *Cochrane Database Syst Rev* (11) (2014) Cd009948.

[78] E. Luedke, A.C. Jaime-Ramirez, N. Bhave, J. Roda, M.M. Choudhary, B. Kumar, T.N. Teknos, W.E. Carson, Cetuximab therapy in head and neck cancer: immune modulation with interleukin-12 and other natural killer cell-activating cytokines, *Surgery* 152(3) (2012) 431-440.

Introducción

- [79] B. Scallon, A. Cai, N. Solowski, A. Rosenberg, X.Y. Song, D. Shealy, C. Wagner, Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists, *J Pharmacol Exp Ther* 301(2) (2002) 418-426.
- [80] A. Soria Aledo, Estudios de polimorfismos genéticos tnf-alfa (238 y 308), il-10 (1082) mthfr (677) y del das-28, como predictores de la respuesta al tratamiento con infliximab, en la artritis reumática, Departament de Farmàcia i Tecnologia farmacèutica, Universitat de València, Servei de Publicacions, 2009.
- [81] L.R. Lard, H. Visser, I. Speyer, I.E. vander Horst-Bruinsma, A.H. Zwinderman, F.C. Breedveld, J.M. Hazes, Early versus delayed treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis: comparison of two cohorts who received different treatment strategies, *Am J Med* 111(6) (2001) 446-451.
- [82] D.M. Knight, H. Trinh, J. Le, S. Siegel, D. Shealy, M. McDonough, B. Scallon, M.A. Moore, J. Vilcek, P. Daddona, Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody, *Mol Immunol* 30(16) (1993) 1443-1453.
- [83] J.M. Gelfand, M.J. Bradshaw, B.J. Stern, D.B. Clifford, Y. Wang, T.A. Cho, L.L. Koth, S.L. Hauser, J. Dierkhising, N. Vu, S. Sriram, H. Moses, F. Bagnato, J.A. Kaufmann, D.J. Ammah, T.H. Yohannes, M.J. Hamblin, N. Venna, A.J. Green, S. Pawate, Infliximab for the treatment of CNS sarcoidosis: A multi-institutional series, *Neurology* 89(20) (2017) 2092-2100.
- [84] R.P. Baughman, E.E. Lower, Treatment of Sarcoidosis, *Clin Rev Allergy Immunol* 49(1) (2015) 79-92.

Introducción

- [85] A.O. Lorentzen, L. Sveberg, O. Midtvedt, E. Kerty, K. Heuser, Overnight response to infliximab in neurosarcoidosis: a case report and review of infliximab treatment practice, *Clin Neuropharmacol* 37(5) (2014) 142-148.
- [86] A.D. Vorselaars, H.A. Crommelin, V.H. Deneer, B. Meek, A.M. Claessen, R.G. Keijsers, C.H. van Moorsel, J.C. Grutters, Effectiveness of infliximab in refractory FDG PET-positive sarcoidosis, *Eur Respir J* 46(1) (2015) 175-185.
- [87] M. Takeuchi, T. Kezuka, S. Sugita, H. Keino, K. Namba, T. Kaburaki, K. Maruyama, K. Nakai, K. Hijioka, E. Shibuya, K. Komae, J. Hori, N. Ohguro, K.H. Sonoda, N. Mizuki, A.A. Okada, T. Ishibashi, H. Goto, M. Mochizuki, Evaluation of the long-term efficacy and safety of infliximab treatment for uveitis in Behcet's disease: a multicenter study, *Ophthalmology* 121(10) (2014) 1877-1884.
- [88] Z.G. Kamenarska, M.H. Hristova, A.I. Vinkov, L.A. Dourmishev, Monoclonal Antibody Drugs for Systemic Lupus Erythematosus, *Folia Med* 57(2) (2015) 89-92.
- [89] W. Miehsler, C. Dejaco, H.P. Grochenig, H. Fuchssteiner, C. Hogenauer, L. Kazemi-Shirazi, H. Maier, A. Mayer, A. Moschen, W. Reinisch, W. Petritsch, R. Platzer, P. Steiner, H. Tilg, H. Vogelsang, H. Wenzl, G. Novacek, Second Austrian consensus on the safe use of anti-TNFalpha-antibodies in patients with inflammatory bowel diseases, *Z Gastroenterol* 56(3) (2018) 275-302.
- [90] Anticuerpos monoclonales en el tratamiento de la enfermedad de Crohn: Infliximab, *Boletín Terapéutico Andaluz (BTA)* Redacción: CADIME. *Escuela Andaluza de Salud Pública* 17(3) (2001).

Introducción

[91] Ficha técnica de IFX.

https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/remicade-epar-product-information_es.pdf. (Consultado 9 Abril 2019).

[92] Nota informativa sobre el riesgo de infección tuberculosa asociado a infliximab (Remicade ®), Agencia Española del Medicamento.

[93] L. Lichtenstein, Y. Ron, S. Kivity, S. Ben-Horin, E. Israeli, G.M. Fraser, I. Dotan, Y. Chowars, R. Confino-Cohen, B. Weiss, Infliximab-Related Infusion Reactions: Systematic Review, *J Crohns Colitis* 9(9) (2015) 806-815.

[94] J.J. Cush, Safety overview of new disease-modifying antirheumatic drugs, *Rheumatic diseases clinics of North America* 30(2) (2004) 237-255.

[95] Infliximab, *Rev Prescrire* 24 (2004) 331-334.

[96] M.J.E. Marshall, R.J. Stopforth, M.S. Cragg, Therapeutic Antibodies: What Have We Learnt from Targeting CD20 and Where Are We Going?, *Front Immunol* 8 (2017) 1245-1267.

[97] G. Salles, M. Barrett, R. Foà, J. Maurer, S. O'Brien, N. Valente, M. Wenger, D.G. Maloney, Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies: A Review of 20 Years of Clinical Experience, *Adv Ther* 34(10) (2017) 2232-2273.

[98] A. Abulayha, A. Bredan, H. El Enshasy, I. Daniels, Rituximab: modes of action, remaining dispute and future perspective, *Future Oncol* 10(15) (2014) 2481-2492.

[99] Ficha técnica de RTX.

https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/mabthera-epar-product-information_es.pdf. (Consultado 10 Abril 2019).

[100] C.C. Mok, Rituximab for the treatment of rheumatoid arthritis: an update, *Drug Des Devel Ther* 8 (2014) 87-100.

Introducción

- [101] Q. Chen, T. Ayer, L.J. Nastoupil, A.C. Rose, C.R. Flowers, Comparing the cost-effectiveness of rituximab maintenance and radioimmunotherapy consolidation versus observation following first-line therapy in patients with follicular lymphoma, *Value Health* 18(2) (2015) 189-197.
- [102] B. Bonavida, Postulated mechanisms of resistance of B-cell non-Hodgkin lymphoma to rituximab treatment regimens: strategies to overcome resistance, *Semin Oncol* 41(5) (2014) 667-677.
- [103] X.C. Badoux, M.J. Keating, S. Wen, W.G. Wierda, S.M. O'Brien, S. Faderl, R. Sargent, J.A. Burger, A. Ferrajoli, Phase II study of lenalidomide and rituximab as salvage therapy for patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia, *J Clin Oncol* 31(5) (2013) 584-591.
- [104] V. Ivanov, D. Coso, B. Chetaille, B. Esterni, D. Olive, T. Aurrans-Schleinitz, J.M. Schiano, A.M. Stoppa, F. Broussais-Guillaumot, D. Blaise, R. Bouabdallah, Efficacy and safety of lenalidomide combined with rituximab in patients with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma, *Leuk Lymphoma* 55(11) (2014) 2508-2513.
- [105] E.A. Chong, T. Ahmadi, N.A. Aqui, J. Svoboda, S.D. Nasta, A.R. Mato, K.M. Walsh, S.J. Schuster, Combination of Lenalidomide and Rituximab Overcomes Rituximab Resistance in Patients with Indolent B-cell and Mantle Cell Lymphomas, *Clin Cancer Res* 21(8) (2015) 1835-1842.
- [106] J.P. Leonard, S.H. Jung, J. Johnson, B.N. Pitcher, N.L. Bartlett, K.A. Blum, M. Czuczman, J.K. Giguere, B.D. Cheson, Randomized Trial of Lenalidomide Alone Versus Lenalidomide Plus Rituximab in Patients With Recurrent Follicular Lymphoma: CALGB 50401 (Alliance), *J Clin Oncol* 33(31) (2015) 3635-3640.

Introducción

[107] Ficha técnica de TTZ.

https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/herceptin-epar-product-information_es.pdf. (Consultado 10 Abril 2019).

[108] M.M. Goldenberg, Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer, *Clin Ther* 21(2) (1999) 309-318.

[109] R.M. Hudziak, G.D. Lewis, M. Winget, B.M. Fendly, H.M. Shepard, A. Ullrich, p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor, *Mol Cell Biol* 9(3) (1989) 1165-1172.

[110] C.S. Clarke, R.M. Hunter, I. Shemilt, V. Serra-Sastre, Multi-arm Cost-Effectiveness Analysis (CEA) comparing different durations of adjuvant trastuzumab in early breast cancer, from the English NHS payer perspective, *PLoS ONE* 12(3) (2017) e0172731.

[111] S. Perez Lopez, Trastuzumab en el cáncer de mama metastásico HER-2 +, *Farm Hosp* 24(2) (2002) 83-87.

[112] D.S. Geller, R. Gorlick, HER-2 targeted treatment of osteosarcoma: the challenges of developing targeted therapy and prognostic factors for rare malignancies, *Expert Opin Pharmacother* 11(1) (2010) 51-61.

[113] P. De, M. Hasmann, B. Leyland-Jones, Molecular determinants of trastuzumab efficacy: What is their clinical relevance?, *Cancer Treat Rev* 39(8) (2013) 925-934.

[114] M. Charlot, O. Béatrix, F. Chateau, J. Dubuisson, F. Golfier, P.J. Valette, F. Réty, Pathologies of the male breast, *Diagn Interv Imaging* 94(1) (2013) 26-37.

[115] F. Laloo, D.G. Evans, Familial breast cancer, *Clin Genet* 82(2) (2012) 105-114.

Introducción

- [116] F. Berrino, Life style prevention of cancer recurrence: the yin and the yang, *Cancer Treat Res* 159 (2014) 341-351.
- [117] Cáncer de seno (mama) - Versión para profesionales de salud, Instituto Nacional del Cancer (NIH), 2017b.
- [118] J.Q. Cao, R.A. Olson, S.K. Tyldesley, Comparison of recurrence and survival rates after breast-conserving therapy and mastectomy in young women with breast cancer, *Curr Oncol (Toronto, Ont.)* 20(6) (2013) 593-601.
- [119] C.A. Parise, V. Caggiano, Breast Cancer Survival Defined by the ER/PR/HER2 Subtypes and a Surrogate Classification according to Tumor Grade and Immunohistochemical Biomarkers, *J Cancer Epidemiol* 2014 (2014) 1-12.
- [120] A. Adameczyk, A. Kruczak, A. Harazin-Lechowska, A. Ambicka, A. Grela-Wojewoda, M. Domagala-Haduch, A. Janecka-Widla, K. Majchrzyk, A. Cichocka, J. Rys, J. Niemiec, Relationship between HER2 gene status and selected potential biological features related to trastuzumab resistance and its influence on survival of breast cancer patients undergoing trastuzumab adjuvant treatment, *Onco Targets Ther* 11 (2018) 4525-4535.
- [121] S. Balduzzi, S. Mantarro, V. Guarneri, L. Tagliabue, V. Pistotti, L. Moja, R. D'Amico, Trastuzumab-containing regimens for metastatic breast cancer, *Cochrane Database Syst Rev* (6) (2014) 1465-1858.
- [122] G. Recondo, E. Diaz Canton, M. de la Vega, M. Greco, G. Recondo, M.E. Valsecchi, Therapeutic options for HER-2 positive breast cancer: Perspectives and future directions, *World J Clin Oncol* 5(3) (2014) 440-454.
- [123] J.M. Lambert, A. Berkenblit, Antibody-drug conjugates for cancer treatment, *Annu Rev Med* 69 (2018) 191-207.

Introducción

- [124] A. González Martín, Informe de Posicionamiento Terapéutico de trastuzumab emtansina (Kadcyla ®). Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (2015).
- [125] J. Hernandez-Jimenez, A. Salmeron-Garcia, J. Cabeza, C. Velez, L.F. Capitan-Vallvey, N. Navas, The effects of light-accelerated degradation on the aggregation of marketed therapeutic monoclonal antibodies evaluated by size-exclusion chromatography with diode array detection, *J Pharm Sci* 105(4) (2016) 1405-1418.
- [126] J. Hernandez-Jimenez, A. Martinez-Ortega, A. Salmeron-Garcia, J. Cabeza, J.C. Prados, R. Ortiz, N. Navas, Study of aggregation in therapeutic monoclonal antibodies subjected to stress and long-term stability tests by analyzing size exclusion liquid chromatographic profiles, *Int J Biol Macromol* 118(Pt A) (2018) 511-524.
- [127] W. Jiskoot, T.W. Randolph, D.B. Volkin, C.R. Middaugh, C. Schoneich, G. Winter, W. Friess, D.J. Crommelin, J.F. Carpenter, Protein instability and immunogenicity: roadblocks to clinical application of injectable protein delivery systems for sustained release, *J Pharm Sci* 101(3) (2012) 946-954.
- [128] C.J. Roberts, Protein aggregation and its impact on product quality, *Curr Opin Biotechnol* 30 (2014) 211-217.
- [129] B.D. Connolly, C. Petry, S. Yadav, B. Demeule, N. Ciaccio, J.M.R. Moore, S.J. Shire, Y.R. Gokarn, Weak interactions govern the viscosity of concentrated antibody solutions: high-throughput analysis using the diffusion interaction parameter, *Biophys J* 103(1) (2012) 69-78.
- [130] J.D. Schmit, F. He, S. Mishra, R.R. Ketchem, C.E. Woods, B.A. Kerwin, Entanglement model of antibody viscosity, *J Phys Chem B* 118(19) (2014) 5044-5049.

Introducción

- [131] R.K. Brummitt, J.M. Andrews, J.L. Jordan, E.J. Fernandez, C.J. Roberts, Thermodynamics of amyloid dissociation provide insights into aggregate stability regimes, *Biophys Chem* 168-169 (2012) 10-18.
- [132] R.W. Maurer, A.K. Hunter, A.S. Robinson, C.J. Roberts, Aggregates of α -chymotrypsinogen anneal to access more stable states, *Biotechnol Bioeng* 111(4) (2014) 782-791.
- [133] C.J. Roberts, Therapeutic protein aggregation: mechanisms, design, and control, *Trend Biotechnol* 32(7) (2014) 372-380.
- [134] N. Kim, R.L. Remmele, Jr., D. Liu, V.I. Razinkov, E.J. Fernandez, C.J. Roberts, Aggregation of anti-streptavidin immunoglobulin gamma-1 involves Fab unfolding and competing growth pathways mediated by pH and salt concentration, *Biophys Chem* 172 (2013) 26-36.
- [135] K.P. Johnston, J.A. Maynard, T.M. Truskett, A.U. Borwankar, M.A. Miller, B.K. Wilson, A.K. Dinin, T.A. Khan, K.J. Kaczorowski, Concentrated dispersions of equilibrium protein nanoclusters that reversibly dissociate into active monomers, *ACS nano* 6(2) (2012) 1357-1369.
- [136] A. Drury, Estabilidad de los medicamentos, *Radio Universidad: la salud y los medicamentos* (2013).
- [137] A. Martínez-Ortega, A. Herrera, A. Salmeron-Garcia, J. Cabeza, L. Cuadros-Rodriguez, N. Navas, Validated reverse phase HPLC diode array method for the quantification of intact bevacizumab, infliximab and trastuzumab for long-term stability study, *Int J Biol Macromol* 116 (2018) 993-1003.
- [138] B. Bobaly, S. Fleury-Souverain, A. Beck, J.L. Veuthey, D. Guillaume, S. Fekete, Current possibilities of liquid chromatography for the characterization of antibody-drug conjugates, *J Pharm Biomed Anal* 147 (2018) 493-505.

Introducción

- [139] U.S. Food & Drug (FDA). <https://www.fda.gov/>. (Consultado 12 Abril 2019).
- [140] National Health System (NHS). <https://www.nhs.uk/>. (Consultado 12 Abril 2019).
- [141] Guías ICH.
<https://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>. (Consultado 12 Abril 2019).
- [142] A. Siew, Analyzing protein aggregation in biopharmaceuticals: Understanding and preventing protein aggregation is crucial to ensuring product quality and patient safety, *BioPharm Int* 28 (2015) 40-43.
- [143] J.Z. Huang, K. Liao, G. Wang, T. Haby, M.S. Bolgar, Exploitation of the size-exclusion effect of reversed-phase high performance liquid chromatography for the direct analysis of diethylene triamine pentaacetic acid in therapeutic monoclonal antibody formulations, *J Chromatogr A* 1455 (2016) 140-146.
- [144] T. Tejerina, U. Medina, Actualidad en torno al medicamento. *Fármacos Biotecnológicos, Biosimilares, Bioequivalentes.*, *AFT* 10(4) (2012) 233-238.
- [145] D.D. Shah, J. Zhang, H. Maity, K.M.G. Mallela, Effect of photo-degradation on the structure, stability, aggregation, and function of an IgG1 monoclonal antibody, *Int J Pharm* 547(1) (2018) 438-449.
- [146] S. Millan Martin, C. Delporte, A. Farrell, N. Navas Iglesias, N. McLoughlin, J. Bones, Comparative analysis of monoclonal antibody N-glycosylation using stable isotope labelling and UPLC-fluorescence-MS, *Analyst* 140(5) (2015) 1442-1447.
- [147] K. Mayolo-Deloisa, Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas, *Rev Mex Ing Quim* 11(3) (2012) 415-429.

Introducción

- [148] SKOOG/LEARY, *Análisis Instrumental*, 4ª Edición ed.
- [149] SKOOG/WEST/HOLLER, *Química Analítica*, 6ª Edición ed.
- [150] Q.F. Leslie Escobar, Monitorización terapéutica de fármacos y aspectos prácticos de farmacocinética, *Rev Med Clin Las Condes* 27(5) (2016) 605-614.
- [151] X. Yuan, G. Tian, Y. Zhao, L. Zhao, H. Wang, T.B. Ng, Biochemical characteristics of three laccase Isoforms from the basidiomycete *Pleurotus nebrodensis*, *Molecules* 21(2) (2016) 203-218.
- [152] Y. Isakari, A. Podgornik, N. Yoshimoto, S. Yamamoto, Monolith disk chromatography separates PEGylated protein positional isoforms within minutes at low pressure, *Biotechnol J* 11(1) (2016) 100-106.
- [153] S. Fekete, A. Beck, D. Guillarme, Characterization of cation exchanger stationary phases applied for the separations of therapeutic monoclonal antibodies, *J Pharm Biomed Anal* 111 (2015) 169-176.
- [154] K. Viski, Z. Gengeliczki, K. Lenkey, K. Baranyane Ganzler, Parallel development of chromatographic and mass-spectrometric methods for quantitative analysis of glycation on an IgG1 monoclonal antibody, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1032 (2016) 198-204.
- [155] Q. Zhang, F.Q. Yang, L. Ge, Y.J. Hu, Z.N. Xia, Recent applications of hydrophilic interaction liquid chromatography in pharmaceutical analysis, *J Sep Sci* 40(1) (2017) 49-80.
- [156] P.D. Rainville, J.L. Simeone, D.S. Root, C.R. Mallet, I.D. Wilson, R.S. Plumb, A method for the direct injection and analysis of small volume human blood spots and plasma extracts containing high concentrations of organic solvents using reversed-phase 2D UPLC/MS, *Analyst* 140(6) (2015) 1921-1931.

Introducción

- [157] A. Martínez-Ortega, A. Herrera, A. Salmeron-Garcia, J. Cabeza, L. Cuadros-Rodriguez, N. Navas, Study and ICH validation of a reverse-phase liquid chromatographic method for the quantification of the intact monoclonal antibody cetuximab, *J Pharm Anal* 6(2) (2016) 117-124.
- [158] N. Navas, A. Herrera, A. Martínez-Ortega, A. Salmeron-Garcia, J. Cabeza, L. Cuadros-Rodriguez, Quantification of an intact monoclonal antibody, rituximab, by (RP)HPLC/DAD in compliance with ICH guidelines, *Anal Bioanal Chem* 405(29) (2013) 9351-9363.
- [159] L. Fornelli, D. Ayoub, K. Aizikov, X. Liu, E. Damoc, P.A. Pevzner, A. Makarov, A. Beck, Y.O. Tsybin, Top-down analysis of immunoglobulin G isotypes 1 and 2 with electron transfer dissociation on a high-field Orbitrap mass spectrometer, *J Proteomics* 159 (2017) 67-76.
- [160] J. Hermosilla, R. Sánchez Martín, R. Pérez-Robles, A. Salmerón-García, S. Casares, J. Cabeza, L. Cuadros-Rodríguez, N. Navas, Comparative stability studies of different infliximab and biosimilar CT-P13 clinical solutions by combined use of physicochemical analytical techniques and ELISA, *BioDrugs* 33(2) (2019) 193-205.
- [161] M. Tassi, J. De Vos, S. Chatterjee, F. Sobott, J. Bones, S. Eeltink, Advances in native high-performance liquid chromatography and intact mass spectrometry for the characterization of biopharmaceutical products, *J Sep Sci* 41(1) (2018) 125-144.
- [162] R. Gahoual, A. Beck, E. Leize-Wagner, Y.N. Francois, Cutting-edge capillary electrophoresis characterization of monoclonal antibodies and related products, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1032 (2016) 61-78.

Introducción

- [163] A. Beck, H. Diemer, D. Ayoub, F. Debaene, E. Wagner-Rousset, C. Carapito, A. Van Dorsseleer, S. Sanglier-Cianfèrani, Analytical characterization of biosimilar antibodies and Fc-fusion proteins, *Trends Analyt Chem* 48 (2013) 81-95.
- [164] G.L. R. Al Khayat, Control analítico-clínico de la hemodiálisis, *Acta Bioquím Clín Latinoam* 42(4) (2008) 579-588.
- [165] K. Wüthrich, NMR with Proteins and Nucleic Acids, *Europhys News* 17(1) (1986) 11-13.
- [166] G. Varani, Y. Chen, T.C. Leeper, NMR studies of protein-nucleic acid interactions, *Methods Mol Biol* 278 (2004) 289-312.
- [167] J.A. Alberts B, Lewis J., *Molecular Biology of the Cell*, 4th Edition ed.2002.
- [168] D. Suba, Z. Urbanyi, A. Salgo, Method development and qualification of capillary zone electrophoresis for investigation of therapeutic monoclonal antibody quality, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1032 (2016) 224-229.
- [169] A. Gerster, C. Wodarczyk, B. Reichenbacher, J. Kohler, A. Schulze, F. Krause, D. Muller, A simple method to determine IgG light chain to heavy chain polypeptide ratios expressed by CHO cells, *Biotechnol Lett* 38(12) (2016) 2043-2049.
- [170] J.J. Magaña, M. Arenas-Sordo, R. Gómez, La electroforesis capilar como una nueva estrategia en la medicina y el diagnóstico clínico, *Rev Méd Chile* 137 (2009) 946-956.
- [171] W. Wang, C.J. Roberts, *Aggregation of Therapeutic Proteins*, 2010.
- [172] S.S. Zhao, D.D. Chen, Applications of capillary electrophoresis in characterizing recombinant protein therapeutics, *Electrophoresis* 35(1) (2014) 96-108.

Introducción

- [173] N.F. Bernard, Z. Kiani, A. Tremblay-McLean, S.A. Kant, C.E. Leeks, F.P. Dupuy, Natural Killer (NK) Cell Education Differentially Influences HIV Antibody-Dependent NK Cell Activation and Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity, *Front Immunol* 8 (2017) 1033-1044.
- [174] K. Singh, B. Marasini, X. Chen, P. Spearman, A novel Ebola virus antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (Ebola ADCC) assay, *J Immunol Methods* 460 (2018) 10-16.
- [175] C. Boticario Boticario, M. Cascales Angosto, Sistema inmune: su importancia en el desarrollo y terapia del cáncer, Universidad Nacional de Educación a Distancia, UNED2013.
- [176] Y. Itatani, K. Kawada, Resistance to anti-angiogenic therapy in cancer-alterations to anti-VEGF pathway, *Int J Mol Sci* 19(4) (2018) 1232-1250.
- [177] M.Q. Wentink, T.M. Hackeng, S.P. Tabruyn, W.C. Puijk, K. Schwamborn, D. Alschuh, R.H. Meloen, T. Schuurman, A.W. Griffioen, P. Timmerman, Targeted vaccination against the bevacizumab binding site on VEGF using 3D-structured peptides elicits efficient antitumor activity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(44) (2016) 12532-12537.
- [178] M. Guyot, C. Hilmi, D. Ambrosetti, M. Merlano, C. Lo Nigro, J. Durivault, R. Grepin, G. Pages, Targeting the pro-angiogenic forms of VEGF or inhibiting their expression as anti-cancer strategies, *Oncotarget* 8(6) (2017) 9174-9188.
- [179] S. Aydin, A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA, *Peptides* 72 (2015) 4-15.
- [180] I. Suarez, Metodología Elisa para estudiar la estabilidad de medicamentos biotecnológicos, Departamento de Química Analítica, Universidad de Granada, 2017.

Introducción

[181] Instituto Nacional del Cáncer

<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/cultivo-celular> (Consultado 12 Abril 2019).

[182] P.R. Pohlmann, I.A. Mayer, R. Mernaugh, Resistance to Trastuzumab in Breast Cancer, *Clin Cancer Res* 15(24) (2009) 7479-7491.

[183] M. Dokmanovic, W.J. Wu, Monitoring Trastuzumab Resistance and Cardiotoxicity: A Tale of Personalized Medicine, *Adv Clin Chem* 70 (2015) 95-130.

[184] L. Shefet-Carasso, I. Benhar, Antibody-targeted drugs and drug resistance--challenges and solutions, *Drug Resist Updat* 18 (2015) 36-46.

[185] Assay Guidance Manual, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences 2004.

[186] Instituto Nacional del Cáncer.

<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/linea-celular-de-cultivo> (Consultado 12 Abril 2019).

[187] J. Anaya, Y. Shoenfeld, A. Rojas-Villarraga, R. Levy, R. Cervera, Autoimmunity. From Bench to Bedside, El Rosario University Press 2013.

[188] C.M. Cheney, D.M. Stephens, X. Mo, S. Rafiq, J. Butchar, J.M. Flynn, J.A. Jones, K. Maddocks, A. O'Reilly, A. Ramachandran, S. Tridandapani, N. Muthusamy, J.C. Byrd, Ocaratuzumab, an Fc-engineered antibody demonstrates enhanced antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in chronic lymphocytic leukemia, *mAbs* 6(3) (2014) 749-755.

[189] K.R. VanDerMeid, M.R. Elliott, A.M. Baran, P.M. Barr, Cellular Cytotoxicity of Next Generation CD20 Monoclonal Antibodies, *Cancer Immunol Res* 6(10) (2018) 1150-1160.

Introducción

[190] D. Sanchez-Martinez, N. Allende-Vega, S. Orecchioni, G. Talarico, A. Cornillon, D.N. Vo, C. Rene, Z.Y. Lu, E. Krzywinska, A. Anel, E.M. Galvez, J. Pardo, B. Robert, P. Martineau, Y. Hicheri, F. Bertolini, G. Cartron, M. Villalba, Expansion of allogeneic NK cells with efficient antibody-dependent cell cytotoxicity against multiple tumors, *Theranostics* 8(14) (2018) 3856-3869.

[191] S.Y. Lin, A. Azar, C. Suarez-Cuervo, The Role of Immunotherapy in the Treatment of Asthma, Agency for Healthcare Research and Quality 2018.

[192] R. Kunert, D. Reinhart, Advances in recombinant antibody manufacturing, *Appl Microbiol Biotechnol* 100(8) (2016) 3451-3461.

[193] A.J. Castro Gómez, A. López-Guillermo, A. Rueda Domínguez, A. Salar, C. Varela Moreno, C. Rubio-Terrés, Análisis coste-efectividad del tratamiento de mantenimiento con rituximab en pacientes con linfoma folicular que responden a la terapia de inducción en primera línea, *Rev Esp Salud Publica* 86 (2012) 163-176.

[194] M. Jakovljevic, F. Gutzwiller, M. Schwenkglenks, O. Milovanovic, N. Rancic, M. Varjacic, D. Stojadinovic, A. Dagovic, K. Matter-Walstra, Costs differences among monoclonal antibodies-based first-line oncology cancer protocols for breast cancer, colorectal carcinoma and non-Hodgkin's lymphoma, *J buon* 19(4) (2014) 1111-1120.

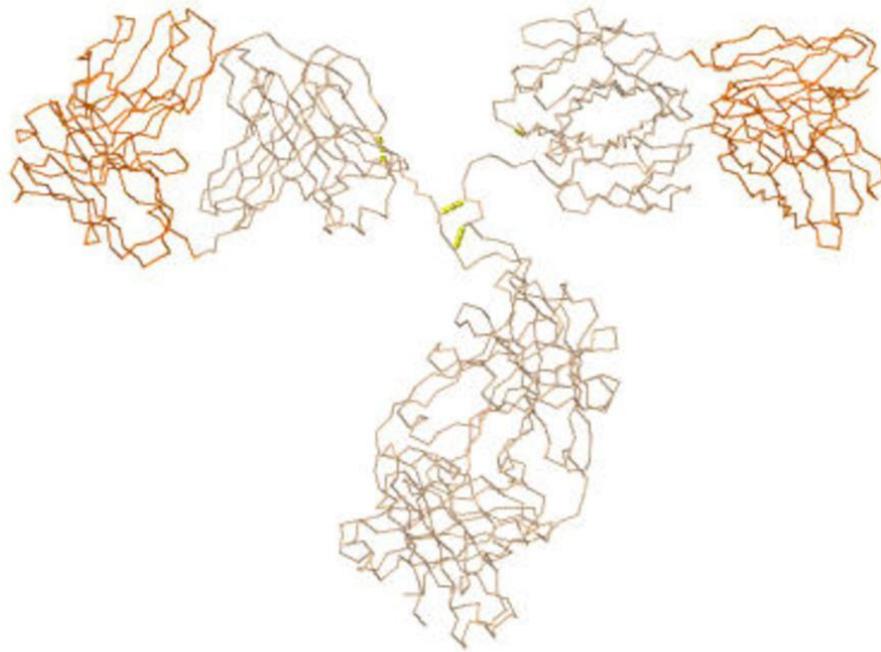
[195] A. Casado Collado, L. Luengo Pascual, M. Herdman, X. Bonafont Pujol, S. Clemente Bautista, R. Jodar Masanes, V. Napal Lecumberri, G. Serrano Padilla, Financial assessment of device for the preparation of intravenous mixtures in hospital pharmacy, *Farm Hosp* 28(4) (2004) 243-250.

Introducción

- [196] S. Burgalassi, D. Monti, N. Nicosia, S. Tampucci, E. Terreni, A. Vento, P. Chetoni, Freeze-dried matrices for ocular administration of bevacizumab: a comparison between subconjunctival and intravitreal administration in rabbits, *Drug Deliv Transl Res* 8(3) (2018) 461-472.
- [197] F. Becher, J. Ciccolini, I. Diane-Charlotte, C. Marin, C. Fournel, C. Dupuis, N. Fakhry, B. Pourroy, A. Ghetas, A. Pruvost, C. Junot, F. Duffaud, B. Lacarelle, S. Salas, A simple and rapid LC-MS/MS method for therapeutic drug monitoring of cetuximab: a GPCO-UNICANCER proof of concept study in head-and-neck cancer patients, *Sci Rep* 7(1) (2017) 2714-2725.
- [198] A. Farjami, P. Akbarzadehlaleh, O. Molavi, M. Siahi-Shadbad, Stability-indicating size exclusion chromatography method for the analysis of IgG mAb-cetuximab, *Chromatographia* 82(4) (2019) 767-776.
- [199] N. Tokhadze, P. Chennell, Y. Le Basle, V. Sautou, Stability of infliximab solutions in different temperature and dilution conditions, *J Pharm Biomed Anal* 150 (2018) 386-395.
- [200] M. Vimpolsek, M. Gottar-Guillier, E. Rossy, Assessing the Extended In-Use Stability of the Infliximab Biosimilar PF-06438179/GP1111 Following Preparation for Intravenous Infusion, *Drugs R D* (2019) 1-14.
- [201] V. Vieillard, M. Paul, T. Ibrahim, A. Astier, Extended stability of the rituximab biosimilar CT-P10 in its opened vials and after dilution and storage in polyolefin bags, *Ann Pharm Fr* 75(6) (2017) 420-435.
- [202] W.C. Lamanna, K. Heller, D. Schneider, R. Guerrasio, V. Hampf, C. Fritsch, M. Schiestl, The in-use stability of the rituximab biosimilar Rixathon®/Riximyo® upon preparation for intravenous infusion, *J Oncol Pharm Pract* 25(2) (2017) 269-278.

Introducción

- [203] P.J. Villacorta, A. Salmeron-Garcia, D.A. Pelta, J. Cabeza, A. Lario, N. Navas, Cluster-based comparison of the peptide mass fingerprint obtained by MALDI-TOF mass spectrometry. A case study: long-term stability of rituximab, *Analyst* 140(5) (2015) 1717-1730.
- [204] M. Paul, V. Vieillard, R. Da Silva Lemos, L. Escalup, A. Astier, Long-term physico-chemical stability of diluted trastuzumab, *Int J Pharm* 448(1) (2013) 101-104.
- [205] M. Paul, A. Astier, V. Vieillard, Extended stability of a biosimilar of trastuzumab (CT-P6) after reconstitution in vials, dilution in polyolefin bags and storage at various temperatures, *GaBI J* 7(3) (2018) 101-110.
- [206] I. Suarez, A. Salmeron-Garcia, J. Cabeza, L.F. Capitan-Vallvey, N. Navas, Development and use of specific ELISA methods for quantifying the biological activity of bevacizumab, cetuximab and trastuzumab in stability studies, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1032 (2016) 155-164.



Capítulo I

Metodología Empleada

Capítulo I

Contenido

1. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN	165
1.1. REACTIVOS: PRODUCTOS QUÍMICOS, PROTEÍNAS Y SUS DISOLUCIONES	165
1.1.1. <i>Productos químicos</i>	165
1.1.2. <i>Proteínas</i>	167
1.1.3. <i>Disoluciones empleadas</i>	170
1.2. ANTICUERPOS MONOCLONALES ESTUDIADOS	174
1.2.1. <i>Bevacizumab (BVZ)</i>	175
1.2.2. <i>Cetuximab (CTX)</i>	175
1.2.3. <i>Infliximab (IFX)</i>	176
1.2.4. <i>Rituximab (RTX)</i>	176
1.2.5. <i>Trastuzumab (TTZ)</i>	177
1.2.6. <i>Disoluciones estudias</i>	177
1.3. INSTRUMENTOS Y EQUIPOS	178
1.3.1. <i>Equipos de medida</i>	178
1.3.2. <i>Instrumentos de medida</i>	181
1.3.3. <i>Instrumentos de laboratorio</i>	182
1.4. MATERIAL DE LABORATORIO	185
1.5. SOFTWARES EMPLEADOS	188
2. ENSAYOS DE DEGRADACIÓN ACELERADA DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES	189
2.1. ESTUDIO DE AGREGADOS	191
3. METODOLOGÍA ANALÍTICA Y BIOLÓGICA EMPLEADA	191
3.1. MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN DE EXCLUSION POR TAMAÑO CON DETECCION ULTRAVIOLETA MEDIANTE DETECTOR DE DIODOS EN FILA (SE)HPLC-DAD)	192

Capítulo I

3.2. MÉTODOS ELISA	193
3.3. MÉTODO DE DICROISMO CIRCULAR.....	195
3.4. MÉTODOS BIOLÓGICOS BASADOS EN CULTIVOS CELULARES.....	196
3.4.1. <i>Líneas celulares</i>	196
3.4.2 <i>Condiciones del cultivo</i>	196
3.4.3 <i>Mantenimiento de las líneas celulares</i>	197
3.4.4. <i>Ensayo de proliferación celular</i>	198
4. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD EN EL TIEMPO.....	200
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	202

Capítulo I

En este capítulo se presentan los reactivos, materiales e instrumentación utilizados, junto con las diferentes herramientas analíticas y ensayos biológicos empleados en esta Tesis Doctoral. Dentro de este contexto, se exponen la metodología aplicada en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral.

1. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

1.1. REACTIVOS: PRODUCTOS QUÍMICOS, PROTEÍNAS Y SUS DISOLUCIONES

1.1.1. Productos químicos

Los productos químicos utilizados son los que aparecen en la siguiente Tabla, agrupados en función de la casa comercial:

Tabla 1. Relación de productos químicos usados y las respectivas casas comerciales de procedencia.

CASA COMERCIAL	NOMBRE DEL PRODUCTO
Panreac Química SA (Barcelona, España)	Carbonato de sodio (Na_2CO_3)
	Hidrógenocarbonato de sodio (NaHCO_3)
	Cloruro de sodio (NaCl)
	Cloruro de potasio (KCl)
	Monohidrógeno fosfato de sodio monohidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

Capítulo I

(Continuación Tabla 1)

CASA COMERCIAL	NOMBRE DEL PRODUCTO
Panreac Química SA (Barcelona, España)	Dihidrógeno fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)
	Ácido clorhídrico (HCl) (37 %)
	Hidróxido de sodio (NaOH) (97 %)
	Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄)
Fluka Chemika (Madrid, España)	Tween 20
La Asturiana (Asturias, España)	Leche en polvo desnatada
Technical (Fontenay-sous- Bois, Francia)	Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) (30 % w/v 100 vol.)
B. Braun Medical (Madrid, España)	Cloruro de sodio (NaCl)
Sigma Aldrich (Madrid, España)	OPD Sigmafast TM (orto-fenilendiamina dihidrocloruro)
	Medio Dubelcco's Eagle modificado (DMEM)
	Suero bovino fetal inactivado (FBS)
	Ácido tricloroacético
	10mM Tris-base pH 10,5

Capítulo I

(Continuación Tabla 1)

CASA COMERCIAL	NOMBRE DEL PRODUCTO
Sigma Aldrich (Madrid, España)	EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)
Biochrom KG (Berlín, Alemania)	penicilina/estreptomicina

1.1.2. Proteínas

Las proteínas empleadas en esta Tesis que no son los mAbs objeto de investigación, son las siguientes:

✓ Kit de Calibración

Para el estudio de agregación por efecto de la luz (Capítulo II), con objeto de calibrar la columna de exclusión molecular, se seleccionaron tres proteínas: apoproteína E (6,5 kDa), albúmina (90 kDa) y el propio mAb BVZ, el cual presenta monómeros y dímeros a la concentración de 25 mg/mL (149 kDa para el monómero y 298 kDa para el dímero). Disoluciones de estas tres proteínas permitieron estimar la relación existente entre los pesos moleculares y los tiempos de retención. Además, se aceptó que el pico cromatográfico eluido justo antes del pico principal de los mAb correspondía a los dímeros, según lo indicado por el fabricante de la columna [1].

Capítulo I

Para el resto de estudios de agregados de los mAbs (Capítulo III y IV) se empleó un kit comercial para la calibración de la columna en cuanto a pesos moleculares y tiempos de retención con el mismo objetivo que la calibración anterior, empleando proteínas estándar en un intervalo de pesos moleculares apropiado para el estudio de los mAbs, sus fragmentos y agregados. El kit de calibración que cumplía lo anterior (Agilent®, Santa Clara, Estados Unidos) incluyó: tiroglobulina (670 kDa), γ -globulina (150 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), mioglobina (17 kDa) y angiotensina II (1 kDa).

✓ Anticuerpo conjugado

El anticuerpo conjugado utilizado fue adquirido en la casa comercial Sigma-Aldrich. Consiste en el IgG antihumano (molécula completa) conjugado con peroxidasa producido en conejo. Viene suministrado en una disolución en tampón fosfato salino 0,01 M pH 7,4, conteniendo timerosal al 0,01 %. Las correspondientes disoluciones de trabajo de este Ab secundario se realizaron de acuerdo con la concentración indicada en el certificado de análisis y uso de la casa comercial, dependiente de cada lote. Con el objeto de obtener la concentración adecuada de trabajo, la concentración inicial se diluye por adición de tampón carbonato 0,1 M pH 9,6; tras el cual se dividió el contenido íntegro en alícuotas almacenadas a -20 °C hasta el momento de uso.

Capítulo I

✓ Antígenos

Los Ags empleados para llevar a cabo los inmunoanálisis para evaluar la actividad biológica de CTX y TTZ han sido también adquiridos en la casa comercial Sigma-Aldrich.

El antígeno usado para estudiar CTX es el receptor para el cual ha sido diseñado, es decir su diana terapéutica, que es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) humano. Esta proteína se suministra en una disolución de glicerol al 50 % con ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES) 50 mM, pH 7,6; NaCl 150 mM, Triton X-100 0,1 % y 1,4- ditiotreitól 1mM. Es necesario para su conservación el almacenaje a -70 °C. El certificado de análisis indica que tiene una concentración de 0,27 mg/mL, cuyo contenido se lleva a la concentración final de trabajo por dilución con disolución tampón carbonato 0,1 M pH 9,6. Para posteriores usos, se alícuota y se congela a -70 °C.

En el caso de TTZ, su antígeno es el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2) recombinante expresado en células Sf9, siendo esta proteína su diana terapéutica. A partir de una cantidad de 0,05 mg, fue reconstituido siguiendo las indicaciones del fabricante, hasta la concentración de 0,1 mg/mL, tras el cual se repartió en alícuotas y se almacenó a -80 °C hasta su uso, momento en el cual fue llevado a la concentración adecuada usando tampón carbonato 0,1 M pH 9,6.

Capítulo I

1.1.3. Disoluciones empleadas

A continuación se detallan las disoluciones acuosas de reactivos químicos, no proteicos, que han sido empleadas para el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Para la preparación de todas ellas se ha empleado agua ultrapura obtenida mediante estación Milli-RO plus Milli-Q (Millipore Corp., Madrid, España)

► Disolución empleada para las diluciones de los mAbs estudiados:

- ✓ Suero salino 0,9 % (NaCl 0,9 %): para la elaboración de esta disolución, se requiere la dilución de 0,9 mL de NaCl hasta completar con 100 mL de agua purificada.

► En cuanto a las disoluciones empleadas principalmente en los inmunoensayos ELISA, estas fueron:

- ✓ Tampón hidrógenocarbonato/carbonato: utilizado para la dilución de las diferentes disoluciones de mAbs, consiste en un tampón carbonato pH 9,6 de concentraciones 0,1 M y 0,05 M, cuyas sales son Na_2CO_3 y NaHCO_3 .
- ✓ Disolución de lavado: consiste en una mezcla de tampón fósforo salino, cuyas siglas en inglés es “PBS” a una concentración 0,15 M ajustado a pH 7,4; mezclado posteriormente con Tween 20 0,3 % (v/v). Para la elaboración del tampón fósforo se necesitan NaCl 8 g; KCl 0,2 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,44 g; KH_2PO_4 0,24 g y agua purificada hasta enrase a 1000 mL. En el caso del Tween 20,

Capítulo I

se adicionan 3 mL en 1000 mL de la disolución de PBS para obtener la disolución final de lavado.

- ✓ Tampón de bloqueo: Se trata de una disolución de leche en polvo desnatada al 2 % (w/v) preparada en PBS 0,15 M pH 7,4 con Tween[®] 20 0,3 % (v/v). Para ello, cada día se pesaban 0,5 g de leche en polvo desnatada en un matraz aforado de 25 mL al cual se le añadían 25 mL de disolución de lavado.

- ✓ OPD: Sustrato de la reacción enzimática (OPD SigmafastTM). Composición de reactivo bajo patente. La preparación de su correspondiente disolución consisten en comprimidos de la casa comercial Sigma Aldrich. Para su preparación, se siguieron las instrucciones del fabricante, el cual indica el uso de un comprimido en 20 mL de agua purificada, formándose una disolución tampón a base de OPD, urea, más peróxido de hidrógeno y tampón citrato-fosfato.

- ✓ Disolución de parada de la reacción enzimática: disolución de H₂SO₄ 1 M. Cada vez que era necesario se elaboraban 50 mL de disolución con agua purificada.

► En cuanto a las disoluciones empleadas para los estudios de estrés, estas fueron:

- ✓ Disolución de H₂O₂ (30 % w/v 100 vol): utilizada en el estrés oxidante. Se prepararon dos disoluciones de H₂O₂ al 1 % y al 10 %, siendo 1 mL de H₂O₂ por cada 100 mL de agua purificada

Capítulo I

en el primero y 10 mL de H₂O₂ por cada 100 mL de agua purificada en el segundo.

- ✓ Disolución de HCl 0,1 M (a partir de disolución concentrada de 37% peso/volumen): debido a las propiedades de las disoluciones concentradas de HCl, es necesario el uso de campana extractora, donde se adiciona un pequeño volumen de agua purificada en un matraz aforado de 100 mL vertiendo poco a poco 827 µL de la disolución concentrada HCl. Una vez adicionado todo el HCl se completa con 100 mL de agua purificada.
- ✓ Disolución NaOH 0,1 M (a partir de sólido de 97 % de pureza): para su elaboración fue necesario 0,41 g de NaOH, y enrasar hasta 100 mL con agua purificada en un matraz aforado de vidrio.
- ✓ Disolución de NaCl 1,5 M.: preparada empleando 8,7 g de NaCl, diluidos en agua purificada hasta un volumen final de 100 mL.

► Para el cultivo de las líneas celulares y su posterior empleo para evaluar la funcionalidad biológica, se empleó:

- ✓ Medio DMEM: suministrado en forma líquida, es un medio basal, por lo que carece de agentes promotores del crecimiento, cuyas siglas hacen referencia a medio de Eagle modificado por Dulbecco, a partir del medio mínimo de Eagle al cual lo enriquecen con aminoácidos, el cual lo duplica, y con vitaminas, las cuales son cuadruplicadas con respecto al medio original. Se suplementa con un 5% de suero fetal bovino. Como sistema tamponante utiliza el tampón

Capítulo I

monohidrógenocarbonato de sodio (3,7 g/L), el cual se añade para su uso. Su color se debe a la presencia de rojo fenol, el cual varía de color ante variaciones de pH del medio.

- ✓ Sulforoamida-B (SRB): colorante fluorescente, de color rojo intenso. Permite determinar la densidad celular mediante la determinación de proteínas celulares en los ensayos de citotoxicidad. Se suministra en polvo, el cual se solubiliza en metanol a una concentración final de 1 mg/mL.

- ✓ Tampón Fosfato Salino (PBS): suministrada en forma de tableta, la cual se diluyen 5 tabletas en un volumen final de 1 L de agua purificada en una concentración 0,01 M de tampón, y posterior autoclavado para desinfección.

- ▶ Para el análisis mediante HPLC, se empleó:
 - ✓ Disolución de tampón fosfato como fase móvil: de concentración 150 mM de Na_2HPO_4 anhidro ajustado el valor de pH a 7. Para su preparación, se pesan 21,29 g de Na_2HPO_4 anhidro, el cual se disuelve en agua de calidad de ósmosis inversa (purificada con una estación Milli-RO plus Milli-Q de Millipore Corp., Madrid, España) a un volumen final de 1 L, siendo ajustado el valor de pH posteriormente gota a gota con HCl (37%) hasta 7.

Capítulo I

1.2. ANTICUERPOS MONOCLONALES ESTUDIADOS

Debido a que los mAbs estudiados en esta Tesis Doctoral no están comercializados como patrones, se requiere la adquisición de los mismos mediante la cesión a través de dos vías posibles: por parte de las compañías farmacéuticas comercializadoras de los mismos en España, o a través de proyectos específicos de colaboración con hospitales, como ha sido este caso. En este caso, todas las muestras estudiadas fueron facilitadas por el Servicio de Farmacia Hospitalaria perteneciente al Hospital Universitario San Cecilio (Granada, España), las cuales fueron recogidas en el momento de preparación justo en el mismo día de análisis y estudio. Una vez reconstituidos los medicamentos que así lo requieren, como son los casos de IFX y TTZ, por el personal de dicho Servicio de Farmacia tal y como indica el fabricante, es decir, en cabina de flujo laminar, diluyendo adecuadamente su contenido en agua para inyectables, los remanentes o cantidades sobrantes de los medicamentos no empleados eran conservados en frío, a 4°C (entre 2 °C y 8 °C) hasta el momento de su recogida en el mismo día de su preparación para su posterior análisis. Es decir, todos los estudios realizados parten de medicamentos en condiciones óptimas de uso clínico, dentro de las fechas de uso recomendadas por los propios fabricantes.

Los mAbs objeto de estudio en esta Tesis Doctoral, así como su forma comercial, han sido los que se exponen a continuación.

Capítulo I

1.2.1. Bevacizumab (BVZ)

BVZ - Avastin® (Roche Pharma AG, Grenzach - Wyhlen, Alemania) es un mAb recombinante humanizado con un peso molecular de 149 kDa. El medicamento, Avastin®, es una solución para perfusión que indica una composición cuantitativa de 25 mg/mL de BVZ en cada vial de un solo uso. Está formulado con fosfato de sodio pH 6,2 [2], α , α -trehalosa deshidratada, polisorbato 20 y agua para preparaciones inyectables [3]. El fabricante indica que el medicamento debe almacenarse lejos de la luz, pero no se dan indicaciones con respecto a las diluciones [2]. No debe administrarse ni mezclarse con soluciones de glucosa porque esto puede conducir a la degradación [2].

1.2.2. Cetuximab (CTX)

CTX -Erbix® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) es un mAb quimérico con un peso molecular de 145,78 kDa. El medicamento, Erbitux®, se presenta como una solución para perfusión e indica una composición cuantitativa de CTX de 5 mg/mL en cada vial de un solo uso, que también contiene cloruro de sodio, glicina, polisorbato 80, ácido cítrico monohidratado, hidróxido de sodio y agua para inyecciones [4]. El pH de la solución está en el rango 5,3 – 5,7 [5]. No hay indicaciones específicas con respecto a la exposición a la luz para el medicamento o las diluciones [4, 5]. Como ocurre con BVZ, CTX no debe administrarse ni mezclarse con soluciones de glucosa [4].

Capítulo I

1.2.3. *Infliximab (IFX)*

IFX-Remicade® (Janssen Biologics, Leiden, Países Bajos) es un mAb humanizado recombinante con un peso molecular de 150 kDa. El medicamento, Remicade®, se presenta en forma de un polvo liofilizado que contiene 100 mg/vial de IFX para ser reconstituido en agua para inyección. Contiene sacarosa, polisorbato 80, fosfato de sodio monobásico y fosfato de sodio dibásico como excipiente [6]. El pH de la solución es aproximadamente 7,2 [7]. No hay indicaciones específicas con respecto a la exposición a la luz para el medicamento o las diluciones [6, 7]. La concentración probada fue de 10 mg/mL; la solución se preparó en la Unidad de Farmacia del Hospital Universitario "San Cecilio" según lo indicado por el fabricante, es decir, se preparó inmediatamente después de abrir el vial mediante dilución apropiada con agua para inyección. Actualmente hay comercializado dos medicamentos biosimilares cuyo principio activo es IFX, denominado CT-P13, que no ha sido incluido en la presente Tesis Doctoral ya que fue aprobada su comercialización cuando los trabajos experimentales estaban muy avanzados.

1.2.4. *Rituximab (RTX)*

RTX -Mabthera® (Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Alemania) es un mAb humanizado recombinante con un peso molecular de 150,00 kDa. El medicamento, Mabthera®, se presenta como una solución para perfusión que indica una composición cuantitativa de RTX de 10 mg/mL en cada vial de un solo uso, que también contiene citrato de sodio, polisorbato 80, cloruro de sodio, hidróxido de sodio, ácido

Capítulo I

clorhídrico y agua para inyecciones [8]. El fabricante indica que la medicina debe almacenarse lejos de la luz, pero no se dan indicaciones con respecto a las diluciones [8, 9] El pH de la solución se ajusta a 6,5 [9].

1.2.5. Trastuzumab (TTZ)

TTZ -Herceptin® (Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Alemania) es un mAb humanizado recombinante con un peso molecular de 145,53 kDa. El medicamento, Herceptin®, se presenta como una solución inyectable que indica una composición cuantitativa de 15 mg/mL de TTZ en cada vial de un solo uso, que también contiene L-histidina clorhidrato, L-histidina, α , α -trehalosa dihidratada, polisorbato 20 y agua para inyección [10]. El pH de la solución se ajusta aproximadamente a 6 [11]. El fabricante indica que el medicamento debe almacenarse lejos de la luz y que las diluciones del medicamento deben protegerse de la luz difusa [10, 11]. Como en casos anteriores, se recomienda que no se diluya con soluciones de glucosa debido al riesgo de agregación de proteínas [10].

1.2.6. Disoluciones estudiadas

En la presente Tesis Doctoral, se han estudiado las concentraciones de uso hospitalario así como de medicamento reconstituido o de su forma de presentación disuelta en medio acuoso. Dichas concentraciones fueron: 25 mg/mL, 5 y 2 mg/mL en el caso de BVZ; 5 mg/mL y 2 mg/mL en el caso de CTX; 10 mg/mL, 5 mg/mL y 2

Capítulo I

mg/mL en los casos de IFX y RTX; y 15 mg/mL, 5 mg/mL y 2 mg/mL en el caso de TTZ, siendo la mayor concentración la del medicamento. Las diluciones de uso hospitalario se obtuvieron diluyendo la correspondiente cantidad de medicamento en suero salino 0,9 % NaCl indicada anteriormente.

1.3. INSTRUMENTOS Y EQUIPOS

A continuación, se van a exponer los instrumentos y equipos utilizados durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral.

1.3.1. Equipos de medida

- Shimadzu Prominence HPLC (Shimadzu Corporation, Kioto, Japón) equipado con un controlador de sistema CBM-20A, una unidad de suministro de disolvente LC-20A, un muestreador automático termostático SIL-20AC, un horno de columna CTO-20AC y un fotodetector de matriz de diodos SPD-M20A, todas las cuales son unidades de alto rendimiento controladas por el software LC Solutions (Shimadzu Corporation, Kioto, Japón) [13].

Capítulo I



Figura 1. HPLC Shimadzu Prominence (Fuente: shimadzu.com).

- Titertek MultiskanTM (Flow Laboratories, Irvine, Reino Unido),
conectado a PC cuyo programa es el “Ascent Software Version 2.6”



Figura 2. Titertek MultiskanTM (Fuente: andbio.com).

- Lector de absorbancia de placas de microtitulación de 96 pocillos
Tecan Sunrise (Tecan Austria GMBH) acoplado a un PC dotado del
programa informático XFluor4. Comecta (Barcelona, España).

Capítulo I



Figura 3. Lector de placas de microtitulación Tecan Sunrise (Fuente: lhybride.info).

- Jasco J-815 CD Spectrometer (Jasco Inc., Easton, EE.UU.) equipado con un calentador CDF-426S/15, una pequeña unidad de refrigeración con agua MCB-100 controladas a través del software Spectra Manager (Jasco Inc., Easton, EE.UU.)



Figura 4. Jasco J-815 CD Spectrometer (Fuente: chem.utah.edu).

Capítulo I

1.3.2. Instrumentos de medida

Estos han sido:

- Balanzas analíticas Ohaus Discovery DV215CD (Zurich, Suiza) y Ohaus Pioneer PA2102 (China), con intervalo de pesada de 0-81 y 0-2100 g y precisión 0,01 mg y 0,01 g, respectivamente.

- pHmetro digital modelo MicropH 2000 provisto de electrodo combinado de vidrio y plata/cloruro de plata (KCl 3M) CRISON (Barcelona, España).

- Reloj electrónico con temporizador 24h, 1 memoria QUIRUMED TR118 suministrado por eLAB (Granada, España).

- Microscopio binocular óptico (Quirumed, Madrid, España)

- Microscopio confocal invertido (Tecnylab, Valencia)

Capítulo I

1.3.3. Instrumentos de laboratorio

- Lavador de placas de microtitulación formadas por 96 pocillos VASHER RT-2600C de Comecta.



Figura 6. Lavador de placas de microtitulación VASHER RT-2600C (Fuente: rayto.com).

- Cámara de envejecimiento con las paredes recubiertas de espejos y dotada de una lámpara de Xenón. SOLARBOX 3000e RH, Cofomegra, (Milán, Italia).



Figura 6. Cámara de envejecimiento SOLARBOX 3000e RH (Fuente: cofomegra.it).

- Cámara de incubación modelo ULM-500, 30-250 °C MEMMERT, (Schwabach, Alemania).

Capítulo I

- Centrífuga para 12 microtubos, 230v~60/60 Hz. Labnet International (New Jersey, USA).
- Campana extractora Formimetel. Phoenix Controls Corporation (Newton, MA, USA).
- Ultrasonidos modelo 1510E-MTH Branson, (Danbury, USA).
- Agitador de tubos VORTEX 4 digital. Modelo V4D. IKA® 3000 r.p.m. (Alemania).
- Frigorífico EDESA S.A. (Mondragón, España).
- Arcón congelador vertical de temperatura baja -20 °C EDESA S.A.
- Congelador vertical de temperatura ultrabaja -86 °C THERMO Scientific REVCO ULT2586-3SI-D38 (Madrid, España).
- Cabina de flujo laminar (Aura Vertical S.D.4, Bio Air Instruments, Italia).

Capítulo I



Figura 7. Cámara de flujo laminar vertical (Fuente: jaelsa.com).

- Estufa (Steri-Cult CO₂ Incubator, Thermo Electrón Corporation, USA)



Figura 8. Steri-Cult CO₂ Incubador, Thermo Electrón (Fuente: andbio.com).

1.4. MATERIAL DE LABORATORIO

El material utilizado en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral es de naturaleza vítrea, a excepción de aquellos procesos sujetos a posibles interferencias como los procesos de adsorción en los cuales se empleó material plástico.

El material empleado fue:

➤ Placas de microtitulación

- Placas de microtitulación de 96 pocillos, de fondo plano, bolsa unitaria, Deltalab S.L (Granada, España). Estas placas fueron empleadas para el análisis de la actividad biológica en líneas celulares, las cuales fueron sembradas un volumen determinado en función de la densidad celular óptima para el desarrollo de la experiencia y de la población del cultivo matriz.

- Placas Nunc MaxisorpTM de fondo plano. Fabricadas en poliestireno (PS), sin tapa, con capacidad de adsorción homogénea certificada y alta afinidad por moléculas con grupos hidrofílicos/hidrofóbicos mixtos adquiridas de Labclinic S.A (Barcelona, España). Estas placas fueron las utilizadas para el estudio de funcionalidad mediante la técnica ELISA.

Capítulo I



Figura 9. Placas microtitulación 96 pocillos (Fuente: fishersci.es).

- Matraces aforados (2 l, 10, 25, 50 y 100 mL) AFORA clase A de Thermo Fisher Scientific Inc. (Madrid, España).
- Vasos de precipitado (10, 25, 50 y 100 mL) PYREX obtenidos a través de la casa comercial DeltaLab S.L.
- Micropipetas de diferentes capacidades (0,5-10 μ L; 10-100 μ L; 10-200 μ L; 1-5 mL) LABMATE, PZ HTL LAB Solutions S.A. (Varsovia, Polonia).
- Pipeta multicanal de 8 canales y capacidad 20-200 μ L, HTL LAB Solutions obtenida a través de eLAB (Granada, España).
- Puntas de micropipetas Eppendorf obtenidas a través de eLAB (Granada S.L.).
- Pipetas de vidrio graduadas y aforadas (10 mL y 25 mL) AFORA clase A de Thermo Fisher Scientific Inc. (Madrid, España).
- Botellas de vidrio graduadas (100 mL y 500 mL) AFORA clase A de Thermo Fisher Scientific Inc. (Madrid, España).

Capítulo I

- Botellas de cristal topacio graduadas (100 mL y 500 mL) AFORA clase A de Thermo Fisher Scientific Inc. (Madrid, España).
- Jeringas estériles de plástico Kendall monojet (1mL). Kendall S.A. (Costa del Este, Panamá).
- Agujas de jeringa BD Microlance 3 0,9 mm x 25 mm Becton Dickinson S.A. (Madrid, España).
- Viales de vidrio con tapón a presión y de rosca (2 mL, 4 mL, 8 mL, 10 y 20 mL) SYMTA. VWR International Eurolab, S.L., (Barcelona, España).
- Viales topacio graduados 1,5 mL, con sus correspondientes tapones de rosca 100/PK de eLAB.
- Cajas de congelación de viales Sarstedt suministradas por eLAB (Granada, España).
- Frascos estériles tipo Falcon (de 25 ó 75 cm², Sarstedt).
- Cámara de Neubauer (Zuzi Corp., France).



Figura 10. Cámara de Neubauer (Fuente: labolan.es).

Capítulo I

- Zapatillas de pesada, varillas de vidrio, cucharillas, así como otros materiales de uso habitual en cualquier laboratorio de Química Analítica y Cultivos Celulares.

1.5. SOFTWARES EMPLEADOS

Los software empleados para la obtención y procesamiento de datos fueron los proporcionados por las casas comerciales de los instrumentos y equipos anteriormente citados.

El control del lector de placas de microtitulación y la adquisición de las señales de absorbancia de las placas, se ha realizado mediante el software XFluor4TM de Tecan (Männedorf, Suiza); a partir del análisis de estos datos se evalúa la capacidad de unión con el antígeno expresado en porcentaje (variable Y) frente a cada día en el que fue obtenida la información (variable X); mientras que los resultados sobre la actividad biológica en líneas celulares fueron obtenidas mediante el programa informático “Ascent Software for Multiskan” para Windows v.2,6 (Thermo Labsystems, USA), mediante el cual se realizó un análisis de la inhibición de la proliferación celular a través de modelos que relacionan la concentración del biofármaco (variable X), con el valor de absorbancia obtenido en cada caso (variable Y). El control del cromatógrafo de líquidos HPLC así como la adquisición de datos (cromatogramas) y el tratamiento de los mismos se ha realizado mediante el software LabSolutions (Shimadzu Corporation, Japón).

Capítulo I

El tratamiento estadístico de los datos, incluida la obtención de los diferentes modelos de regresión, han sido realizados con el programa Statgraphic Centurion XVI (Statgraphics.Net, Madrid, España).

2. ENSAYOS DE DEGRADACIÓN ACELERADA DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

La degradación forzada por la luz se realizó en los cinco mAbs comercializados indicados anteriormente (Capítulo III). Se expusieron a la luz 1,5 mL de cada medicamento (Avastin®, lote nº 252674; Erbitux®, lote nº 300977; Remicade®, lote nº 7197411; Mabthera®, lote nº 249933; y Herceptin®, lote nº 247995) y de cada dilución preparada en viales transparentes siguiendo las directrices emitidas por la Conferencia Internacional de Armonización (ICH Q1B) para las pruebas de fotoestabilidad [12]. Las muestras de mAb se colocaron en una cámara de prueba de esfuerzo acelerado para simular la luz solar (Solarbox 3000e RH, Cofomegra, Milán, Italia) inmediatamente después de abrir los viales de medicina o después de la reconstitución. El estudio continuó hasta la aparición de particulado visible.

Se realizaron estudios de degradación acelerada por exposición a altas temperaturas, a medio ácido, a medio básico y a medio oxidativo de los medicamentos Avastin® (BVZ), Erbitux® (CTX) y Herceptin® (TTZ) y sobre las diluciones en NaCl al 0,9% de los medicamentos Remicade® (IFX) y Mabthera® (RTX) (Capítulo IV). Las concentraciones sometidas a degradación acelerada fueron 25 mg/mL de BVZ, 5 mg/mL de CTX, 0,5 y 2 mg/mL de IFX, 1 y 4 mg/mL de RTX y 15 mg/mL de TTZ. Después de que las muestras se estresaron, las

Capítulo I

alícuotas se analizaron sin diluciones adicionales para evitar cambios en el proceso de agregación.

El efecto de la alta temperatura se evaluó colocando alícuotas de los medicamentos antes mencionados y diluciones de los mismos en un horno (Heraeus S.A., Madrid, España) a temperatura controlada de 50 °C durante 24 horas.

El resto de las condiciones de estrés fueron las siguientes: las soluciones de mAb individuales se sometieron a estrés usando ácido (HCl 0,1 M), alcalino (0,1 M NaOH) y medios oxidativos (1% y 10% H₂O₂). El agente de estrés se aplicó a una concentración del 10% (v / v) (se añadieron 150 µL del agente de estrés a 1,5 mL de solución de mAb). Las muestras se analizaron 24 horas después de que se añadió el agente de estrés. En todos los casos, el volumen de disolución de mAb utilizado para cada estudio de estrés fue de 1,5 mL.

Para los ciclos de congelación / descongelación, se almacenaron alícuotas de los cinco medicamentos protegidos de la luz a -20 °C en viales de vidrio oscuro, los cuales fueron sacados para su análisis mediante cromatografía y posteriormente introducidos de nuevo en el congelador, estableciendo de esta forma un ciclo de congelación / descongelación.

2.1. ESTUDIO DE AGREGADOS

La formación de agregados, así como la aparición de fragmentos, fue estudiada en las muestras sometidas a las condiciones de degradación (estrés) controlada indicadas en el apartado anterior. Para ello, se obtuvieron los perfiles de agregación de las muestras sometidas a estrés mediante el método cromatográfico que se describe a continuación -en el apartado 3.1- y se compararon con los de los mAbs no degradados, es decir, los registrados usando mAbs recién preparados (inmediatamente después de la apertura del vial de medicamento), que no se habían sometido a tratamiento de degradación. Todas las muestras se analizaron al menos por triplicado. Se calcularon los porcentajes de agregados, monómeros y fragmentos en función de las áreas de los correspondientes picos cromatográficos y se estimaron los pesos moleculares a través de la curva de calibrado establecida para la columna cromatográfica de exclusión por tamaños.

3. METODOLOGÍA ANALÍTICA Y BIOLÓGICA EMPLEADA

En la presente Tesis Doctoral se han desarrollado y puesto a punto métodos a través de los cuales se pueden comprobar la estabilidad tanto física (referida a la formación de agregados proteicos) como funcional (relacionado con actividad biológica en la unión Ag-mAb y la acción sobre líneas celulares) de los medicamentos biotecnológicos estudiados, así como de sus preparaciones de uso hospitalario.

Capítulo I

Para la evaluación de los agregados proteicos y fragmentos de los mAbs se ha puesto a punto un método de cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño con detección UV-visible mediante detector de diodos en fila ((SE)HPLC-DAD). Este se ha empleado en el estudio de agregación y degradación en fragmentos ya sea por procesos de estrés acelerado o por el paso del tiempo.

Para la evaluación de la funcionalidad se han empleado inmunoensayos ELISA y ensayos basados en el crecimiento de líneas celulares. Estos se han empleado para comprobar la funcionalidad de los biofármacos una vez sometidos a algún tipo de estrés o por el paso del tiempo.

3.1. MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO CON DETECCIÓN ULTRAVIOLETA MEDIANTE DETECTOR DE DIODOS EN FILA ((SE)HPLC-DAD)

El análisis de los agregados y fragmentos de los mAbs se llevó a cabo en el cromatógrafo descrito anteriormente. La separación de los monómeros, agregados y fragmentos se llevó a cabo en una columna analítica de 5 μm de tamaño de partícula de 300 μm x 4.6 μm , y 300 μm de ancho de exclusión (300Bio SEC-5, Agilent Technologies, EE. UU.). Las muestras se eluyeron durante 10 minutos usando un caudal isocrático de 0,38 mL/min con una composición en fase móvil de una disolución de tampón fosfato (150 mM pH 7,00). La temperatura de la columna se mantuvo a 25 °C y el volumen de inyección fue de 1 μL . Los espectros UV-visibles se registraron cada 0,5 segundos entre 190 nm y 500 nm,

Capítulo I

con adquisición de señal cada 0,5 nm. Los cromatogramas se registraron a 214 nm (± 4). Las muestras no se filtraron antes de inyectarse en el cromatógrafo para evitar la pérdida de agregado en el filtro.

3.2. MÉTODOS ELISA

En la presente Tesis Doctoral se han empleado dos métodos ELISA, uno para evaluar la actividad biológica de CTX y otro para la actividad biológica de TTZ. Estos métodos fueron puestos a punto en el grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta investigación, y que están publicados en una reciente Tesis Doctoral [13] y en un artículo en revista internacional [14].

El método empleado para el CTX consistió en la sensibilización de una placa ELISA Nunc Maxisorp® con 100 μ L por pocillo de una disolución de EGFR concentrado a 1 μ g/mL en tampón carbonato 0,1 M a pH 9,6; siendo incubadas durante 18 horas (overnight) a 4 °C. Tras cuatro ciclos de lavado y aspirado con la solución de lavado, se añadió 100 μ L por pocillo del tampón de bloqueo, siendo incubadas durante 2 horas a 37 °C. A continuación, se procedió a realizar otros cuatro ciclos de lavado y aspirado con la solución de lavado, tras el cual se añaden 100 μ L por pocillo de CTX diluido en tampón carbonato 0,1 M a pH 9,6; cuyas concentraciones fueron 0.25 μ g/mL, 1 μ g/mL, 5 μ g/mL, 10 μ g/mL, 15 μ g/mL y 50 μ g/mL. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 45 minutos, seguidas de otros cuatro ciclos de lavado y aspirado con la solución de lavado. El siguiente paso consistió en la incubación durante 30 minutos a 37 °C con disolución de IgG antihumano marcada con peroxidasa y preparada a una concentración de 10 μ g/mL en tampón

Capítulo I

carbonato 0,1 M a pH 9,6; a un volumen de 100 μL por pocillo de la disolución. Pasado ese tiempo, se procede a realizar otros 4 ciclos de lavado y aspirado con solución de lavado añadiendo 100 μL de la disolución de OPD, tras el cual se incuban a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad y sin cubrir durante 20 minutos. Por último, se añaden 50 μL por pocillo de ácido sulfúrico 1 M como solución de paro de la reacción para su posterior lectura de absorbancia a dos longitudes de onda: 450 y 620 nm siendo la diferencia de ambos la señal analítica.

El método empleado para TTZ es el mismo que en el caso anterior, siendo los mismos volúmenes empleados, pero variando concentraciones en función de la sensibilidad que presenta este inmunosenayo para el análisis de TTZ. La sensibilización fue realizada con 100 μL por pocillo de HER-2 preparado con tampón carbonato 0,1 M a pH 9,6 en una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en una placa ELISA Nunc Maxisorp® siendo incubadas *overnight* a 4 °C. Tras cuatro ciclos de lavado y aspirado con la solución de lavado, se añaden 100 μL por pocillo de solución de bloqueo, tras el cual las placas fueron incubadas a 37 °C durante 2 horas. A continuación, se procede a otros cuatro ciclos de lavado y aspirado con solución de lavado y la posterior adición de 100 μL por pocillo de TTZ diluido en tampón carbonato 0,1 M a pH 9,6 cuyas concentraciones fueron 2,5 ng/mL, 5 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 75 ng/mL, 250 ng/mL y 500 ng/mL, y posterior incubación a 37 °C durante 45 minutos. El siguiente paso, previo a cuatro ciclos de lavado y aspiración con tampón de lavado, consistió en la adición de 100 μL por pocillo de IgG antihumano marcado con peroxidasa a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tampón carbonato 0,1 M a pH 9,6 y posterior incubación a 37 °C durante 30 minutos. Tras la incubación, se procede a otros cuatro

ciclos de lavado y aspirado con tampón de lavado y posterior adición de 100 μL por pocillo de OPD, siendo la incubación en este caso en oscuridad, sin cubrir y a temperatura ambiente durante 20 minutos. Finalizada la incubación, se añaden 50 μL por pocillo de ácido sulfúrico 1 M tras el cual se procede a la lectura de las placas a dos longitudes de onda: 450 y 620 nm, siendo la señal de interés la diferencia de ambos.

3.3. MÉTODO DE DICROISMO CIRCULAR

Los espectros de dicroísmo circular de muestras de CTX y TTZ en disolución acuosa se registraron con un espectropolarímetro JASCO J-815 (JASVO, Japón), este equipo dispone de un controlador JASCO J-815 al que está acoplado un controlador de temperatura tipo “peltier”. Las muestras se diluyeron a la concentración de 0,5 mg/mL con disolución salina al 0,9 %, utilizando para el análisis 400 μL y la misma disolución salina como blanco. Se utilizaron cubetas de cuarzo polarizadas con un paso de luz de 1 mm, en un intervalo de longitud de onda de 190 a 325 nm. Los espectros se registraron con 6 acumulaciones, a una velocidad de 50 nm/min y un ancho de banda de 2 nm.

Para la obtención de la información sobre la estructura secundaria se realizó un análisis on-line mediante *DichroWeb* [15], que es una interfase web para conectar con algoritmos para el análisis de datos procedentes de dicroísmo circular. De entre los diferentes algoritmos que se pueden emplear, en este Tesis Doctoral se ha empleado el K2D [16].

3.4. MÉTODOS BIOLÓGICOS BASADOS EN CULTIVOS CELULARES

3.4.1. Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral fueron seleccionadas en base la descripción bibliográfica de la presencia de características biológicas de interés para nuestro estudio entre las que cabe destacar la expresión de antígenos de superficie celular que nos permitieran analizar mAb específicos. De esta forma, fueron elegidas i) la línea SKBR3 derivada de adenocarcinoma de mama humano metastásico que fue empleada para el estudio de TTZ y ii) la línea SW480 derivada de un adenocarcinoma colorrectal humano que fue empleada para el estudio de CTX. Ambas líneas fueron obtenidas de la ATCC (American Type Culture Collection) caracterizándose por tener un carácter adherente para su expansión en cultivo.

3.4.2. Condiciones del cultivo

Las líneas celulares SKBR3 y SW480 se cultivaron en medio de Dulbecco modificado de Eagle (DMEM) (Sigma-Aldrich Chemical Co., EE.UU.) suplementado con suero bovino fetal (FBS) (Flow laboratorios, Gibco) al 10 %, 40 mg/mL de gentamicina y 500 mg/mL de ampicilina (Antibióticos SA, España). El crecimiento de las células fue realizado en frascos estériles tipo Falcon (de 25 ó 75 cm²), en estufa a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad. La manipulación fue realizada siempre en cabina de flujo laminar manteniendo las condiciones de esterilidad para evitar la contaminación [17]. Para su

Capítulo I

conservación a largo plazo, las células fueron congeladas en criotubos utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% en medio de cultivo. La descongelación de los criotubos para su siembra, fue realizada de forma progresiva, realizando tres lavados con PBS (tampón fosfato salino) y centrifugando 5 minutos a 1650 rpm.

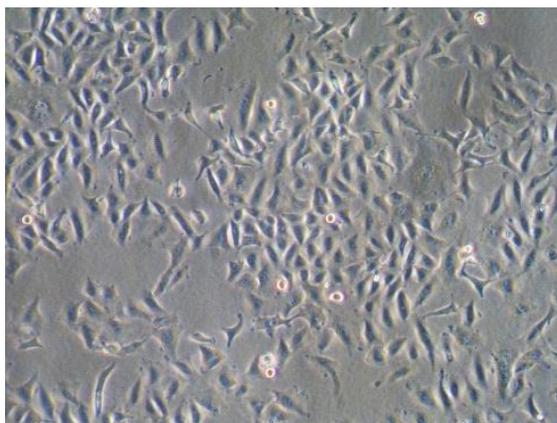


Figura 11. Imagen representativa de la morfología de las células de cultivo. Línea SW480 adherida al Falcon en medio de cultivo DMEM.

3.4.3 Mantenimiento de las líneas celulares

Los Falcons utilizados para la expansión celular fueron sometidos a un proceso de renovación del medio de cultivo cada 48 horas o en función de la acidificación del medio (viraje del rojo fenol) que indica agotamiento del mismo. Dicho cambio se realizó siempre en cabina de flujo laminar y bajo condiciones de esterilidad.

La división del cultivo para la expansión mediante resiembra fue siempre realizada con una confluencia celular del 80 - 90%. Tras desechar el medio de cultivo, las células fueron lavadas utilizando PBS en un volumen de 0,2 mL/cm². A continuación, se añadieron 0,1 mL/cm²

Capítulo I

de tripsina y se incubaron durante 5 minutos a 37 °C en estufa de CO₂ consiguiendo que las células se despegaran de la superficie del Falcon. Posteriormente, se añadió 1 mL/cm² de PBS, se recogieron las células y se centrifugaron durante 5 minutos a 1650 rpm desechando el sobrenadante y resuspendiendo el botón celular obtenido en 1 mL de DMEM completo sin PBS [17].

La densidad celular se determinó con cámara de Neubauer para sembrar la cantidad de células deseada en función del ensayo a realizar.

3.4.4. Ensayo de proliferación celular

Para determinar la actividad biológica de CTX y TTZ, se sembraron 4500 y 1100 células/pocillo (células SKBR3 y SW480, respectivamente) en placas de 96 pocillos. Pasadas 24 horas desde la siembra se procede a añadir los biofármacos en concentraciones crecientes desde 0,025 a 0,5 y desde 0,21 a 2,1 µg/µL de CTX y TTZ, respectivamente. Los cultivos se mantuvieron expuestos a los biofármacos durante 48 horas. Cultivos paralelos sin exposición a los agentes fueron utilizados como control negativo. Cultivos tratados con el biofármaco dentro del su caducidad y periodo de uso indicado por el fabricante y sin ningún tipo de procesamiento fueron usados como control positivo. Todos los experimentos se realizaron por quintuplicado.

Capítulo I

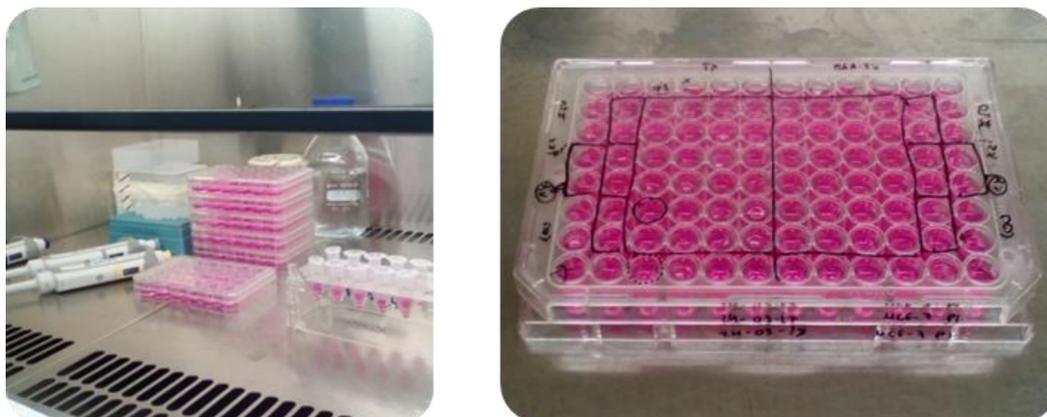


Figura 12. Cultivo de células tumorales en placas de 96 pocillos.

La proliferación celular se determinó mediante Sulfurodamina-B (SRB) siguiendo el protocolo propuesto por Papazisis y cols., (1997). Tras eliminar el medio de cultivo de los pocillos de las placas, las células fueron fijadas mediante la adición de 300 μ L de ácido tricloroacético (TCA) frío al 10% y se dejó incubando durante 20 minutos a 4 °C, lavándose a continuación 3 veces con agua ultrapura y dejando secar a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente, se añadieron 300 μ L de SRB al 0,4% en ácido acético al 1% y se dejó incubar en agitación 20 minutos a temperatura ambiente. Para eliminar el exceso de SRB, se lavaron las placas 3 veces con ácido acético al 1% dejándose secar 24 horas a temperatura ambiente. El colorante fijado sobre las células fue solubilizado utilizando 300 μ L de una solución 10mM Tris-base (10 mM, pH 10,5) en agitación [18]. Tras ello, se cuantificó a 492nm con un colorímetro Titertek MultiskanTM. La densidad óptica (DO) de las células tratadas se comparó con la DO de células no tratadas (100% de viabilidad) para determinar el porcentaje de inhibición relativa (% IR) producida por los tratamientos. El porcentaje de proliferación relativa (PR%) y de inhibición relativa (IR%) se calculó como sigue [19]:

Capítulo I

$$PR \% = \frac{DO_{muestra}}{DO_{control\ negativo}} \cdot 100 \qquad IR \% = 100 - PR \%$$

Figura 13. Retirada del medio de cultivo y resultado de la tinción mediante SRB de células tumorales tras la exposición a tratamiento.

4. ESTUDIO DE ESTABILIDAD EN EL TIEMPO

Los estudios de estabilidad en el tiempo se han enfocado a la evaluación de dos aspectos diferentes, uno físico-químico (la agregación y/o fragmentación) y otro funcional (cuantificación de la reacción antígeno-anticuerpo y capacidad de inhibición de proliferación celular).

El estudio de estabilidad en el tiempo evaluando el proceso de agregación (Capítulo IV) se llevó a cabo mediante el almacenamiento de muestras de los medicamentos correspondientes de IFX (nº lote: 7197411), RTX (nº lote: 249933), CTX (nº lote: 300977), TTZ (nº lote: 247995) y BVZ (nº lote: 252674). También se almacenaron muestras diluidas de IFX y RTX, en viales de vidrio oscuro de 2 mL. Las muestras fueron almacenadas refrigerada a 4 °C protegidas de la luz.

Capítulo I

La evaluación de la estabilidad se realizó mediante comparación de perfiles cromatográficos entre las muestras control (día “0”, recién preparadas y antes de su almacenamiento) y las analizadas en los días posteriores, durante dos semanas. La comparación se realizó mediante el cálculo del área de los picos cromatográficos, a partir de los cuales se obtiene el porcentaje de monómeros y/o agregados y/o fragmentos, así como se obtiene una estimación del peso molecular de la entidad detectada a través del modelo de calibración matemático de la de la columna SEC empleada para el análisis.

Los estudios de estabilidad en el tiempo evaluando la funcionalidad se realizaron para los medicamentos cuyo principio activo es el CTX (Erbitux® lote n° 252674, Capítulo V) y el TTZ (Herceptin® lote n° 250382, Capítulo VI). La funcionalidad fue evaluada mediante el empleo de dos técnicas: enzimoinmunoensayo (ELISA) y ensayos de proliferación de líneas celulares específicas para cada uno de los dos mAbs estudiados. Para ambas técnicas se llevó a cabo el estudio durante 21 días, siendo los días de análisis el día “0” (día control), día 1, día 2, día 7, día 15 y día 21. Las muestras fueron almacenadas en viales transparentes de 2 mL de capacidad en refrigeración, es decir, a 4 °C. Las muestras se analizaron por comparación de resultados los días de análisis con el control (día “0”, muestras frescas).

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] A. Techonolgies, Catálogo Esencial de Cromatografía y Espectroscopía. Guía completa de referencia, 2011-2012 ed.2011.
- [2] Scientific discussion bevacizumab. European Medicines Agency (EMA).
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000582/WC500029262.pdf. (Consultado 14 Abril 2019).
- [3] Data sheet Avastin. European Medicines Agency (EMA).
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000582/WC500029271.pdf. (Consultado 14 Abril 2019).
- [4] Data sheet Cetuximab. European Medicines Agency (EMA).
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000558/WC500029119.pdf. (Consultado 14 Abril 2019).
- [5] Product information Cetuximab.
<http://www.medsafe.govt.nz/profs/datasheet/e/Erbituxinf.pdf>. (Consultado 14 Abril 2019).
- [6] Data sheet infliximab. European Medicines Agency (EMA).
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000240/WC500050888.pdf. (Consultado 15 Abril 2019).
- [7] Product information Infliximab. <http://www.rxlist.com/remicade-drug.htm>. (Consultado 23 Noviembre 2017).
- [8] Data sheet Rituximab. European Medicines Agency (EMA).
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_

Capítulo I

[Product Information/human/000165/WC500025821.pdf](#). (Consultado 15 Abril 2019).

[9] Product information rituximab.

<http://www.medsafe.govt.nz/profs/datasheet/m/Mabtherainf.pdf>.

(Consultado 15 Abril 2019).

[10] Data sheet Trastuzumab. European Medicines Agency (EMA).

[http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000278/WC500074922.pdf)

[Product Information/human/000278/WC500074922.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000278/WC500074922.pdf). (Consultado 15 Abril 2019).

[11] Product information Trastuzumab.

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/103792s5250lbl.pdf. (Consultado 15 Abril 2019).

[12] Scientific discussion ICH Q1B Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products, European Medicines Agency (EMA).

[13] I. Suárez González, Metodología Elisa para estudiar la estabilidad de medicamentos biotecnológicos, Universidad de Granada. Departamento de Química Analítica, Universidad de Granada, 2017.

[14] I. Suárez, A. Salmerón, J. Cabeza, L.F. Capitán, N. Navas, Development of an ELISA assay for the determination of the antibody infliximab in hospital conditions of use, European Journal of Hospital Pharmacy: Science and Practice 19 (2012) 150-151.

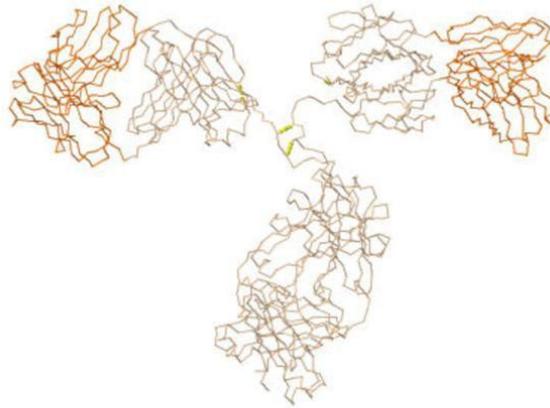
[15] Dichroweb. <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>.

(Consultado 15 Abril 2019).

[16] N.J. Greenfield, Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure, Nat Protoc 1(6) (2006) 2876-2890.

Capítulo I

- [17] G. Perazzoli, Temozolomide Resistance in Glioblastoma Cell Lines: Implication of MGMT, MMR, P-Glycoprotein and CD133 Expression, Plos One, 10(10)(2015): e0140131
- [18] K.A. Orellana EA, Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation, Bio Protoc 6(21) (2016) pii: e1984.
- [19] R. Contreras-Cáceres M.C. Leiva, R. Ortiz, A. Díaz, G. Perazzoli, M.A. Casado-Rodríguez, C. Melguizo, J.M. Baeyens, J.M. Lopez-Romero, J. Prados, Paclitaxel-loaded hollow-poly(4-vinylpyridine) nanoparticles enhance drug chemotherapeutic efficacy in lung and breast cancer cell lines, Nano Research , 10(3) (2017) 856-875.



Capítulo II

Efectos de la degradación acelerada por luz en la agregación de anticuerpos monoclonales terapéuticos comerciales

Capítulo II

Contenido

1. RESUMEN.....	209
2. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO HPLC	211
2.1. CALIBRACIÓN DE LA COLUMNA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO	212
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	213
3.1. PERFIL DE AGREGACIÓN DE LOS MEDICAMENTOS ..	213
3.2. ESTRÉS POR LUZ.....	215
3.2.1. Bevacizumab	216
3.2.2. Cetuximab	221
3.2.3. Infliximab.....	225
3.2.4. Rituximab.....	227
3.2.5. Trastuzumab	230
3.3. ANÁLISIS COMPARATIVO	233
4. CONCLUSIONES.....	237
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	241

Capítulo II

1. RESUMEN

La investigación sobre los efectos que la exposición a la luz puede tener en las proteínas terapéuticas es esencial para garantizar la calidad y la seguridad de los medicamentos en los que se utilizan. Es importante comprender los efectos de la luz sobre la agregación para ayudar a evitar inestabilidades coloidales indeseables, tanto en los medicamentos originales como en los formatos en los que finalmente se administran. En este estudio, se investigaron 5 mAbs terapéuticos comercializados, a saber, bevacizumab (Avastin®), cetuximab (Erbix®), infliximab (Remicade®), rituximab (Mabthera®) y trastuzumab (Herceptin®), con este objetivo. Los medicamentos y 2 preparaciones diluidas en 0,9 NaCl (2 mg/mL y 5 mg/mL) habituales en la práctica clínica, se sometieron a una degradación controlada acelerada por efecto de la luz natural. La formación de agregados se siguió mediante cromatografía líquida de exclusión por tamaño, mediante un método puesto a punto *ad hoc*. Los resultados indicaron que la luz indujo la agregación de todas las proteínas. Este proceso de agregación, producto de degradación, dependió fundamentalmente de la concentración de la disolución de mAb estudiada, aunque las características particulares de cada mAb también influyeron. La fotodegradación también produjo la fragmentación de los mAbs. El daño causado en los mAbs como resultado de la agregación y/o fragmentación inducida por la luz se demostró tanto en los medicamentos como en las formas de preparación diluida. Estos resultados deben considerarse cuando se manejan los medicamentos en la práctica diaria para su administración, así como cuando se evalúa su reutilización en

Capítulo II

condiciones de uso hospitalario fuera de la caducidad indicada por los fabricantes.

2. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO HPLC

Los experimentos iniciales se centraron en la preparación de un método analítico (SE)HPLC-DAD adecuado para analizar los agregados de los mAbs comercializados. Existen diversas columnas cromatográficas en el mercado que está específicamente diseñadas para la detección de agregados de mAb. El primer paso fue, por lo tanto, seleccionar la más adecuada para nuestros propósitos. El intervalo de peso molecular de la columna seleccionada fue de 5 kDa a 1.250 kDa. Aunque este es un amplio intervalo que no muestra una elevada discriminación de pesos moleculares, es el más adecuado para analizar simultáneamente mAbs, sus agregados y fragmentos. Empleamos el método cromatográfico propuesto por el fabricante [1], que indica que los monómeros de los mAb eluyen a aproximadamente 7 min y los dímeros se eluyen aproximadamente un minuto antes de la elución de los mAbs; el tipo de fase móvil a usar, esto es, tampón fosfato 150 mM a pH 7; velocidad de flujo (0,38 mL/min), y temperatura ambiente (25 °C). Como el detector que usamos era un DAD, se verificaron diferentes longitudes de onda simultáneamente (250 nm y 280 nm), y se compararon las intensidades de señal con las obtenidas a 214 nm, siendo esta última siempre mayor. Se requirió el uso del volumen de inyección más bajo (1 μ L) para analizar los medicamentos sin diluciones adicionales que podrían haber enmascarado los resultados. Los volúmenes de inyecciones superiores a 5 μ L dieron señales analíticas saturadas.

Capítulo II

2.1. CALIBRACIÓN DE LA COLUMNA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO

En un intento de evaluar la relación entre el peso molecular y el tiempo eluido de la columna, realizamos una calibración utilizando proteínas con diferente peso molecular. Se usaron tres proteínas para este fin, es decir, apoproteína E (6,5 kDa), albúmina (90 kDa) y BVZ (149 kDa para el monómero y 298 kDa para el dímero). Utilizamos esta estrategia debido a la imposibilidad de usar una proteína con un peso molecular superior a 300 kDa). Además, aceptamos que el pico de elución justo antes del pico principal del medicamento Avastin® correspondía a los dímeros del propio BVZ, según lo indicado por el fabricante de la columna [1]. Esta experiencia mostró que había una relación lineal entre los pesos moleculares y los tiempos de retención estudiados. La Figura 1 muestra la recta de calibrado, donde se puede observar el buen ajuste de los datos experimentales corroborado por el valor del coeficiente de determinación (R^2). La función de calibrado es:

$$y = -56,099x + 492,73$$

donde la variable x es el tiempo de retención y la variable y el peso molecular estimado.

Sin embargo, debemos indicar que el poder de resolución de la columna desde 300 kDa (dímeros) hasta el mayor peso molecular que esta columna pudo detectar (octómeros / 1250 kDa) no se ha verificado experimentalmente (no hay muestras estándar de agregados disponibles); por lo tanto, nos referimos siempre como "dímeros" al pico

Capítulo II

cromatográfico que eluye antes del pico de los monómeros, pero no se excluye el orden más alto de las agregaciones asociadas a este pico cromatográfico a lo largo del estudio. Por ello, al analizar las muestras de las proteínas estándar, se estableció el modelo de regresión que mejor se ajusta a los datos experimentales, que es el que se muestra en la Figura 1, un modelo lineal.

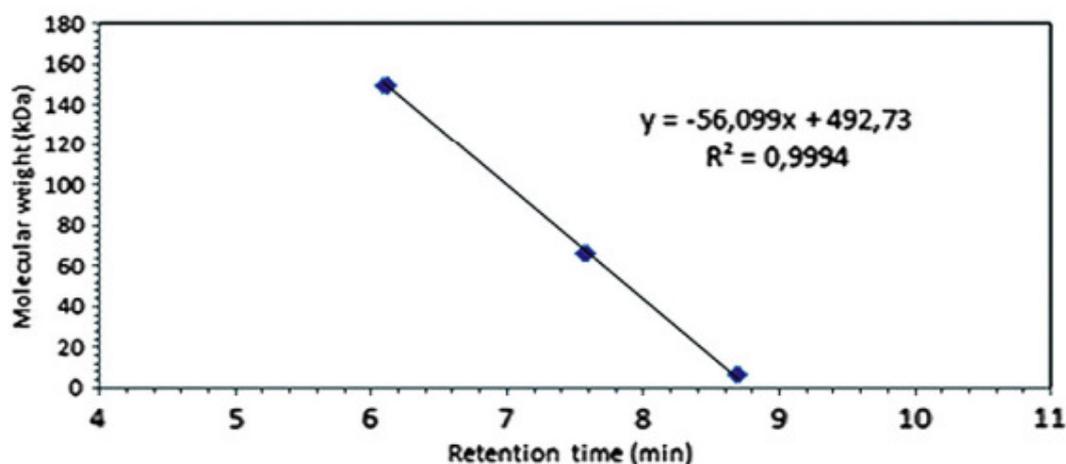


Figura 1. Estimación entre el peso molecular (kDa) frente al tiempo de retención (min).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. PERFIL DE AGREGACIÓN DE LOS MEDICAMENTOS

Un vez optimizado el método (SE)HPLC-DAD, este se empleó para la obtención del perfil de agregados (perfil de tamaños) de los medicamentos estudiados, el cual es el perfil característico de cada medicamento en condiciones de uso, ya que se obtuvo siempre tras abrir

Capítulo II

los medicamentos y dentro del tiempo de uso establecido por el propio fabricante.

La Figura 2 muestra dicho perfil de cromatografía de exclusión por tamaño para los cinco mAb terapéuticos en los medicamentos originales. Estos cromatogramas representan las muestras de control utilizadas con fines de comparación en el estudio de estrés al que se sometieron estos medicamentos. Como puede verse en ellos, todos presentan un pico mayoritario que eluye alrededor de 7 min y que se asigna a los monómeros de los mAbs. En el caso de la medicina correspondiente a BVZ, detectamos claramente un pico cromatográfico que se eluye antes del pico cromatográfico principal correspondiente a los monómeros (Figura 2A). Basándose en los tiempos de retención y siguiendo las indicaciones específicas de la columna [1], estos dos picos cromatográficos se asignaron a dímeros (5,55 min) y monómeros (6,89 min) de BVZ. El porcentaje de los dímeros (2,5%) se calculó como porcentaje del área del dímero con respecto a la suma de las áreas de monómero y dímero.

Capítulo II

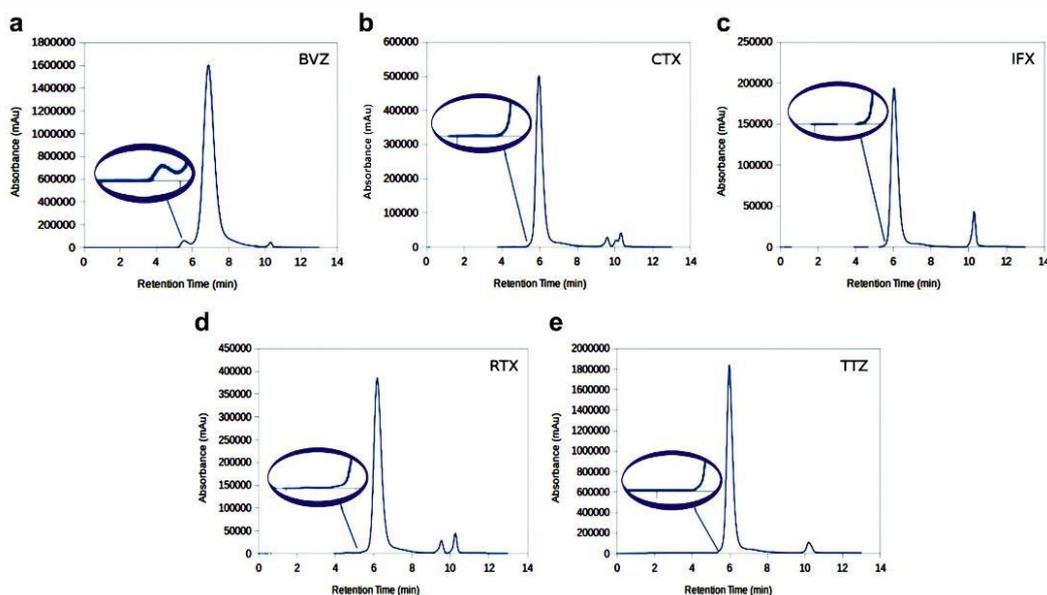


Figura 2. Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de muestras de control de los medicamentos: (A) Avastin® (BVZ), (B) Erbitux® (CTX), (C) Remicade® (IFX), (D) MabThera® (RTX) y (E) Herceptin® (TTZ).

3.2. ESTRÉS POR LUZ

Una vez que el método (SE)HPLC-DAD fue corroborado para el propósito pretendido (detectar cromatográficamente y separar monómeros de mAbs de los órdenes de agregaciones superiores, Figura 1), y el comportamiento intrínseco de la columna definido (modelo de calibración por tamaños), se evaluó la degradación de los medicamentos sometidos a estrés por luz. Las muestras de control (día “0”) se usaron para verificar la degradación comparando los cromatogramas obtenidos los días posteriores de análisis. Los resultados para cada mAb se muestran y comentan a continuación por separado.

Capítulo II

3.2.1. *Bevacizumab*

La Figura 3 muestra los cromatogramas representativos de las muestras de BVZ sometidas a degradación de la luz, tanto del medicamento (25 mg/mL) como de las dos diluciones en 0,9 % NaCl (2 y 5 mg/mL). La elución de los monómeros y los dímeros inicialmente presentes en la muestra de medicina, así como en las muestras diluidas, se caracterizaron a partir de sus tiempos de retención, que se estimaron a partir de cinco muestras analizadas inmediatamente después de abrir el vial del medicamento (cromatograma control). El tiempo medio de retención para el monómero BVZ fue 6,87 min con una desviación estándar (SD) de 0,03 min, lo que significa que para un nivel de confianza de 99,5% ($t = 2,015$; $n = 5$), el tiempo de retención BVZ se estimó en $6,87 \pm 0,06$ min. Para el dímero soluble BVZ, el tiempo de retención se estimó en $5,53 \pm 0,06$ min.

El resultado más evidente obtenido para BVZ (similar para todos los mAbs que estudiamos) fue que la exposición a la luz promovió claramente la agregación. El aumento en el porcentaje de agregados se detectó claramente desde el día 1 (24 horas de exposición). El estudio finalizó en el día 9 (tras 212 horas de exposición) en las muestras diluidas, debido a la turbidez [2-4] en los viales. El pico cromatográfico no identificado a 10,25 min, que según el fabricante de la columna se debe al sistema de fase móvil (frente de elución), fue el único pico que permaneció constante durante todo el estudio de estrés. Los desplazamientos en el tiempo de retención de los dímeros y monómeros en las muestras se atribuyeron principalmente a ligeros cambios en la

Capítulo II

preparación de la fase móvil ya que los picos cromatográficos para monómeros y dímeros se desplazaron todos por igual.

Capítulo II

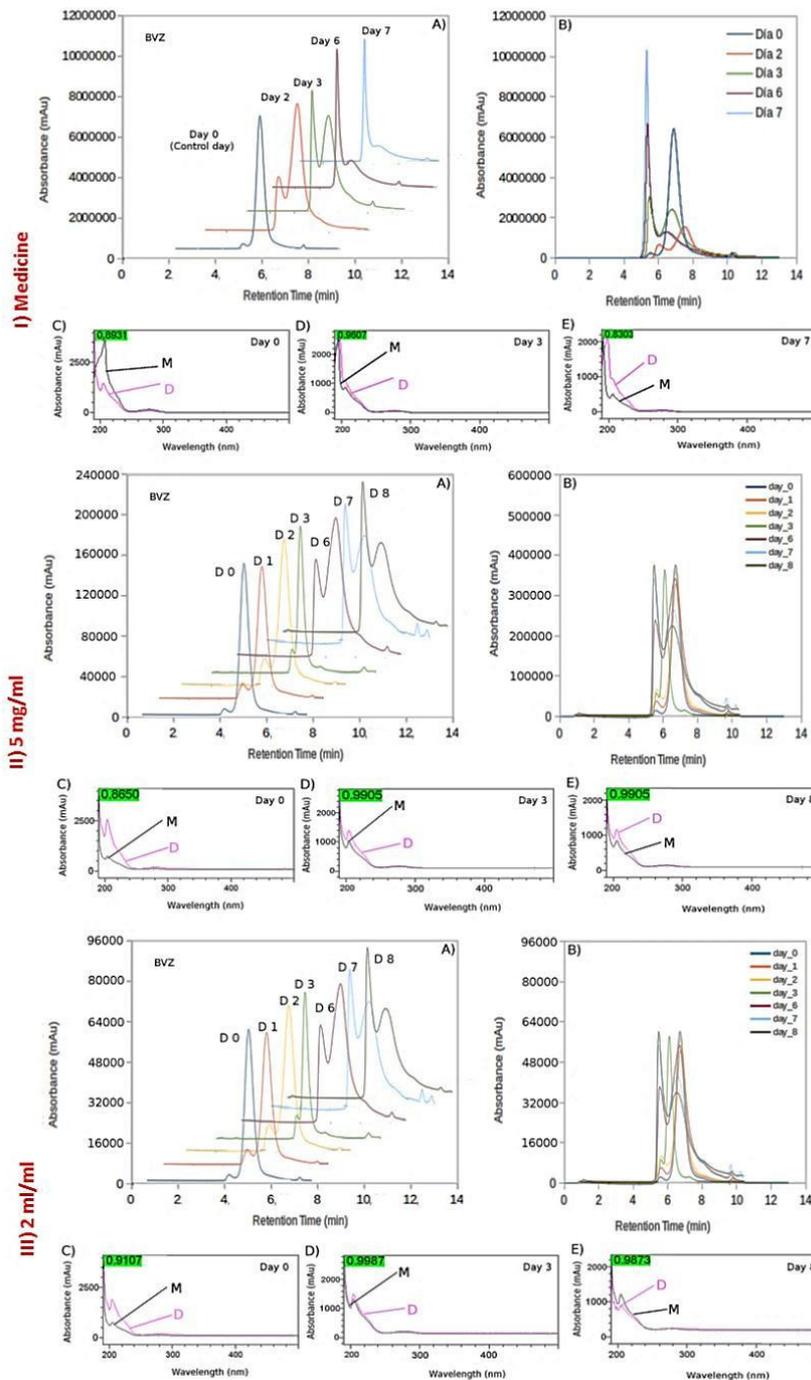


Figura 3. Estudio de estrés por luz de BVZ. I) Medicina (Avastin®, 25 mg/mL). II) Forma diluida del medicamento a 5 mg/mL en 0,9% de NaCl. III) Forma diluida del medicamento a 2 mg/mL en NaCl al 0,9%. Para cada muestra: (A) Evolución del perfil de cromatografía de exclusión por tamaño. (B) Vista frontal de la evolución del perfil de cromatografía por exclusión de tamaño (C) Espectros ultravioleta (señales normalizadas) de los monómeros, M, y dímeros, D, registrados en el día “0” (C), en el día 3 (D) y en el último día analizado (E); resultado de similitud resaltado en verde.

Capítulo II

En la Figura 4 se muestra una estimación de los porcentajes de agregados y dímeros en todos los medicamentos y sus diluciones, calculados como se indicó anteriormente, es decir, a partir de las áreas de los picos cromatográficos. La Figura 4A muestra los resultados obtenidos para BVZ. El valor inicial de 2,4% para los dímeros detectados en BVZ (señales de área de referencia) aumentó gradualmente con la exposición a la luz hasta el 57% de la suma de las áreas cromatográficas para monómeros y dímeros. Este resultado fue claramente diferente del obtenido en las dos muestras diluidas, que mostraron entre ellas respuestas similares a la exposición a la luz. En las diluciones, el porcentaje de dímeros fue inicialmente similar al del medicamento (2,4%), pero la fotodegradación de las muestras diluidas de BVZ no produjo niveles tan altos de agregación dímica como en la muestra de medicamento (Figura 3 y Figura 4A). También, desde el día 6 observamos la degradación de BVZ en ambas muestras diluidas produciendo fragmentos con pesos moleculares más pequeños (deformación del perfil cromatográfico entre 8 -10 min). Estos resultados indicaron que la agregación de BVZ por exposición a la luz fue mayor en la medicina que en las muestras diluidas (como se esperaba debido a la mayor concentración en la medicina), pero la degradación debida a la ruptura de la estructura BVZ parece ser mayor en la dilución muestras. Aunque el área de los monómeros se midió sin incluir la deformación asignada a los fragmentos con pesos moleculares más pequeños, esto se corroboró no afectó significativamente a los resultados principales, es decir, el aumento en el proceso de agregación que se detectó desde los primeros controles para todas las muestras, lo que indica un daño importante a la proteína principalmente debido a este proceso de

Capítulo II

agregación. Esto se puede corroborar claramente en la evolución de los perfiles cromatográficos (Figura 3 A y B).

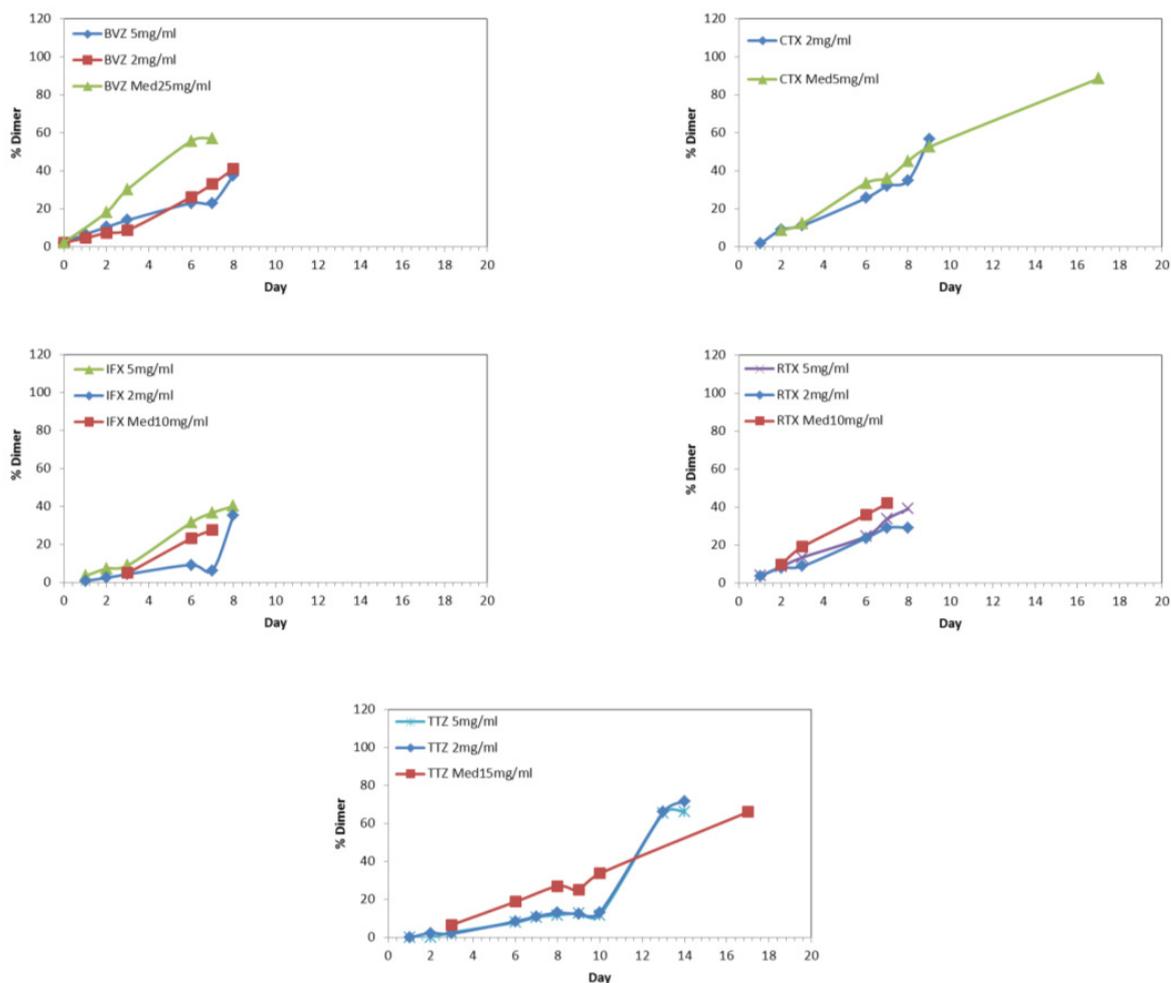


Figura 4. Porcentaje de agregados expresados como dímeros (el porcentaje de la suma de las áreas del pico cromatográfico de monómeros y dímeros) a lo largo del estudio de estrés lumínico: A) BVZ, B) CTX, C) IFX, D) RTX y E) TTZ.

Las longitudes de onda de absorción máxima (205 nm y 276 nm) y las formas generales fueron similares en los espectros de los monómeros y los dímeros, sólo con ligeras diferencias entre 205 nm y 240 nm (Figura 3, día “0”). Aunque la señal a 214 nm utilizada para

Capítulo II

registrar los cromatogramas estaba comprendida dentro de este intervalo, nuestra investigación confirmó que tanto los cambios asociados con esta longitud de onda en los espectros no afectaron significativamente el estudio de la evolución de los agregados pues los, cambios en la intensidad no fueron importantes. Usando el test de similitud espectral estudiamos las similitudes entre los espectros para los monómeros y los agregados. Es interesante observar que la mayor disimilitud se observó en las muestras originales (día “0”) Una vez que estas muestras se someten a un estrés leve, los espectros tienden a ser similares (en el día 3). Esto sugiere que BVZ en forma monomérica y dimérica presenta diferentes características espectrales, y que por degradación, los monómeros resultantes sufre una degradación química asemejándose a los agregados. La mayor disimilitud observada al final del estudio fue para el medicamento, lo que podría indicar que BVZ en esta muestra sufrió la mayor degradación. También se comprobó, mediante el test de pureza espectral del píico cromatográfico, que la homogeneidad de los compuestos eluidos en cada píico cromatográfico del perfil.

3.2.2. *Cetuximab*

El tiempo de elución de los monómeros de CTX se estimó a partir de la muestra de control de la medicina (día “0”); el valor obtenido fue $5,94 \pm 0,04$ min ($t = 2,015$; $n = 5$). Los agregados no se detectaron en ninguna de las muestras analizadas el día “0” (Figura 5), pero comenzaron a formarse después de la exposición a la luz. Ambas formas (medicamento 5 mg/mL y su dilución 2 mg/mL) reaccionaron a la exposición a la luz de la misma manera y no se observaron diferencias significativas (Figura 4B). El peso molecular del producto de agregación

Capítulo II

se estimó a partir de su tiempo de retención en 276,12 kDa, por lo tanto asignado a una forma dimérica del CTX. A partir de los cromatogramas, se dedujo que no se formaron órdenes de agregación superiores a los dímeros; sin embargo, como ya lo hemos indicado anteriormente, se ha seguido la indicación del fabricante para esta asignación y no está totalmente excluido que el orden superior de las agregaciones pueda representarse en este tipo de picos cromatográficos. Los picos de alrededor de 10 minutos se deben a la fase móvil y no están relacionados con el mAb ni con productos procedentes del medicamento ya que no sufrieron ningún cambio durante el estudio de estrés.

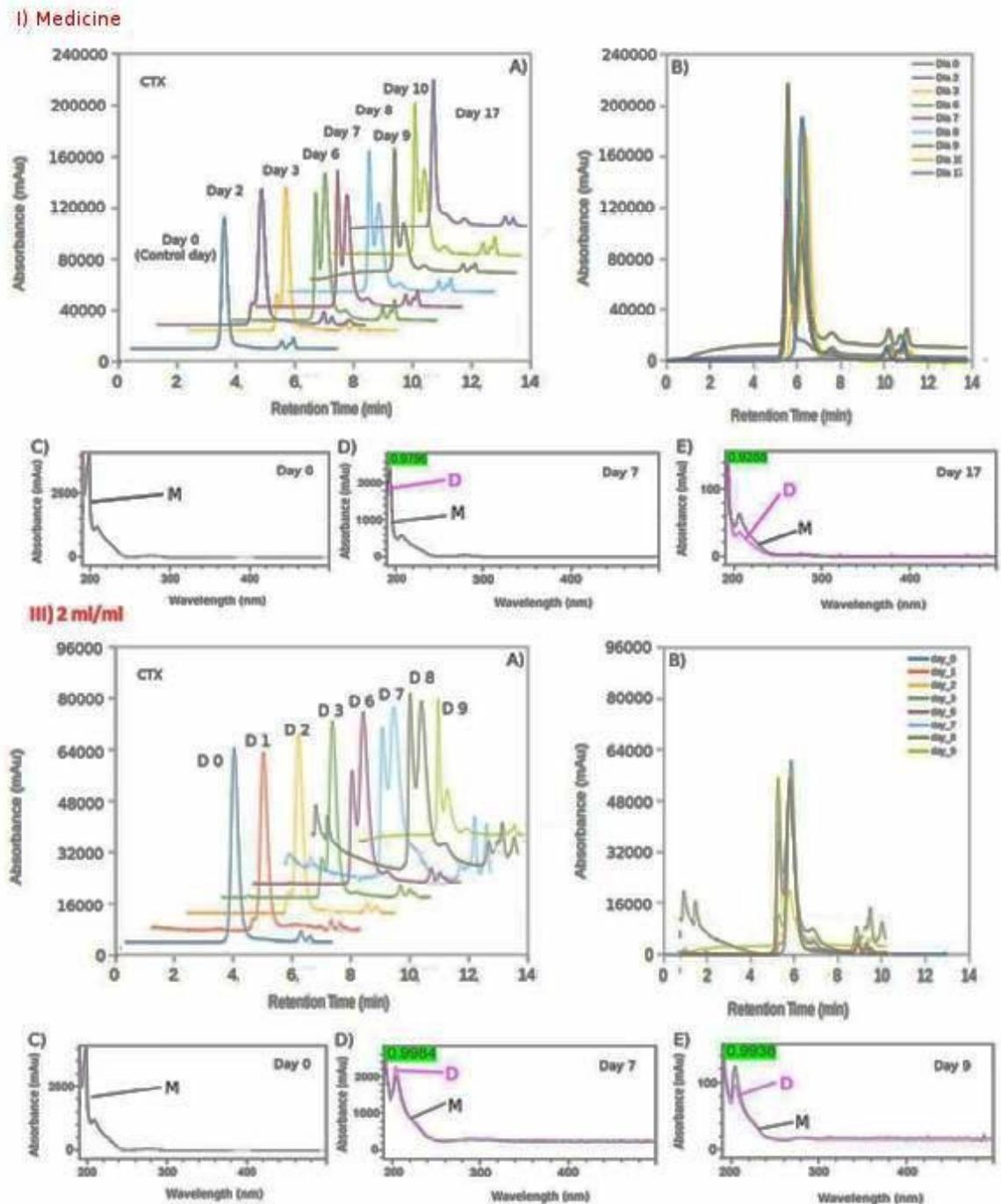


Figura 5. Estudio de estrés por luz de CTX. I) Medicina (Erbix®, 5 mg/mL). II) Forma diluida del medicamento a 2 mg/mL en 0,9% de NaCl. Para cada muestra: (A) Evolución del perfil de cromatografía por exclusión de tamaño. (B) Vista frontal de la evolución del perfil de cromatografía de exclusión por tamaño (C) Espectros ultravioleta (señales normalizadas) de los monómeros, M, y dímeros, D, registrados en el día “0” (C), en el día 3 (D) y en el último día analizado (E); resultado de similitud resaltado en verde.

Capítulo II

Por lo tanto, la agregación en las disoluciones de CTX se detectó claramente desde el día 1, en porcentajes similares para el medicamento y su dilución. La principal diferencia se produjo en el tiempo que en detectarse la turbidez, que en la forma diluida ocurrió el día 10 cuando el porcentaje de dímeros había alcanzado el 57,0%. Para la muestra de medicina, el experimento finalizó el día 17 debido a que el pico cromatográfico de los monómeros era muy pequeño, lo que indica una fracción importante de agregados (85,5%); sin embargo, no se detectaron partículas visibles (turbidez) en el vial y permanecieron transparentes durante todo el estudio. Este hecho podría deberse a la mayor concentración de estabilizantes en la medicina.

Se puede observar un detalle interesante en la Figura 5, la evolución de la cola del pico cromatográfico de los monómeros en ambas muestras (Figura 5). Esta cola se convierte en un pico cromatográfico claro a 7,19 min, lo cual estima un peso molecular de 84,67 kDa. Este valor representa aproximadamente la mitad del peso molecular del CTX, lo que sugiere que la fotodegradación de los mAbs se debió en parte también a la ruptura de los puentes disulfuro entre las cadenas pesadas. Este tipo de daño se ha propuesto como la principal vía fotolítica para la cistina en proteínas [5].

En este caso, y a diferencia con lo obtenido para BVZ, los espectros ultravioleta de monómeros y agregados fueron muy similares entre ellos y a su vez, entre las dos muestras, medicina y forma de dilución, como se puede ver en la Figura 5C. Estos espectros fueron casi idénticos con tres máximos de absorción detectados a 192 nm, 204 nm y 275 nm, permaneciendo constantes a lo largo del estudio. Por otra parte,

Capítulo II

el análisis de pureza espectral de los picos cromatográficos indicó nuevamente la ausencia de impurezas.

3.2.3. *Infliximab*

De manera similar a BVZ y RTX (discutido a continuación), la fotodegradación acelerada de IFX se finalizó el día 7 (medicina) y el día 8 (diluciones) debido a la detección de turbidez, por tanto, después de 192 y 216 horas de exposición a la luz respectivamente (Figura 6). Los monómeros de IFX se caracterizaron a 6.02 ± 0.01 min ($t = 2,015$; $n = 5$) en los cromatogramas para la muestra de control (medicina, día “0”). La agregación dimérica fue sugerida por una deformación de la línea de base justo antes de la elución de los monómeros desde los primeros días analizados (Figura 6, día 1 y día 2) y confirmada después de 72 horas de exposición a la luz por un pico cromatográfico a 5,34 min, correspondiente a un peso molecular estimado de 269,29 kDa. La evolución en cuanto a los dímeros (Figura 4C) indicó un comportamiento similar en el medicamento y la disolución menos diluida, siendo la más diluida la que pareció más resistente a la formación de agregación, hecho que se puede justificar en base a su menor concentración. Y como era de esperar debido a la mayor concentración, la exposición a la luz produjo turbidez en el medicamento 24 horas antes que en las formas diluidas. Un pequeño pico cromatográfico a 7,18 min (correspondiente a un peso molecular de 84,67 kDa), se detectó claramente desde el día 6, y se sugiere es el resultado de la ruptura de las cisteínas entre las cadenas pesadas del monoclonal [5].

Capítulo II

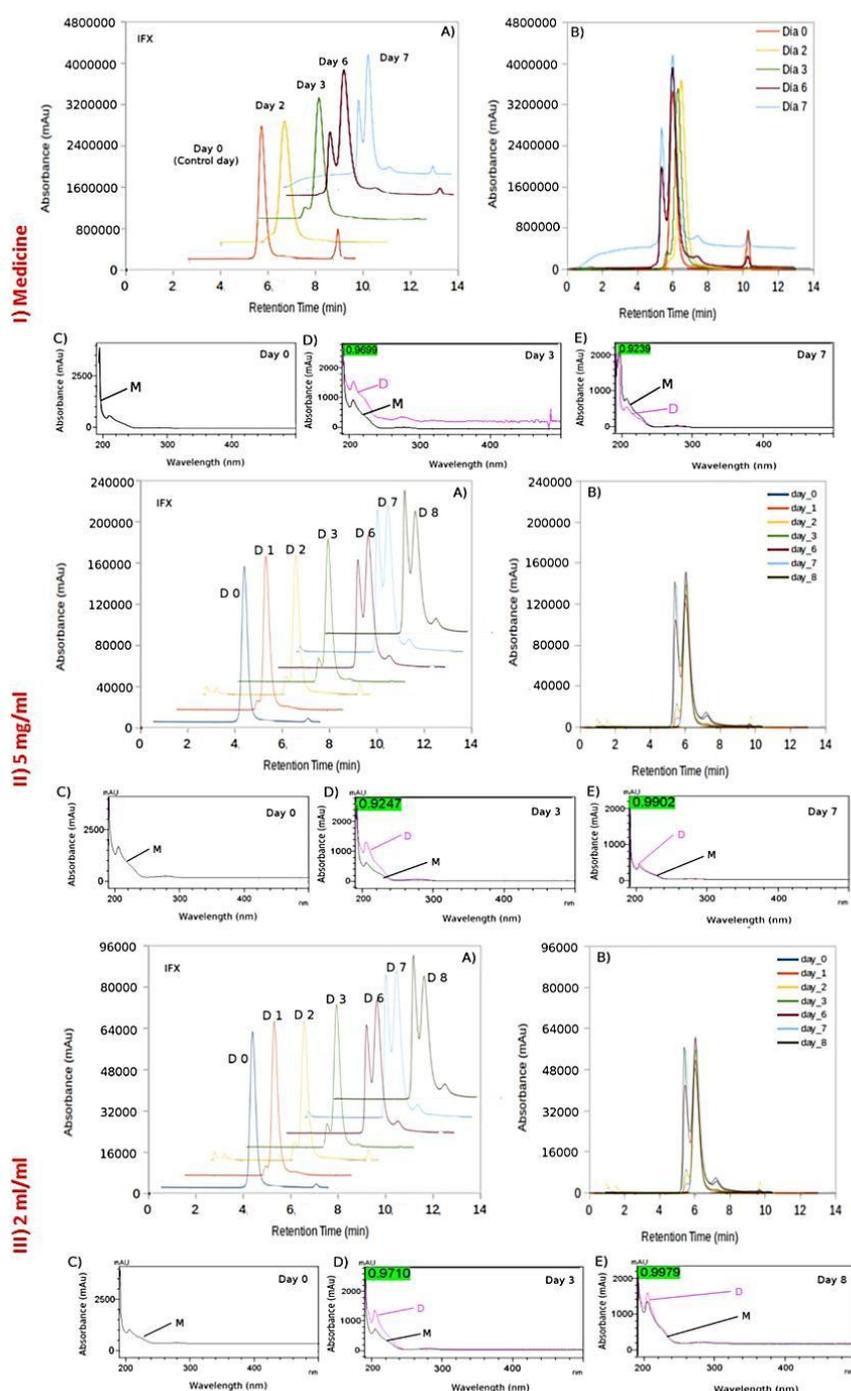


Figura 6. Estudio de estrés por luz de IFX. I) Medicina (Remicade®, 10 mg/mL). II) Forma diluida del medicamento a 5 mg/mL en 0,9% de NaCl. III) Forma diluida del medicamento a 2 mg/mL en NaCl al 0,9%. Para cada muestra: (A) Evolución del perfil de cromatografía de exclusión por tamaño. (B) Vista frontal de la evolución del perfil de cromatografía de exclusión por tamaño (C) Espectros ultravioleta (señales normalizadas) de los monómeros, M, y dímeros, D, registrados en el día “0” (C), en el día 3 (D) y en el último día analizado (E); resultado de similitud resaltado en verde.

Capítulo II

Los tres máximos de absorción característicos se detectaron nuevamente en los espectros ultravioleta de IFX pero ligeramente desplazados (195 nm, 205 nm y 278 nm) con respecto a los espectros de los mAbs anteriores. Una vez más, las características espectrales de los monómeros y agregados (sugeridos como dímeros) fueron similares (Figura 6C), con ligeras diferencias en las intensidades entre 205 nm y 240 nm. El test de análisis espectral realizado en los picos cromatográficos indicó la ausencia de impureza, que puede correlacionarse con la ausencia de heterogeneidad significativa debida a la fotodegradación. La prueba de similitud indicó una alta similitud entre los monómeros y los agregados antes de que se detectara la turbidez, con un coeficiente de correlación de similitud de más del 99%.

3.2.4. *Rituximab*

El proceso de agregación RTX fue similar para las tres muestras estudiadas (Figura 7). La turbidez se produjo después de 192 horas (día 8) y 216 horas (día 9) de exposición a la luz para el medicamento y las formas diluidas, respectivamente. Como con los otros mAbs, la muestra de control de medicamento de RTX se usó para estimar el tiempo de retención para los monómeros, y el resultado fue $6,16 \pm 0,04$ ($t = 2,015$; $n = 5$). No se detectaron agregaciones en estas muestras. Tras someter las muestras a la luz, se detectó un pico cromatográfico alrededor de 5,40 min, lo cual indicó un compuesto con un peso molecular de 269,29 kDa, lo que sugiere la formación de agregados diméricos de RTX, pero como ya ha sido comentado anteriormente, no excluimos totalmente órdenes de agregación mayores en las muestras. Igualmente, los picos alrededor de 10 min se asignan efectos de la fase móvil o a algún excipiente resistente

Capítulo II

del medicamento, y no el resultado de la degradación de RTX, dado que se detectaron en la muestra de control y se mantuvieron constantes durante todo el experimento. La deformación del perfil cromatográfico después de eluir los monómeros y hasta 8,5 min sugirió la presencia de una mezcla de compuestos, y por lo tanto, diversos patrones de fragmentación de RTX cuando se expone a la luz.

En cuanto al proceso de agregación en función de la concentración (Figura 4 D), este fue muy similar, aunque el porcentaje de agregados fue mayor en el medicamento –atribuido a su mayor concentración 10 mg/mL-, y muy similar en las dos diluciones del mismo -5 mg/mL y de 2 mg/mL-.

Capítulo II

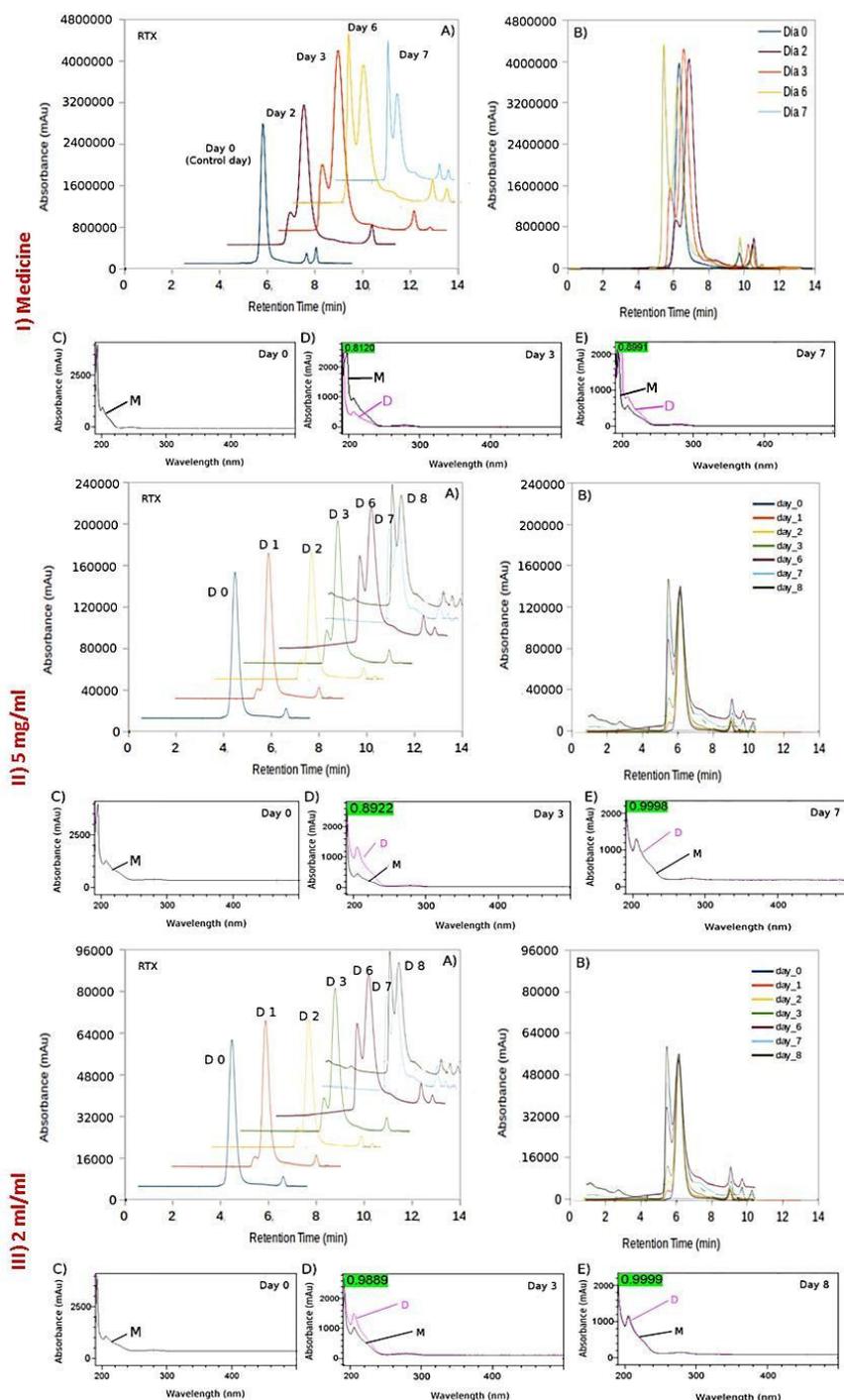


Figura 7. Estudio de estrés por luz de RTX. I) Medicina (Mabthera®, 10 mg/mL). II) Forma diluida del medicamento a 5 mg/mL en 0,9% de NaCl. III) Forma diluida del medicamento a 2 mg/mL en NaCl al 0,9%. Para cada muestra: (A) Evolución del perfil de cromatografía de exclusión por tamaño. (B) Vista frontal de la evolución del perfil de cromatografía de exclusión por tamaño (C) Espectros ultravioleta (señales normalizadas) de los monómeros, M, y dímeros, D, registrados en el día “0” (C), en el día 3 (D) y en el último día analizado (E); resultado de similitud resaltado en verde.

Capítulo II

En cuanto a los tres máximos de absorción, se detectaron nuevamente a 193 nm, 205 nm y 279 nm con diferencias principalmente en la intensidad del máximo a 205 nm. Estas diferencias se redujeron a medida que las horas de exposición a la luz aumentaron y fueron casi idénticas al final del estudio con un coeficiente de similitud de más del 99,0% (Figura 7C). Nuevamente, este comportamiento sugiere que los cambios en los monómeros los “acercan” a los “dímeros”, ya que los espectros de los monómeros tienden hacia los espectros de los dímeros con el aumento de la exposición a la luz. El análisis de pureza espectral de los picos cromatográficos indicó nuevamente altos niveles de la misma.

3.2.5. *Trastuzumab*

La fotodegradación de TTZ se siguió hasta el día 17 (medicamento) y el día 14 (formas diluidas). Por lo tanto, las muestras se expusieron a la luz durante 408 y 336 horas, respectivamente. Los perfiles cromatográficos de la medicina y las dos muestras diluidas fueron ligeramente diferentes (Figura 8). En la muestra de medicina, el perfil cromatográfico de TTZ en el día “0” exhibió una cola después del pico principal de los monómeros que se convirtió gradualmente en un pico cromatográfico bien visible a 7,19 minutos el último día (día 17). El pico cromatográfico monomérico disminuyó gradualmente con las horas de exposición a la luz, mientras que el pico asignado a los agregados aumentó proporcionalmente a la disminución del de los monómeros, para llegar a representar el 66% del área de ambos picos. El tiempo de retención característico estimado para TTZ (medicina) fue $5,96 \pm 0,03$ min ($t = 2,015$; $n = 5$) usando los datos del día de control (día “0”); para

Capítulo II

los agregados, el tiempo de retención se cambió de 5,44 min (día 3) a 5,27 (día 17), hecho atribuido a un aumento en la concentración durante el período de exposición a la luz. El peso molecular estimado para el pico de elución a 5,27 min fue de 281,35 kDa, y correspondería a dímeros. No se detectaron picos en tiempos de retención más cortos, que indicarían órdenes superiores de agregación. El pico a 7,19 minutos también se detectó claramente para este mAb, correspondiendo por tanto a fragmentos con un peso molecular de 84,67 kDa, que representaba aproximadamente la mitad del peso molecular de TTZ. Esto sugirió nuevamente que la fotodegradación de los mAb se debía a la ruptura del puente disulfuro entre las cadenas pesadas [5]. La deformación de los perfiles cromatográficos después de eluir los monómeros y hasta alrededor de 10 minutos, nuevamente sugirió mezclas de compuestos como en el estudio de RTX, indicando diferentes patrones de fragmentación de TTZ debido a la exposición a la luz.

El proceso de agregación fue prácticamente idéntico en las dos diluciones del medicamento, pareciendo más robusto frente a la degradación por agregación por el efecto de la luz (Figura 4E). La mayor concentración del medicamento Herceptin® (15 mg/mL) justificaría la mayor extensión del proceso de degradación por agregación de TTZ debido a la exposición a la luz.

Capítulo II

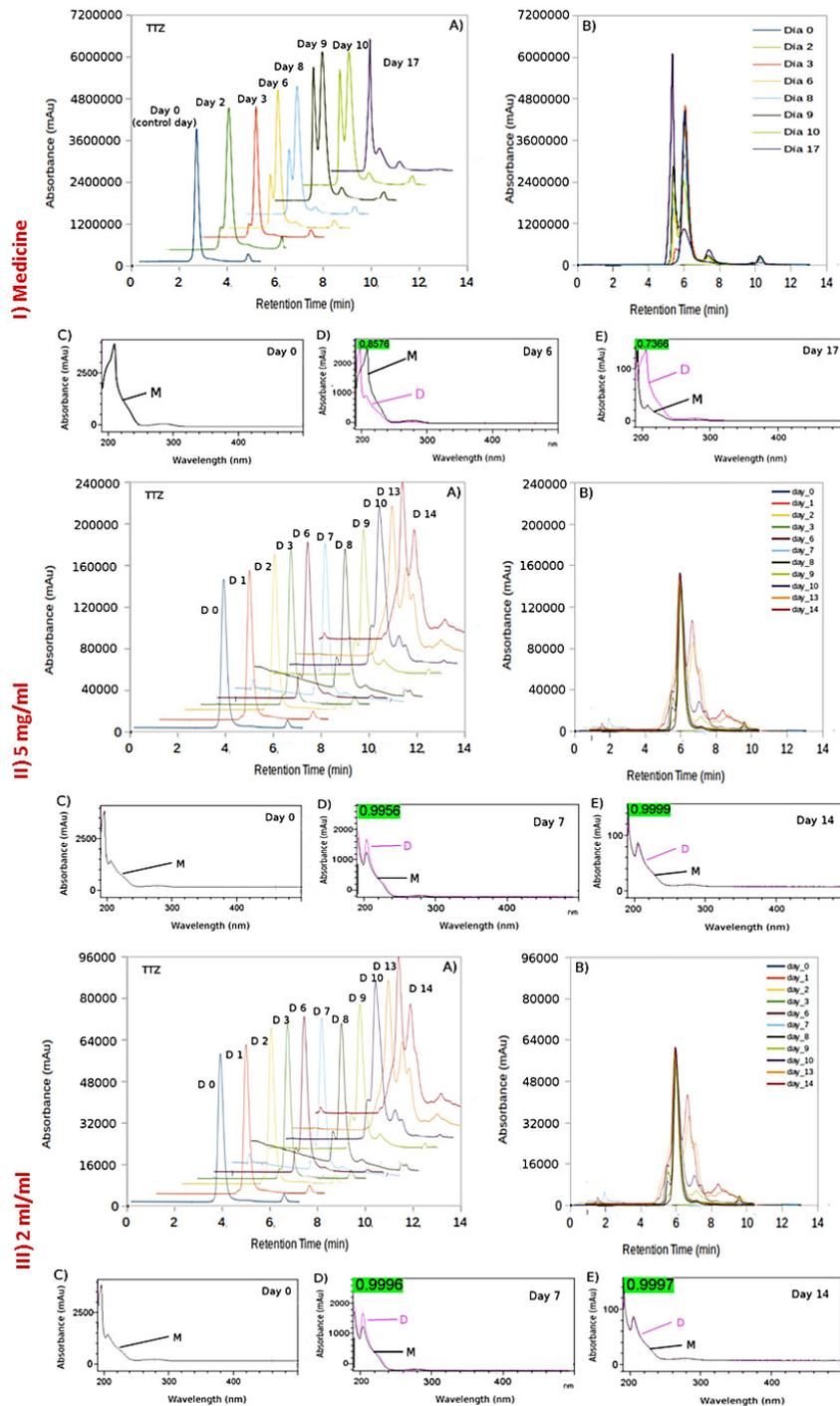


Figura 8. Estudio de estrés por luz de TTZ. I) Medicina (Herceptin®, 15 mg/mL). II) Forma diluida del medicamento a 5 mg/mL en 0,9% de NaCl. III) Forma diluida del medicamento a 2 mg/mL en NaCl al 0,9%. Para cada muestra: (A) Evolución del perfil de cromatografía de exclusión por tamaño. (B) Vista frontal de la evolución del perfil de cromatografía de exclusión por tamaño (C) Espectros ultravioleta (señales normalizadas) de los monómeros, M, y dímeros, D, registrados en el día “0” (C), en el día 3 (D) y en el último día analizado (E); resultado de similitud resaltado en verde.

Capítulo II

En general, los resultados para TTZ obtenidos del análisis de los espectros ultravioleta no difirieron significativamente de los obtenidos para los otros mAb. Los patrones generales y las características (máximos de absorción) de los espectros ultravioleta para los monómeros y agregados fueron similares a los de los mAbs discutidos anteriormente, así como su evolución. Los espectros para monómeros y agregados fueron muy similares, con coeficientes de similitud de más del 99,0% a lo largo del estudio. El análisis de pureza espectral de los picos cromatográficos también indicó la ausencia de impurezas.

3.3. ANÁLISIS COMPARATIVO

Para realizar un análisis comparativo del proceso de agregación provocado por la exposición acelerada a la acción de la luz, se construyó una gráfica por cada concentración estudiada, incluyendo las disoluciones de los cinco mAbs estudiados. La Figura 9 muestra este análisis comparativo, es decir, el porcentaje de agregados, sugeridos como dímeros, en las muestras de medicina (Figura 9A) y en las muestras diluidas a 5 mg/mL (Figura 9B) y 2 mg/mL (Figura 9C).

Con respecto a las muestras de medicamentos (Figura 9A), la pendiente de las curvas y el tiempo transcurrido antes de que se detectara la turbidez son de particular interés. La pendiente de las curvas está relacionada con el valor porcentual de los dímeros y la curva BVZ tuvo la pendiente más pronunciada, como se esperaba debido a su mayor concentración (25 mg/mL), mientras que IFX y TTZ tuvieron la pendiente más pequeña a pesar de sus diferentes concentraciones de 10 mg/mL y 15 mg/mL, respectivamente. CTX (5 mg/mL) y RTX (10

Capítulo II

mg/mL) tenían valores de pendiente intermedios, aunque eran medicamentos con diferente concentración. Estos resultados sugieren que aunque la concentración de mAb es el factor principal que afecta a la agregación inducida por la luz, existen ciertas propiedades características de cada mAb que también influyen en este proceso de alteración de las proteínas. Incluso el tiempo de exposición a la luz necesario para detectar la turbidez varía considerablemente entre los medicamentos, y solo en el caso del medicamento BVZ podría estar relacionado con su alta concentración. Los resultados reflejan que los medicamentos que contienen el TTZ y el CTX fueron los más resistentes a la degradación por la luz.

Capítulo II

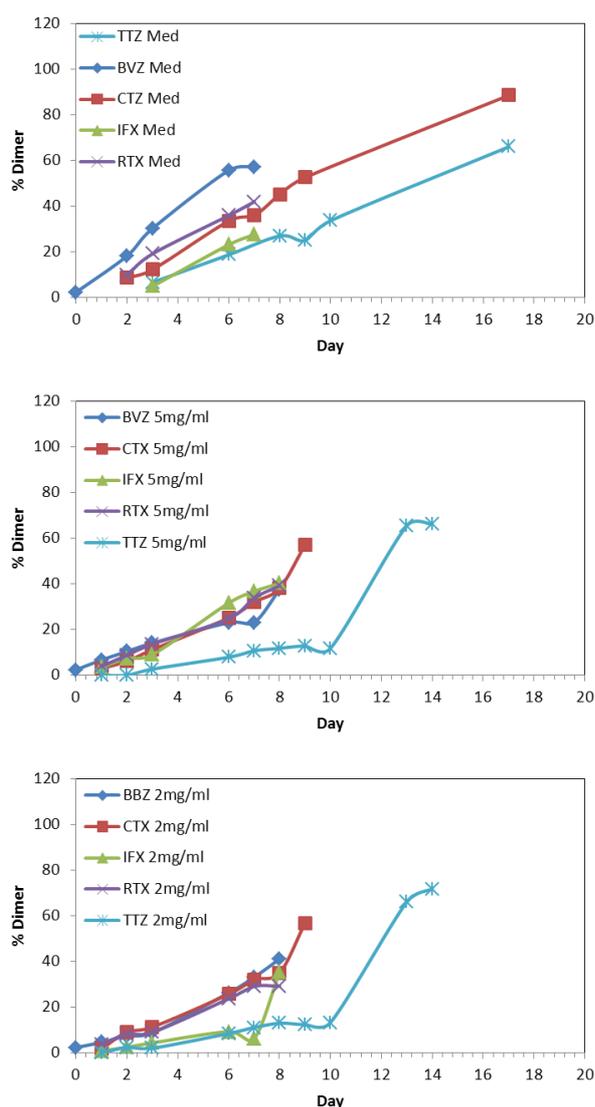


Figura 9. Estudio comparativo de la degradación por efecto de la luz entre medicamentos y sus diluciones: A) medicamentos, B) formas diluidas de los medicamentos a 5 mg/mL en NaCl al 0,9% y C) formas diluidas de los medicamentos a 2 mg/mL en NaCl al 0,9%.

En un intento de explicar este comportamiento, la Tabla 1 muestra el número de Cys, Trp, Phe, Tyr (los aminoácidos más afectados por la fotodegradación) tomados de la estructura primaria de cada mAb publicada en la web pública DrugBank [6]. No hay información sobre la estructura primaria completa del IFX, por lo tanto, se desconoce el

Capítulo II

número de estos aminoácidos y no se incluyó en la Tabla 1. Sin embargo, las diferencias entre los mAb en cuanto a su robustez frente a la agregación inducida por la luz no pudieron ser explicadas por el número de estos aminoácidos en su estructura ya que este número es casi idéntico. Por lo tanto, un orden estructural superior podría ser una explicación probable de las diferencias en su resistencia a la fotodegradación. Los excipientes en los medicamentos también podrían tener un papel importante en este diferente comportamiento.

Tabla 1. Número de CYS, TRP, PHE, y TYR en BVZ, CTX, RTX, y TTZ.

Nombre	CYS	TRP	PHE	TYR	AA Totales
BVZ	15	13	24	32	667
CTX	15	12	23	29	665
RTX	15	14	21	29	664
TTZ	15	12	22	29	665

Pasando a las formas diluidas de los medicamentos, estos se pueden comparar más fácilmente porque se diluyeron a la misma concentración. Los resultados indican (Figura 9B y C) que el comportamiento fue similar para BVZ, CTX y RTX para las dos formas diluidas. Por el contrario, TTZ mostró un patrón muy diferente de agregación dimérica de los otros mAbs (Figura 9B y C). Los resultados indicaron que este mAb es claramente el más resistente en términos de formación de agregación (también en el medicamento), ya que es bastante robusto a la degradación, con el menor porcentaje de agregación

Capítulo II

durante la exposición acelerada a la luz, y sugiriendo un equilibrio colaborativo, ya que “colapsa” en un momento determinado, al final del estudio.

Es interesante observar que se necesitaron menos horas de exposición a la luz para formar partículas visibles, es decir, turbidez, en las muestras diluidas para CTX y TTZ. Para BVZ, CTX e IFX, se necesitaron 24 horas más para detectar la turbidez que en el medicamento correspondiente. El comportamiento fue idéntico para las dos diluciones estudiadas, la de 5 mg/mL y 2 mg/mL.

4. CONCLUSIONES

Aunque los anticuerpos son esenciales hoy en día en la lucha contra varias enfermedades importantes y son ampliamente utilizados, se sabe relativamente poco acerca de cómo la fotodegradación afecta a los mAbs comercializados. Dada la naturaleza compleja de los mAbs, es importante entender cómo los factores externos pueden afectarlos, sobre todo la acción de la luz a la cual se encuentra expuestos durante su manipulación y administración. Por lo tanto, este estudio investigó los efectos de la exposición a la luz sobre la formación de agregados en medicamentos comercializados, y en formas diluidas de los mismos de uso clínico, en los que el principio activo es un mAb. El estudio se llevó a cabo utilizando medicamentos autorizados que contienen BVZ, CTX, IFX, RTX y TTZ como su único principio activo. Aunque es bien sabido que la distribución del tamaño de los agregados probables es amplia, decidimos evaluar los que podrían detectarse mediante SEC, que son los órdenes de agregación inferiores pero que representan el punto de

Capítulo II

partida para el proceso de agregación. Los agregados inducidos por la luz no son dímeros naturales, ya que son el resultado de un proceso de agresión, y su detección es un signo de la degradación de los mAbs.

El perfil de agregación de BVZ antes de la exposición a la luz obtenido por SEC, tanto en los medicamentos como en las dos formas diluidas, ya indica la presencia de agregados. Por lo tanto, la detección de agregados no pudo atribuirse directamente a la concentración del medicamento Avastin (25 mg/mL de BVZ, la concentración más alta de los cinco medicamentos), ya que estaban presentes en porcentajes similares cuando el medicamento se diluyó a 5 mg/mL y 2 mg/mL; esto sugirió la presencia de agregados naturales (dímeros probablemente) de BVZ.

La exposición a la luz indujo la formación de agregados en todas las muestras, tanto en medicina como en sus diluciones. Siguiendo las indicaciones del fabricante de la columna, los agregados podrían identificarse como dímeros ya que no se detectaron otros picos cromatográficos en los tiempos de retención más cortos. Excepto en el caso de BVZ, la fragmentación del mAb, que se detectó en los medicamentos y formas diluidas, fue probablemente el resultado de la ruptura del puente de disulfuro entre las dos cadenas pesadas.

La formación de agregados debido a la fotodegradación parecía estar relacionada sobre todo con la concentración inicial de mAb en el caso de los medicamentos; sin embargo, las características particulares de los mAbs también influyen en este proceso de descomposición de proteínas, que podría verse afectado por la presencia de aditivos en el

Capítulo II

medicamento. De esta forma, el medicamento BVZ (25 mg/mL) fue el más afectado por la agregación y los medicamentos TTZ (15 mg/mL) e IFX (10 mg/mL) fueron los menos afectados; los medicamentos CTX (5 mg/mL) y RTX (10 mg/mL) se vieron afectados pero de forma intermedia.

Cuando los mAb se estudiaron en concentraciones idénticas para estudiar el proceso en condiciones experimentales comparables, es decir, en las dos formas diluidas a 5 mg/mL y 2 mg/mL, el proceso de agregación no se vio afectado por la concentración, con todos los mAb obteniendo resultados idénticos a excepción de IFX, que parecía más resistente a la agregación en la concentración más baja de 2 mg/mL. Si comparamos los resultados para los diferentes mAbs, BVZ, CTX y RTX se comportaron de manera similar, al igual que IFX a una concentración de 5 mg/mL. Los resultados indican que TTZ es el más resistente a la formación de agregados inducidos por la luz. Todo esto sugiere que sus propiedades estructurales intrínsecas jugarían un papel importante en la agregación inducida por la luz.

En general, los espectros ultravioleta para monómeros y agregados fueron muy similares para los cinco mAbs que estudiamos, compartiendo los mismos máximos de absorción. La formación de agregados no promovió, por lo tanto, nuevas bandas de absorción en los espectros ultravioleta. Hubo una tendencia común en la evolución de los espectros ultravioleta de los monómeros que tendían hacia los espectros de los agregados. Esto sugirió que los monómeros experimentan algún tipo de degradación química que los “acerca” a las entidades superiores de agregación. El análisis de los espectros ultravioleta-visibles en todos

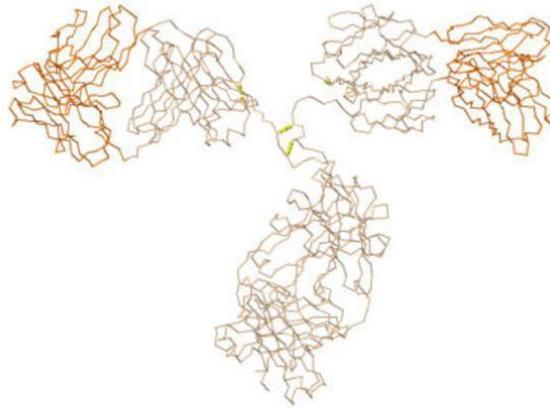
Capítulo II

los casos confirmó que la fotodegradación no promovía cambios químicos que afectaran significativamente los espectros de absorción UV. Los análisis de similitud también corroboraron los altos niveles de similitud entre los espectros para los monómeros y los agregados antes de que se detectara la turbidez.

Finalmente, y como dato de gran interés, este estudio muestra que los cinco medicamentos y sus diluciones utilizados en la práctica clínica diaria se ven afectados por la exposición a la luz debido que promueve la agregación de proteínas. Aunque el estudio realizado aquí se realizó en condiciones extremas de exposición a la luz, indicó que estos medicamentos y sus formas diluidas deben manejarse con cuidado y protegerse de la luz del día en todas las situaciones para evitar riesgos innecesarios. La evaluación de la formación de estos agregados solubles debería ser un aspecto importante a estudiar cuando se determinen fechas de uso fuera de las indicadas por los fabricantes.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Catálogo esencial de cromatografía y espectroscopía. Guía completa de referencia, Agilent Technologies, 2011, pp. 997-999.
- [2] W. Wang, S. Singh, D.L. Zeng, K. King, S. Nema, Antibody structure, instability, and formulation, *J Pharm Sci* 96(1) (2007) 1-26.
- [3] D.J. Belton, A.F. Miller, Thermal aggregation of recombinant protective antigen: aggregate morphology and growth rate, *J Biophys* 2013 (2013) 1-12.
- [4] N. Navas, A. Herrera, A. Martinez-Ortega, A. Salmeron-Garcia, J. Cabeza, L. Cuadros-Rodriguez, Quantification of an intact monoclonal antibody, rituximab, by (RP)HPLC/DAD in compliance with ICH guidelines, *Anal Bioanal Chem* 405(29) (2013) 9351-9363.
- [5] M. Paul, V. Vieillard, E. Jaccoulet, A. Astier, Long-term stability of diluted solutions of the monoclonal antibody rituximab, *Int J Pharm* 436(1-2) (2012) 282-290.
- [6] Drug Bank. <http://www.drugbank.ca/> (Consultado 12 Octubre 2018).



Capítulo III

Estudio de la agregación en anticuerpos monoclonales terapéuticos comerciales sometidos a pruebas de estrés acelerado

Capítulo III

Contenido

1. RESUMEN.....	247
2. ANÁLISIS MEDIANTE (SE)HPLC-DAD	248
2.1. CALIBRACIÓN DE LA COLUMNA ANALÍTICA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑOS.....	248
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	250
3.1. PERFIL DE AGREGACIÓN SEC DE LOS MABS TERAPÉUTICOS NO DEGRADADOS: PERFILES DE CONTROL.....	250
3.1.1. <i>Perfiles de agregación SEC control de IFX.....</i>	<i>252</i>
3.1.2. <i>Perfiles de agregación SEC de control de RTX.....</i>	<i>253</i>
3.1.3. <i>Perfiles de agregación SEC de control de BVZ, CTX y TTZ</i>	<i>254</i>
3.2. PERFIL DE AGREGACIÓN SEC DE LOS MABS TERAPÉUTICOS SOMETIDOS A DEGRADACIÓN FORZADA.....	255
3.2.1. <i>Perfiles de agregación SEC de IFX. Degradación forzada</i>	<i>255</i>
3.2.2. <i>Perfiles de agregación SEC de RTX. Degradación forzada</i>	<i>257</i>
3.2.3. <i>Perfiles de agregación SEC de BVZ. Degradación forzada</i>	<i>259</i>
3.2.4. <i>Perfiles de agregación SEC de CTX. Degradación forzada</i>	<i>261</i>
3.2.5. <i>Perfiles de agregación SEC de TTZ. Degradación forzada</i>	<i>262</i>
4. CONCLUSIONES.....	268
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	271

Capítulo III

1. RESUMEN

La investigación sobre el estrés es esencial durante el desarrollo de proteínas terapéuticas para garantizar la calidad y la seguridad del medicamento final, como ha sido ya indicado en el Capítulo anterior. Un mayor conocimiento de los efectos del estrés sobre la agregación puede ayudar a evitar inestabilidades conformacionales y coloidales indeseables. Teniendo esto en cuenta, se han estudiado cinco anticuerpos monoclonales (mAb) terapéuticos comercializados, a saber, bevacizumab (BVZ), cetuximab (CTX), infliximab (IFX), rituximab (RTX) y trastuzumab (TTZ) en sus medicamentos innovadores. Estos se sometieron a diferentes condiciones de degradación acelerada (estrés) controlada. La formación de agregados se evaluó analizando los perfiles cromatográficos de las muestras sometidas a estrés mediante cromatografía líquida de exclusión por tamaño con detección UV (detector de diodos en fila). Los resultados indicaron que la tendencia a agregarse depende de las condiciones de estrés particulares a las que se someten las muestras y de la concentración y naturaleza específica del mAb, aunque todos comparten una estructura de IgG1 similar. La fragmentación de los mAbs producido por el estrés se atribuyó a la ruptura probable de las cisteínas entre las dos cadenas pesadas, es decir, por ruptura de los puentes disulfuro.

2. ANÁLISIS MEDIANTE (SE)HPLC-DAD

El método empleado en este estudio para el análisis de la degradación de los mAbs en sus respectivos medicamentos de referencia tras someterlos a diversas condiciones de degradación acelerada es el método cromatográfico optimizado en el Capítulo anterior. Por tanto, se evaluarán los productos resultantes de la degradación en base a su tamaño por cromatografía líquida analítica de exclusión por tamaños. El método es el descrito en el Capítulo I de metodología.

2.1. CALIBRACIÓN DE LA COLUMNA ANALÍTICA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑOS

Como paso inicial del estudio, se procedió a la calibración de la columna, es decir, establecer la relación matemática existente entre el peso molecular de una especie o compuesto y su tiempo de elución de la columna, concretamente la 300Bio SEC-5 indicada en el Capítulo I de Metodología. En este caso, se realizó la calibración usando una disolución comercial (kit) conteniendo una mezcla de proteínas estándar con un intervalo de pesos moleculares apropiado para el estudio de los mAbs, sus fragmentos y agregados. El kit de calibración incluyó: tiroglobulina (670 kDa), γ -globulina (150 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), mioglobina (17 kDa) y angiotensina II (1 kDa). La Tabla 1 muestra los tiempos de retención experimentales para estos estándares de proteínas y la Figura 1 muestra la relación estimada entre el peso molecular y estos tiempos de retención experimentales, cuya relación es de tipo logarítmica, con un valor de $R^2 = 0,9633$. La función de calibración obtenida es:

Capítulo III

$$y = 2\,000\,000x^{-4,949}$$

donde la variable x es el tiempo de retención y la variable y el peso molecular estimado.

Tabla 1. Proteínas estándar de calibración de la columna analítica de exclusión por tamaños. Pesos moleculares (kDa) y tiempos de retención (min).

Pico	Proteína	Peso Molecular (kDa)	Tiempo de Retención (min)
1	Tiroglobulina	670	5,504 ± 0,002
2	γ-Globulina	150	6,914 ± 0,003
3	Ovoalbúmina	45	8,291 ± 0,003
4	Mioglobina	17	9,102 ± 0,002
5	Angiotensina II	1	19,869 ± 0,004

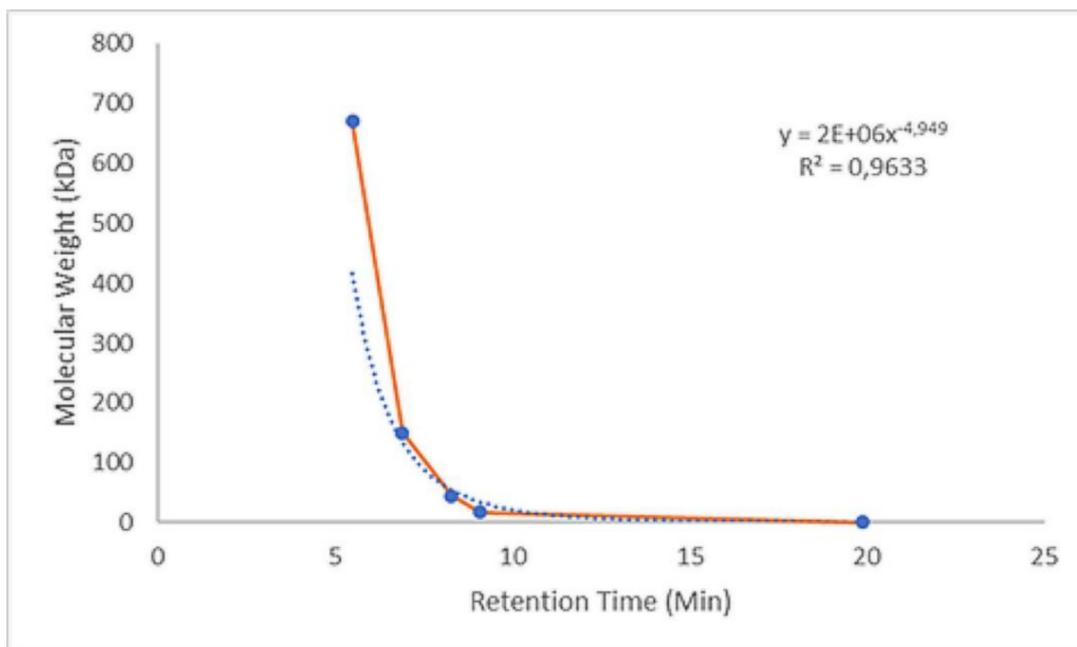


Figura 1. Calibración de la columna SEC: relación entre el tiempo de retención (min) y el peso molecular (kDa).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. PERFIL DE AGREGACIÓN SEC DE LOS MABS TERAPÉUTICOS NO DEGRADADOS: PERFILES DE CONTROL

Los cinco mAbs terapéuticos, es decir, BVZ, CTX IFX, RTX y TTZ, se analizaron mediante (SE)HPLC-DAD con el fin de obtener su perfil de agregados representativo de las condiciones en que se usan normalmente en la práctica clínica. Por lo tanto, este perfil se corresponde con la actividad terapéutica completa de los mAbs y puede considerarse un control de calidad eficaz. Con este fin, los medicamentos se analizaron inmediatamente después de la apertura o preparación, como en el caso de Remicade® (polvo liofilizado para disolución en agua), y siempre dentro de la fecha de caducidad. Este procedimiento permitió

Capítulo III

comparar estos perfiles SEC de control de con los obtenidos más adelante en el estudio de estrés. Las disoluciones diluidas de IFX y RTX también fueron estudiadas para evaluar su degradación forzada. La Figura 2 muestra los perfiles de agregados control. Excepto en el caso de BVZ, se detectó un único pico cromatográfico correspondiente a monómeros en todos los perfiles de control; esto se corroboró al estimar el peso molecular utilizando el modelo de calibración de columna anterior. A continuación se presenta una discusión más detallada de cada perfil SEC.

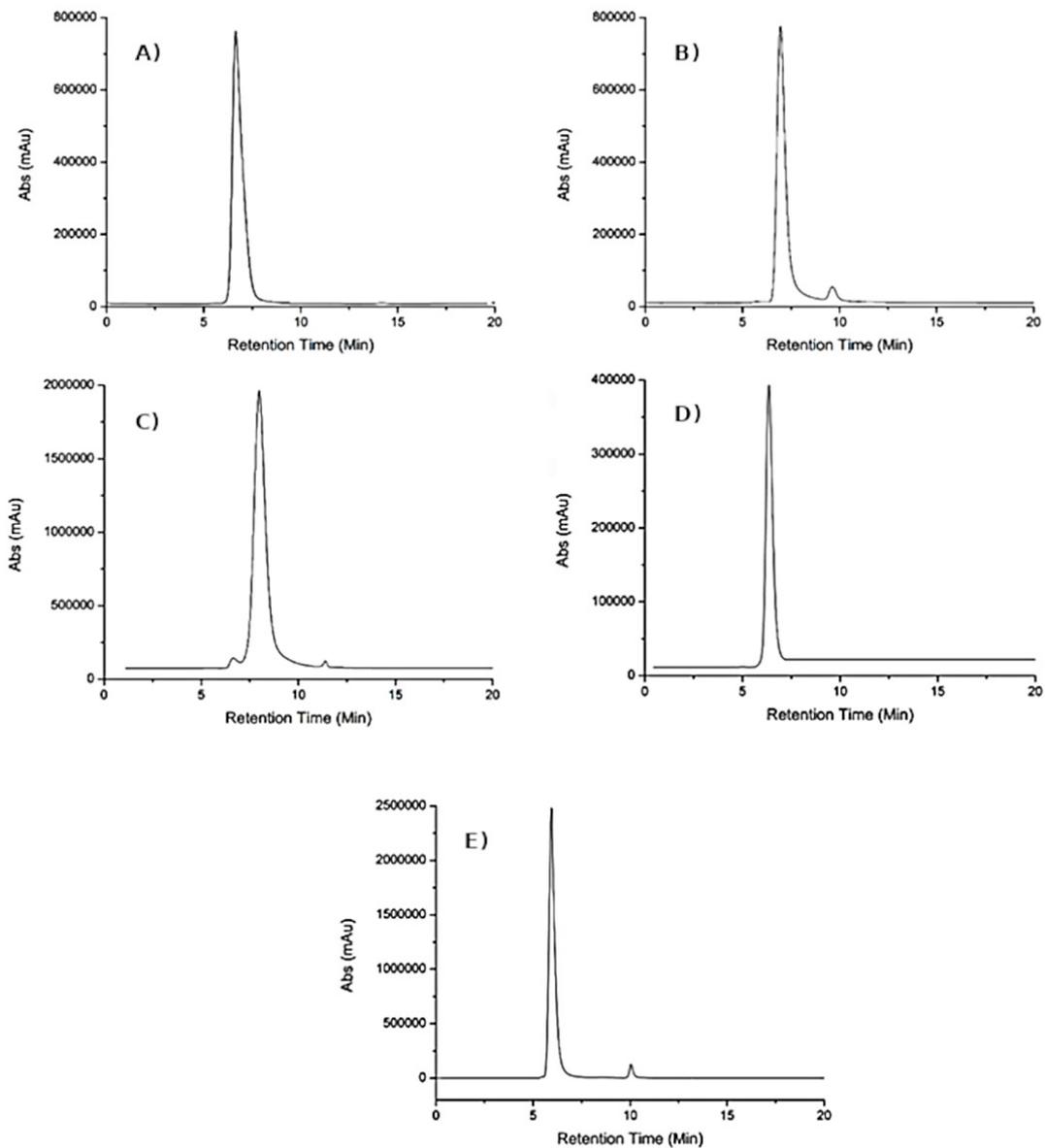


Figura 2. Perfiles de agregación control. A) IFX, B) RTX, C) BVZ, D) CTX y E) TTZ.

3.1.1. Perfil de agregación SEC control de IFX

Las muestras de IFX empleadas para obtener los perfiles de control fueron el medicamento reconstituido en agua para inyección a 10 mg/mL y dos diluciones preparadas en NaCl al 0,9%. Estas diluciones

Capítulo III

fueron 0,5 mg/mL y 2 mg/mL, con el objetivo de cubrir la práctica clínica.

Una vez obtenidos los perfiles de agregación control, se detectaron monómeros de IFX en la disolución de 0,5 mg/mL en el pico cromatográfico a tiempo de retención de $6,75 \pm 0,02$ min; en la dilución de 2 mg/mL en el pico cromatográfico a tiempo de retención de $6,73 \pm 0,01$ min, y se detectaron monómeros de IFX en la disolución reconstituida de 10 mg/mL a $6,74 \pm 0,02$ min. Por lo tanto, un tiempo de retención de 6,73 min se consideró como valor representativo para caracterizar los monómeros de IFX y el perfil SEC del medicamento se usó para propósitos de comparación, (Figura 2A). La pureza espectral de pico fue superior al 99% en todos los casos.

3.1.2. Perfiles de agregación SEC de control de RTX

Las muestras de RTX también se estudiaron a 3 concentraciones: 10 mg/mL -la concentración del medicamento- y en dos diluciones de, 4 mg/mL y 1 mg/mL, preparadas con NaCl al 0,9%.

En todos los perfiles SEC de control se detectaron dos picos cromatográficos. A partir de los tiempos de retención y de los análisis espectrales en los picos cromatográficos, el primer pico se asignó claramente a los monómeros de RTX y el segundo se asignó a los excipientes presentes en el medicamento Mabthera[®]. El perfil SEC de RTX 1 mg/mL en este medicamento se caracterizó por la presencia del pico principal a $6,84 \pm 0,04$ min (y el pico pequeño a $9,52 \pm 0,05$ min, asignado a excipientes); el perfil de RTX 4 mg/mL se caracterizó por el

Capítulo III

pico principal a $6,85 \pm 0,04$ min (y el pico pequeño a $9,54 \pm 0,05$ min, asignado a excipientes), y para el medicamento (RTX 10 mg/mL), se detectó el pico cromatográfico a $6,89 \pm 0,03$ min ($9,56 \pm 0,03$ min para el pequeño pico asignado a los excipientes). En este caso, 6,86 min se consideraron como un valor representativo para el tiempo de retención de RTX. Como en el caso de IFX, el perfil SEC de RTX 10 mg/mL se usó como control (Figura 2B). Se encontró que la pureza espectral de pico era superior al 99% en todas las muestras analizadas.

3.1.3. Perfiles de agregación SEC de control de BVZ, CTX y TTZ

BVZ, CTX y TTZ se estudiaron en forma de medicina, es decir, a concentraciones de 25, 5 y 15 mg/mL, respectivamente. No se consideraron diluciones. El perfil SEC de control para BVZ indicó la detección de los monómeros a $6,87 \pm 0,06$ min con un pequeño pico a $5,89 \pm 0,06$ min (Figura 2C), ambos con espectros UV similares y altos grados de pureza espectral ($> 99\%$). Por lo tanto, este pequeño pico cromatográfico se asignó a la presencia en el medicamento de agregados naturales, probablemente dímeros, por el peso molecular estimado a partir del modelo de calibración (308,84 kDa de peso molecular estimado). La alta concentración de mAb de este medicamento (25 mg/mL) puede explicar la presencia de estos agregados naturales [1].

Los perfiles de agregados SEC de control de CTX y TTZ se caracterizaron por la presencia de un solo pico cromatográfico registrado a $6,65 \pm 0,03$ min (Figura 2D) y a $6,67 \pm 0,05$ min (Figura 2E) respectivamente. No se detectaron órdenes mayores de agregación para estos mAbs. En el caso de CTX, los únicos picos detectados fueron para

los monómeros de mAb, lo que significa también que no se encontraron señales de los excipientes. En el perfil SEC control de TTZ (Figura 2E), se detectó un pequeño pico en torno a $8,3 \pm 0,02$ (peso molecular estimado 56,56 kDa) min, que se asignó a los excipientes del medicamento y no estaba relacionado con TTZ. En todos los casos, se confirmó que los espectros UV bajo el pico cromatográfico de los monómeros correspondían con los de los mAb (por su forma característica), y el análisis de la pureza espectral confirmó que era superior al 99%.

3.2. PERFIL DE AGREGACIÓN SEC DE LOS MABS TERAPÉUTICOS SOMETIDOS A DEGRADACIÓN FORZADA

Las muestras de los medicamentos (BVZ, CTX y TTZ) y las diluciones (en el caso de IFX y RTX) se sometieron a pruebas de degradación forzada. Los resultados del análisis SEC se discuten a continuación para cada mAb.

3.2.1. Perfiles de agregación SEC de IFX. Degradación forzada

La Figura 3 muestra los resultados del estudio de estrés sobre las disoluciones diluidas de IFX en NaCl al 0,9%. El medio ácido (Figuras 3A1 y 3B1) y el medio básico (Figuras 3A2 y 3B2) produjeron la degradación total de IFX, de modo que no se detectó señal en el perfil SEC. Esto significa que el peso molecular de los productos de degradación estaba fuera del intervalo de pesos moleculares que pueden separarse por la columna. Esto indica que el estrés de IFX en medios ácidos o básicos produce altos niveles de degradación, lo cual no era del

todo esperado.

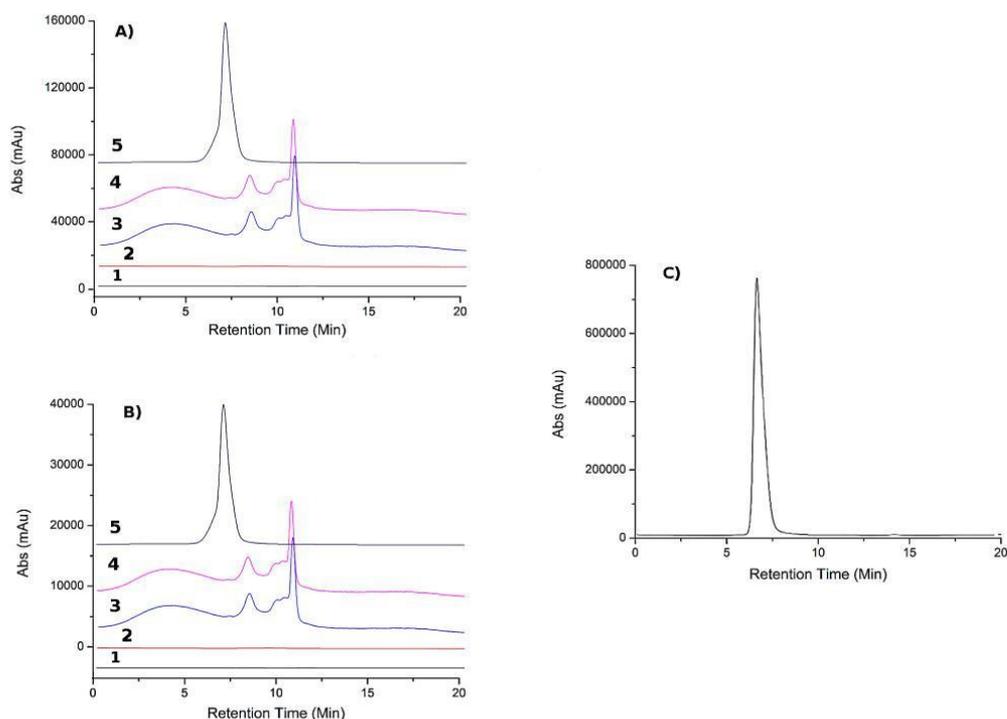


Figura 3. Perfil SEC de muestras estresada de IFX y perfil de control de calidad de IFX (Remicade®). (A) Estrés IFX 2 mg/mL: (1) medio ácido, (2) medio básico, (3) medio oxidativo 1%, (4) medio oxidativo 10%, (5) temperatura 50 °C. (B) Estrés IFX 0,5 mg/mL: (1) medio ácido, (2) medio básico, (3) medio oxidativo 1%, (4) medio oxidativo 10% y (5) temperatura 50 °C. (C) Perfil de control de calidad de IFX (Remicade® 10 mg/mL).

Aunque la condición oxidativa afecta el peso molecular de IFX, se obtuvieron perfiles SEC similares para ambas condiciones ensayadas, es decir, H₂O₂ 1% (Figuras 3A3 y 3B3) y 10%, (Figuras 3A4 y 3B4) y también se obtuvieron resultados similares para las dos diluciones estudiadas. Las señales más notables en estos perfiles oxidativos de SEC fueron un amplio pico alrededor de los 3,5 min, otro a los 8,1 min, y un tercero a los 10,5 min de retención. El análisis de pureza espectral de pico cromatográfico indicó que en el pico a los 3,5 min se eluyeron

Capítulo III

mezclados productos de la degradación, como también se esperaba dado su gran anchura. Los compuestos eluidos a 8,1 min y 10,5 min tenían un alto grado de pureza, como se indicó mediante el análisis de pureza espectral de pico. Los pesos moleculares estimados para los compuestos eluidos en estos dos tiempos de retención fueron de alrededor de 60 kDa y 17 kDa, lo que indica la degradación debida a la ruptura de la cadena de proteína de IFX.

En cuanto a los perfiles correspondientes a la degradación térmica, a 50 °C (Figuras 3A5 y 3B5), estos fueron idénticos para las dos diluciones estudiadas y similares al control. La principal diferencia está en la detección al comienzo del pico de los monómeros de IFX (a $6,85 \pm 0,02$ min) de una deformación que indica el inicio del proceso de agregación. La Tabla 2 muestra los resultados globales de este estudio.

3.2.2. Perfiles de agregación SEC de RTX. Degradación forzada

Los resultados de la degradación acelerada en las muestras diluidas de RTX fueron similares a los obtenidos para las muestras de IFX. Cuando se usaron medios ácidos (Figuras 4A1 y 4B1) y básicos (Figuras 4A2 y 4B2), no se detectaron señales en los perfiles cromatográficos SEC. También los resultados fueron similares en los medios oxidantes de H₂O₂ 1% (Figuras 4A3 y 4B3) y 10% (Figuras 4A4 y 4B4), y también para las dos diluciones probadas. Se detectaron nuevamente tres picos principales, el primero a alrededor de 4,0 min se caracterizó por ser ancho, el segundo a alrededor de 8,4 min y el tercero a 9,6 min. Los pesos moleculares estimados para los dos últimos picos fueron 51,76 kDa y 17,75 kDa. El pico en 4,0 min corresponde a

Capítulo III

productos degradados mixtos, como lo indicó el análisis de pureza espectral de pico. De nuevo, la degradación debido a las condiciones de oxidación en los ensayos conduce a la formación de mezclas de especies de mayor tamaño y a la ruptura de cadenas ligeras y pesadas de los monómeros de RTX.

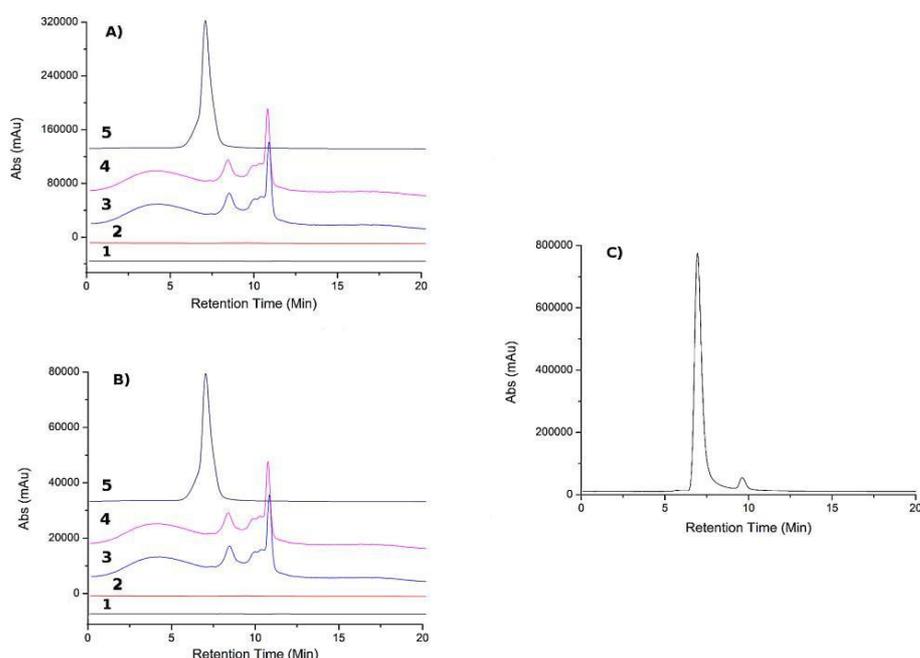


Figura 4. Perfil SEC de muestras estresadas de RTX y perfil de control de calidad (Mabthera®). (A) Estrés RTX 4 mg/mL: (1) medio ácido, (2) medio básico, (3) medio oxidativo 1%, (4) medio oxidativo 10%, (5) temperatura 50 °C. (B) Estrés RTX 1 mg/mL: (1) medio ácido, (2) medio básico, (3) medio oxidativo 1%, (4) medio oxidativo 10%, (5) temperatura 50 °C. (C) Perfil de control de calidad del RTX (Mabthera® 10 mg/mL).

El estrés de temperatura (50 °C) (Figuras 4A5 y 4B5) promueve la agregación, como lo indica la deformación al comienzo del pico de los monómeros RTX. Los monómeros se eluyeron con un alto grado de pureza a $6,73 \pm 0,02$ min y $6,83 \pm 0,04$ min en las diluciones de RTX de

Capítulo III

1 mg/mL y 4 mg/mL, respectivamente, lo que indica un peso molecular estimado de alrededor de 150 kDa.

Estos resultados son muy similares a los obtenidos previamente para IFX, con patrones de degradación similares para todas las condiciones de estrés probadas. Esto probablemente se deba al hecho de que ambos mAbs comparten la misma estructura IgG1. IFX y RTX se probaron a concentraciones similares, lo que contribuye a los resultados similares obtenidos. La Tabla 2 muestra los resultados globales de este estudio, de modo que pueden ser comparados con el resto de mAbs estudiados.

3.2.3. Perfiles de agregación SEC de BVZ. Degradación forzada

Se detectaron cambios en el perfil de agregación SEC de BVZ estudiado en el medicamento Avastin[®] para todas las condiciones de estrés ensayadas, excepto en el caso de la muestra sometida a 50 °C (Figura 5A5), en la que el perfil cromatográfico fue idéntico al del control, manteniendo la señal de los dímeros naturales ya presente en el medicamento Avastin[®] (Figura 5B). Los picos se detectaron a $5,57 \pm 0,03$ y $6,90 \pm 0,04$ min correspondientes a un peso molecular estimado de 407,18 kDa y 141,11 kDa, respectivamente. Esto indicó que BVZ en la concentración de medicamento es muy estable hasta 50 °C (las muestras se sometieron a 50 °C durante 24 horas). Para las condiciones de estrés restantes, la señal cromatográfica de los dímeros naturales se deformó o no se detectó, como ocurrió para las condiciones ácidas en las que el pico principal se registró a $8,05 \pm 0,01$ min, indicando un peso molecular estimado de 66 kDa. Esto sugiere una ruptura de la cadena de proteína,

Capítulo III

probablemente en los enlaces disulfuro. Se observó una deformación al comienzo de este pico cromatográfico, pero no se atribuyó a la agregación debido al alto tiempo de retención (Figura 5A1).

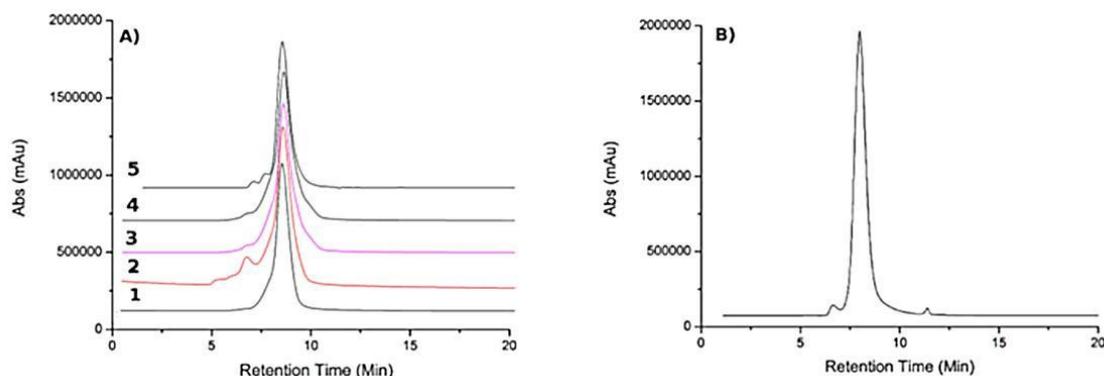


Figura 5. Perfiles SEC de BVZ (Avastin®, 25/mg/mL) (A) Muestras estresadas: (1) medio ácido, (2) medio básico, (3) medio oxidativo 1%, (4) medio oxidativo 10%, (5) temperatura 50 °C. (B) Perfil de Control.

A diferencia del medio ácido, se detectaron deformaciones en el perfil del medio básico a los tiempos de retención correspondientes a las agregaciones (Figura 5A2). Los picos principales estuvieron a $4,98 \pm 0,02$; $6,24 \pm 0,03$ y $8,04 \pm 0,01$ min con pesos moleculares estimados de 708,67 kDa, 232 kDa y 66,21 kDa respectivamente. Esto indica que tanto las agregaciones (con al menos cuatro unidades de monómeros) como los procesos de degradación se promovieron en el medio básico, con una ruptura de la cadena de proteína que produce fragmentos de aproximadamente 66 kDa, resultados similares a los obtenidos en condiciones de estrés ácido.

En los medios oxidantes de H_2O_2 1% y 10% (Figuras 5A3 y 5A4), ambos resultados fueron similares a los del estrés ácido, ya que no se detectan señales a los tiempos de retención correspondientes a la

Capítulo III

presencia de los agregados. Se detectó un único pico principal a $8,05 \pm 0,02$ y $8,10 \pm 0,01$ min para las condiciones oxidativas del 1% y 10%, por lo que corresponde a pesos moleculares estimados de 65,80 kDa y 63,81 kDa, respectivamente, es decir, rupturas de puentes disulfuro entre cadenas de las IgG1.

Por lo tanto, se produjo un patrón de degradación similar para todas las condiciones de estrés (excepto para el estudio de degradación a 50 °C), dando como resultado una fragmentación de alrededor de 65 kDa, rompiendo la cadena de proteína (Figura 5A5). La Tabla 2 muestra los resultados de este estudio.

3.2.4. Perfiles de agregación SEC de CTX. Degradación forzada

Los perfiles de SEC para las muestras de CTX se vieron afectados por todas las condiciones de estrés ensayadas (Figura 6B) y, sorprendentemente, mostraron un único patrón de degradación que era además diferente del resto de los mAbs estudiados. Todos los cromatogramas tenían una forma similar, con dos picos principales: a $6,02 \pm 0,08$ min (277,21 kDa) y $7,30 \pm 0,04$ min (106,77 kDa) para las condiciones ácidas (Figura 4C1), a $6,05 \pm 0,03$ min (270,42 kDa) y $7,32 \pm 0,02$ min (105,33 kDa) para las condiciones básicas (Figura 6A2), a $6,05 \pm 0,03$ (270,47 kDa) min y $7,36 \pm 0,02$ min (102,53 kDa) para H₂O₂ 1% (Figura 6A3), a $6,02 \pm 0,04$ min (277,21 kDa) y $7,35 \pm 0,03$ min (103,22 kDa) para H₂O₂ 10% (Figura 6A4), y $6,05 \pm 0,04$ min (270,47 kDa) y $7,34 \pm 0,03$ min (103,92 kDa) para muestras sometidas a 50 °C por 24 horas (Figura 6A5). Estos indicaban un proceso de agregación que producía dímeros (≈ 270 kDa) y, en menor medida, una alteración de la

cadena de la proteína (≈ 105 kDa), y los dos procesos se producían simultáneamente.

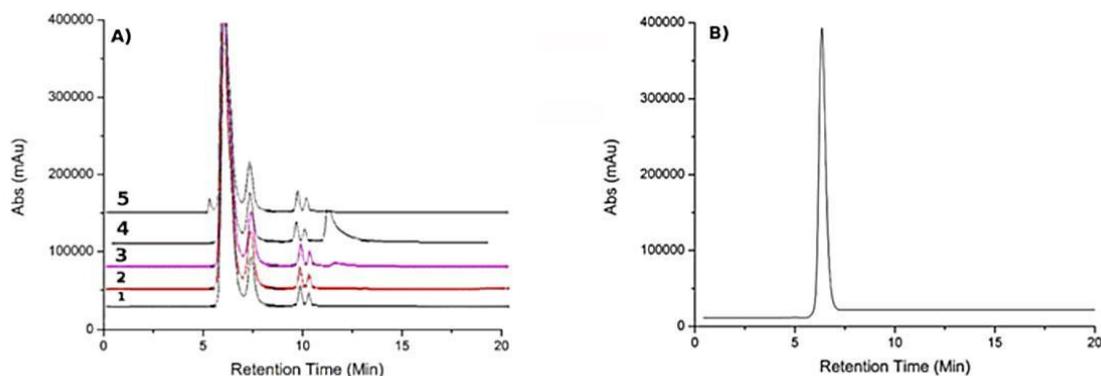


Figura 6. Perfiles SEC de CTX (Erbix[®], 5 mg/mL). (A) Muestras estresadas: (1) medio ácido, (2) medio básico, (3) medio oxidativo 1%, (4) medio oxidativo 10%, (5) temperatura 50 °C. (B) Perfil de control.

En los perfiles cromatográficos para todas las muestras, también se detectaron otros dos picos más pequeños a tiempos de retención más altos, es decir, alrededor de $9,70 \pm 0,03$ y $10,10 \pm 0,02$ correspondientes a pesos moleculares estimados de 26 kDa y 20 kDa, por lo tanto producidos por rupturas de las cadenas proteicas. La Tabla 2 muestra los resultados de todo este estudio, de manera que pueden compararse con el resto de mAbs.

3.2.5. Perfiles de agregación SEC de TTZ. Degradación forzada

Aunque a simple vista (Figura 7) el TTZ (Herceptin[®]) parece el más estable frente a la degradación, esto no es así pues fue detectada agregación en todas las muestras (a excepción de la muestra sometida a 50 °C durante 24 horas), como lo demuestra los ligeros cambios hacia tiempos de retención más pequeños en el pico principal de los perfiles

Capítulo III

SEC de estrés de $6,67 \pm 0,05$ en la el perfil de control TTZ (Figura 7 B) a alrededor de 6,0 min en las muestras sometidas a degradación (Figura 7A5). Esto indicó un peso molecular estimado de alrededor de 270 kDa, lo que podría deberse a la agregación de dos entidades monómeras en dímeros. Los tiempos de retención y los pesos moleculares estimados para cada medio fueron los siguientes: $6,07 \pm 0,01$ min (266,09 kDa) en el medio ácido (Figura 7A1), $6,07 \pm 0,02$ min (266,09 kDa) en el medio básico (Figura 7A2), $6,03 \pm 0,01$ min (274,94 kDa) en el medio oxidante H_2O_2 1% (Figura 7A3), y $6,06 \pm 0,01$ min (268,27 kDa) min en el medio oxidativo H_2O_2 10% (Figura 7A4). En el caso de la muestra sometida a temperatura de $(50\text{ }^\circ\text{C})$ durante 24 horas, el pico principal se detectó a $6,87 \pm 0,07$ min indicando un peso molecular estimado de 144.18 kDa, correspondiente a monómeros de TTZ con un perfil de temperatura SEC similar al control.

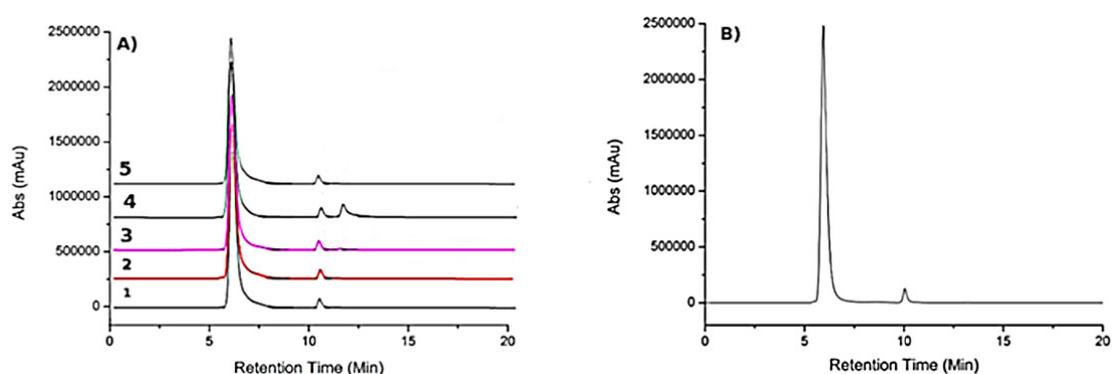


Figura 7. Perfiles SEC TTZ (Herceptin®, 25 mg/mL) (A) Muestras estresadas: (1) medio ácido, (2) medio básico, (3) medio oxidativo 1%, (4) medio oxidativo 10%, (5) temperatura $50\text{ }^\circ\text{C}$. (B) Perfil de control.

Capítulo III

Por otro lado, en el perfil de control SEC TTZ (Figura 7B) se detectó un pequeño pico cromatográfico a $8,3 \pm 0,02$ min, atribuido a algunos de los compuestos utilizados en la formulación del medicamento [2]. Este pico también se vio afectado por el estrés, cambiando a tiempos de retención más altos cuando las muestras se sometieron a las condiciones oxidativas más agresivas (H_2O_2 10%). Esto es coherente con la degradación por oxidación, en la que la integridad de la molécula se ve afectada y parcialmente destruida, produciéndose la degradación a pesos moleculares más pequeños. Por el contrario, este pico no se vio afectado en las muestras sometidas a la temperatura de $50\text{ }^\circ\text{C}$. Los resultados particulares para el tiempo de retención fueron: $10,31 \pm 0,02$ min (19,33 kDa) en el medio ácido, $10,29 \pm 0,04$ min (19,52 kDa) en el medio básico, $10,23 \pm 0,03$ (20,10 kDa) en el medio oxidativo H_2O_2 1%, $10,27 \pm 0,01$ (19,71 kDa) min y $11,29 \pm 0,01$ min (12,34 kDa) en el medio oxidativo H_2O_2 10%. La Tabla 2 muestra los resultados de este estudio junto con el resto de mAbs.

Capítulo III

Tabla 2. Resultados del estudio de degradación controlada: porcentajes de agregación, de monómeros y de degradación relacionada con la disrupción de las cadenas en los cinco mAbs estudiados.

mAbs	Estrés	% de agregación	% de monómeros	% de degradación relacionada con la disrupción de las cadenas
IFX 0,5 mg/mL	Ácido	-	-	-
	Base	-	-	-
	Oxidativo (1%)	22	0	78
	Oxidativo (10%)	23	0	77
	Temperatura	*	-	0
IFX 2 mg/mL	Ácido	-	-	-
	Base	-	-	-
	Oxidativo (1%)	22	0	78
	Oxidativo (10%)	23	0	77
	Temperatura	*	-	0

Capítulo III

(Continuación Tabla 2)

mAbs	Estrés	% de agregación	% de monómeros	% de degradación relacionada con la disrupción de las cadenas
RTX 1 mg/mL	Ácido	-	-	-
	Base	-	-	-
	Oxidativo (1%)	16	0	84
	Oxidativo (10%)	16	0	84
	Temperatura	*	-	0
RTX 4 mg/mL	Ácido	-	-	-
	Base	-	-	-
	Oxidativo (1%)	16	0	84
	Oxidativo (10%)	16	0	84
	Temperatura	*	0	0

Capítulo III

(Continuación Tabla 2)

mAbs	Estrés	% de agregación	% de monómeros	% de degradación relacionada con la disrupción de las cadenas
BVZ 25 mg/mL	Ácido	0	0	100
	Base	15	0	85
	Oxidativo (1%)	0	0	100
	Oxidativo (10%)	0	0	100
	Temperatura	Sin cambio	Sin cambio	0
CTX 5 mg/mL	Ácido	86	0	14
	Base	87	0	13
	Oxidativo (1%)	85	0	15
	Oxidativo (10%)	85	0	14
	Temperatura	86	0	15

Capítulo III

(Continuación Tabla 2)

mAbs	Estrés	% de agregación	% de monómeros	% de degradación relacionada con la disrupción de las cadenas
TTZ 15 mg/mL	Ácido	100	0	0
	Base	100	0	0
	Oxidativo (1%)	100	0	0
	Oxidativo (10%)	100	0	0
	Temperatura	0	100 (Como el control)	0

- No estimado debido a diferentes razones, tales como ausencia de señal, ausencia clara de separación cromatográfica, etc.

* Una deformación del pico indica procesos de agregación iniciales.

4. CONCLUSIONES

Esta investigación ofrece un estudio en profundidad del proceso de agregación en disoluciones clínicas de los cinco mAbs terapéuticos más utilizados en todo el mundo. Los estudios se llevaron a cabo en sus formulaciones medicas innovadoras, es decir, BVZ empleando Avastin®, CTX empleando Erbitux®, IFX empleando Remicade®, RTX

Capítulo III

empleando Mabthera® y TTZ empleando Herceptin®. Los perfiles de agregación cromatográficos obtenidos por (SE)HPLC-DAD fueron utilizados para este propósito.

En primer lugar, se obtuvieron perfiles de agregación SEC de control y se caracterizaron en condiciones que aseguran que los mAbs se encuentran en un estado activo óptimo, tal como los suministra el fabricante, en la formulación del medicamento y también en diversas diluciones de uso clínico. Para lograr esto, el perfil de agregaciones SEC de control se registró dentro de la fecha de vencimiento indicada por el fabricante con muestras preparadas y manipuladas según lo indicado en las especificaciones técnicas del medicamento. Se sometieron alícuotas de los medicamentos a estudios de degradación forzada (estrés) por elevación de temperatura, medios oxidativos, ácidos y básicos. Como se esperaba, todos los mAbs sufrieron degradación que dio como resultado tanto la agregación como la ruptura de las cadenas de proteínas. Dado que las condiciones de estrés se aplicaron durante el mismo período de tiempo a todas las muestras, las más afectadas fueron las que estaban más diluidas, es decir, las muestras diluidas de IFX 0,5 y 2 mg/mL y RTX 1 y 4 mg/mL. A estas concentraciones más bajas, ambos mAb se comportaron de manera similar cuando se sometieron a estrés, con la detección de agregados después de 24 horas de calentamiento a 50 °C, la supresión del perfil de SEC cuando se sometió a medios de estrés ácido y básico, y principalmente la agregación en medios oxidativos. BVZ, en forma de medicamento, que además se corresponde con la disolución más concentrada de las estudiadas, (25 mg/mL), sufrió agregación en todas las condiciones de estrés aplicadas, excepto cuando se somete a temperaturas de 50 °C donde el perfil de SEC permanece comparable al

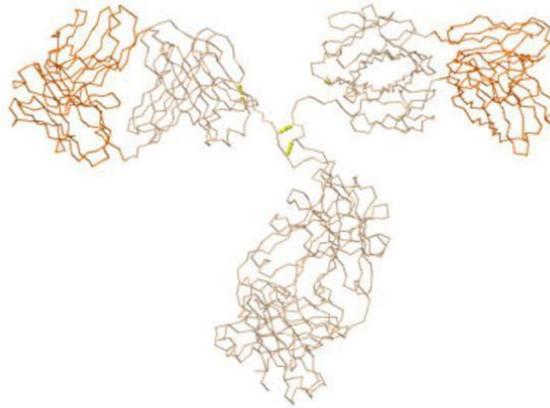
Capítulo III

control, indicando por tanto, gran resistencia a la degradación térmica. CTX, estudiado en el medicamento Erbitux®, fue el único mAb que mostró un pico claro en el perfil SEC atribuido a la ruptura de las cadenas de proteínas y se detectó en todos los estudios de estrés. Los resultados en el caso de TTZ (Herceptin®) parecen indicar dimerización en todas las condiciones de degradación ensayadas.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] J. Hernández-Jiménez, A. Salmerón-García, J. Cabeza, C. Vélez, L.F. Capitán-Vallvey, N. Navas, The effects of light-accelerated degradation on the aggregation of marketed therapeutic monoclonal antibodies evaluated by size-exclusion chromatography with diode array detection, *J Pharm Sci* 105(4) (2016) 1405-1418.

[2] S. Oshinbolu, L.J. Wilson, W. Lewis, R. Shah, D.G. Bracewell, Measurement of impurities to support process development and manufacture of biopharmaceuticals, *Trends Anal Chem* 101 (2017) 120-128.



Capítulo IV

Estudio de la agregación de anticuerpos monoclonales terapéuticos comerciales en estudios de estabilidad en el tiempo

Capítulo IV

Contenido

1. RESUMEN.....	277
2. ANÁLISIS MEDIANTE (SE)HPLC-DAD	278
3. RESULTADOS Y DISCUSSION	279
3.1. ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DE IFX: MEDICAMENTO (REMICADE®) Y DILUCIONES DE USO CLÍNICO	279
3.2. ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DE RTX: MEDICAMENTO (MABTHERA®) Y DILUCIONES DE USO CLÍNICO	283
3.3. ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DE BVZ: MEDICAMENTO (AVASTIN®)	286
3.4. ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DE CTX: MEDICAMENTO (ERBITUX®).....	287
3.5. ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DE TTZ: MEDICAMENTO (HERCEPTIN®).....	290
4. CONCLUSIONES.....	292
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	294

Capítulo IV

1. RESUMEN

Al igual que la investigación sobre el estrés, el estudio de la estabilidad también es esencial en las proteínas terapéuticas. En este Capítulo se presenta el estudio de estabilidad en el tiempo centrado en el proceso de agregación de los mismos cinco anticuerpos monoclonales terapéuticos comerciales estudiados en el Capítulo anterior, es decir, bevacizumab (BVZ), cetuximab (CTX), infliximab (IFX), rituximab (RTX) y trastuzumab (TTZ), en sus correspondientes medicamentos innovadores. Muestras de los medicamentos una vez abiertos los correspondientes viales o recién reconstituidos, así como diluciones habituales en la práctica clínica, se almacenaron en recipientes de vidrio, protegidos de la luz, y refrigerados a 4 °C. El estudio de la agregación se realizó empleando el método de cromatografía líquida por exclusión por tamaños y detección mediante diodos en fila que ha quedado descrito en los Capítulos anteriores. Además, se realizó en paralelo un estudio sobre la estabilidad de estos medicamentos biotecnológicos frente al proceso de congelación / descongelación. Según los resultados obtenidos, BVZ, RTX y TTZ demostraron ser los más estables cuando se almacenan a 4 °C y frente a los ciclos de congelación / descongelación, sin manifestar tendencia a formar agregados. IFX presentó una ligera tendencia a la agregación detectada el último día de estudio a la concentración de medicamento, es decir, 10 mg/mL, mientras que en CTX se detectaron ligeros procesos vinculados con la degradación.

2. ANÁLISIS MEDIANTE (SE)HPLC-DAD

El método de análisis empleado para la determinación de los agregados es el mismo que se ha descrito anteriormente en el Capítulo II y que se destalla en el Capítulo I de Metodología.

El estudio de degradación acelerada mostrado en el Capítulo anterior, además de servir para un estudio de detallado de las posibles vías de degradación de los mAbs asociadas a efectos físico-químicos que pudieran condicionar sus formas de uso, sirve también para validar el propio método cromatográfico para ser empleado en estudios de estabilidad, ya que ha quedado demostrada su capacidad de detectar degradaciones y/o modificaciones de los mAbs.

Por otra parte, un aspecto fundamental en la cromatografía líquida de exclusión por tamaños, es la calibración de la columna empleada, es decir, la obtención de la relación existente entre el tamaño molecular de los compuesto analizados y el tiempo de retención; esta relación es la que va a permitir evaluar la degradación tanto por formación de agregados o por formación de fragmentos de menor tamaño de los anticuerpos monoclonales. Dado que el estudio que se presenta en este Capítulo se realizó a continuación del estudio de degradación acelerada y empleando la misma columna de exclusión por tamaños, el modelo de calibración establecido en el Capítulo anterior fue válido en el presente estudio de estabilidad en el tiempo de los medicamentos.

3. RESULTADOS Y DISCUSSION

Una vez que se demostró la capacidad del método (SE)HPLC-DAD para detectar la agregación y/o alteración de las cadenas proteicas de los mAbs, se obtuvieron los correspondientes perfiles cromatográficos de las muestras estudiadas para evaluar la estabilidad a lo largo del tiempo de los cinco mAbs en los medicamentos y en dos diluciones de los mismos, en el caso de IFX y RTX. Para ello, se almacenaron 15 viales de vidrio topacio para cada situación estudiada, con un volumen de 1,5 mL de disolución de biofármaco a 4 °C. De la misma forma fue preparado otro grupo de viales que fueron almacenados a la temperatura de -20 °C; estas muestras fueron congeladas y descongeladas, constituyendo de esta forma dos ciclos de congelación / descongelación, en días diferentes y que se comentarán a continuación.

3.1. ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DE IFX: MEDICAMENTO (REMICADE®) Y DILUCIONES DE USO CLÍNICO

Para el mAb IFX, se estudiaron disoluciones a tres concentraciones diferentes en condiciones de refrigeración: el medicamento Remicade® - IFX reconstituido a 10 mg/mL con agua- y dos diluciones en NaCl 0,9% -0,5 y 2 mg/mL. El medicamento también se usó para evaluar la estabilidad almacenado congelado (a -20 °C) (Figuras 1 A, B, C, D).

Una comparación visual entre los perfiles SEC de IFX del control -registrado en el día “0” inmediatamente después de la preparación de las muestras y antes de la fecha de caducidad- y los perfiles obtenidos en

Capítulo IV

días de análisis posteriores mostraron una gran estabilidad en todas las muestras almacenadas refrigeradas a 4 °C. No se detectaron agregados en ninguno de ellos, ni hubo deformación antes del pico cromatográfico del monómero IFX que podría sugerir el inicio del proceso de agregación. El área bajo el pico cromatográfico también se mantuvo estable durante todo el estudio y el análisis de la pureza espectral confirmó altos niveles en el pico correspondiente al monómero IFX en todos los perfiles SEC. El tiempo de retención y el peso molecular estimado (entre paréntesis) para estas muestras de IFX el día “0” y el último día comprobado (día 15) fueron: $6,75 \pm 0,02$ min (157,33 kDa) y $6,85 \pm 0,04$ min (146,28 kDa) para la dilución a 0,5 mg/mL en NaCl al 0,9%, $6,73 \pm 0,01$ min (159,66 kDa) y $6,85 \pm 0,04$ min (146,28 kDa) para la dilución a 2 mg/mL en NaCl al 0,9% y $6,74 \pm 0,02$ min (148,49 kDa) y $6,89 \pm 0,02$ min (142,13 kDa) para el medicamento Remicade® (solución reconstituida en agua IFX 10 mg/mL). Estos resultados demostraron la alta estabilidad de IFX en las tres disoluciones estudiadas, sin detectar proceso de agregación.

Capítulo IV

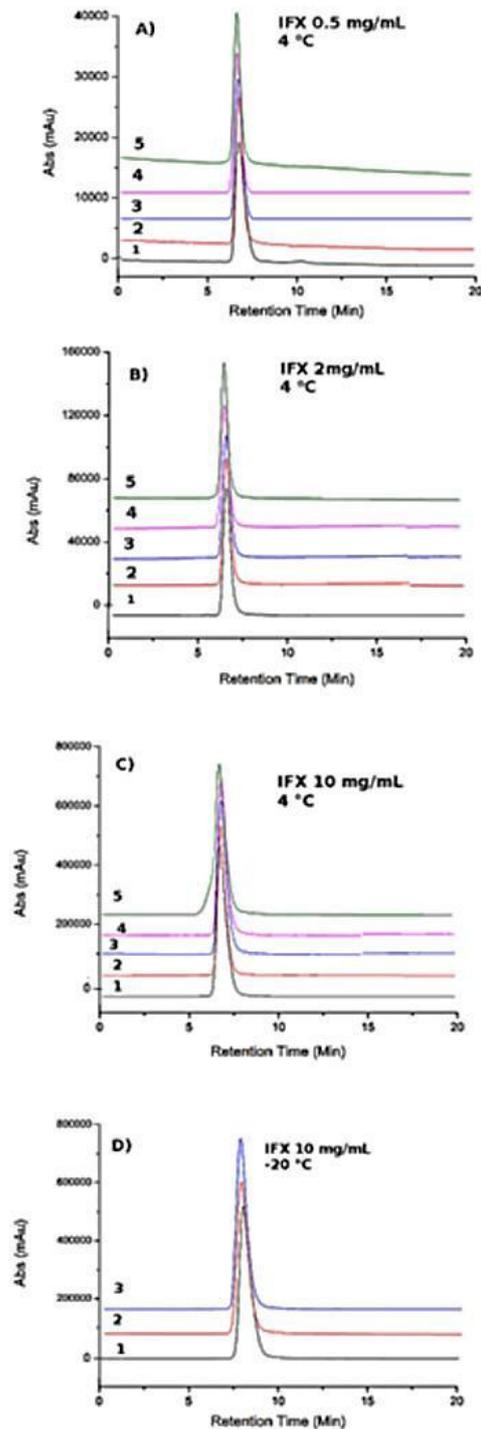


Figura 1. Estudio de estabilidad IFX (Remicade®). Perfiles SEC de: (A) IFX 0,5 mg/mL almacenado a 4°C, (B) IFX 2 mg/mL almacenado a 4°C, (C) IFX 10 mg/mL almacenado a 4°C; (1) día “0”, (2) día 1, (3) día 2, (4) día 7, (5) día 15. (D) IFX 10 mg/mL almacenado a -20°C; (1) día “0”, (2) primer ciclo congelación/descongelación, (3) segundo ciclo congelación/descongelación.

Capítulo IV

En cuanto al estudio de las muestras congeladas (Figura 1D), no se detectaron señales de agregación, aunque el pico principal de los monómeros se desplazó a tiempos de retención superiores, es decir, desde $6,21 \pm 0,08$ min (día “0”) hasta $6,92 \pm 0,07$ (día 15). Este cambio en el tiempo de retención podría indicar que el proceso de congelación / descongelación de las muestras podría afectar a la estructura de IFX en algún tipo de inestabilidad no relacionada con la agregación.

En un artículo reciente se mostró la estabilidad de disoluciones de un biosimilar de IFX, a saber, el CT-P13 en el medicamento Inflectra® [1]. Este trabajo concluyó que, de forma similar a los resultados presentados aquí, el biosimilar de IFX no forma agregados cuando se almacena refrigerado a 5 °C en concentraciones de 0,4; 0,2 y 10 mg/mL, aunque se produce algún tipo de daño en los ciclos de congelación / descongelación que impide su uso clínico. El aumento de los diámetros hidrodinámicos se propone como consecuencia del deterioro, en contraste con los resultados encontrados en esta Tesis, que sugieren una disminución en el tamaño. Sin embargo, en ambos estudios parece estar claro que se produce algún daño y/o modificación en la estructura de estos mAb, el producto de referencia (Remicade®) y su biosimilar (Inflectra™). También se debe tener en cuenta que a pesar de que ambos mAbs comparten las cadenas de proteínas, el perfil de glicanos es diferente, lo que podría traducirse en comportamientos diferentes bajo determinados factores.

3.2. ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DE RTX: MEDICAMENTO (MABTHERA®) Y DILUCIONES DE USO CLÍNICO

Al igual que en el estudio de las muestras de IFX, para RTX, se estudiaron disoluciones a tres concentraciones en condiciones de refrigeración a 4 °C y protegidas de la luz (el medicamento Mabthera® - 10 mg/mL- y dos diluciones en NaCl 0,9% de 1 y 4 mg/mL). El medicamento, una vez abierto, también se estudió en almacenamiento congelado a 20 °C.

Los resultados indicaron una gran estabilidad para las muestras almacenadas refrigeradas y en aquellas a las que fueron sometidas a ciclos de congelación / descongelación, como se puede ver en la Figura 2. El pico principal en los cromatogramas permaneció constante en forma y área a lo largo del estudio con un alto nivel de pureza espectral. Todos los perfiles cromatográficos fueron comparables con el registrado en el día de control (día "0"), sin nuevos picos o deformaciones que indiquen agregaciones y/o rupturas de las cadenas proteicas. El tiempo de retención y el peso molecular estimado (entre paréntesis) para la muestra de control RTX el día "0" y el último día comprobado (día 15) fueron: $6,85 \pm 0,04$ min (146,28 kDa) y $7,01 \pm 0,10$ min (130,48 kDa) para el dilución a 1 mg/mL en NaCl al 0,9%, $6,85 \pm 0,04$ min (146,28 kDa) y $7,02 \pm 0,11$ min (129,57 kDa) para la dilución a 4 mg/mL en NaCl al 0,9% y $6,89 \pm 0,02$ min (142,13 kDa), $7,07 \pm 0,06$ min (125,10 kDa) para el medicamento Mabthera® -RTX 10mg/mL - almacenado refrigerado -, y $6,83 \pm 0,03$ min (148,42 kDa) y $6,94 \pm 0,05$ min (137,13 kDa) para el medicamento Mabthera® -RTX 10 mg/mL - almacenado congelado -. Esto indicó que no se produjeron cambios debido a la agregación en

Capítulo IV

ninguna de las muestras de RTX estudiadas. Este es un hallazgo interesante, dado que RTX ya ha demostrado una importante inmunogenicidad clínica en pacientes con artritis reumatoide [2] y la presencia de cantidades mínimas de agregados podría aumentar esta peligrosa respuesta en los pacientes.

Capítulo IV

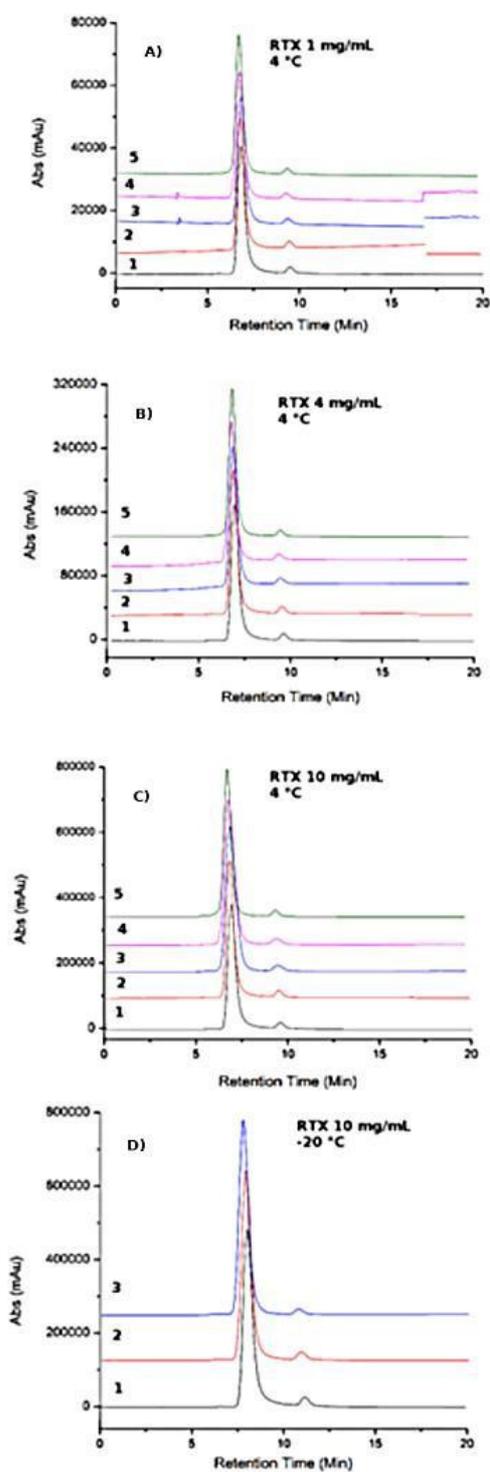


Figura 2. Estudio de estabilidad RTX (Mabthera®). Perfiles SEC de: (A) RTX 1 mg/mL almacenado a 4 °C, (B) RTX 4 mg/mL almacenado a 4°C, (C) RTX 10 mg/mL almacenado a 4°C; (1) día “0”, (2) día 1, (3) día 2, (4) día 7, (5) día 15. (D) RTX 10 mg/mL almacenado a -20°C; (1) día “0”, (2) primer ciclo congelación/descongelación, (3) segundo ciclo congelación/descongelación.

3.3. ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DE BVZ: MEDICAMENTO (AVASTIN®)

Se evaluó la estabilidad en el tiempo del medicamento Avastin® (BVZ 25 mg/mL) durante 15 días tras la apertura de los correspondientes viales. Las muestras se almacenaron refrigeradas (4 °C) y congeladas (-20 °C). Los resultados se muestran en la Figuras 3 A y B respectivamente. En los cromatogramas de control (registrados en el día “0”) el pico principal de BVZ (monómeros) se caracterizó a $5,99 \pm 0,05$ min y los agregados naturales a $4,99 \pm 0,05$ min. Estos valores fueron ligeramente inferiores a los obtenidos para la caracterización del perfil de control de BVZ en el Capítulo anterior. No obstante, dado que los cromatogramas registrados en el día “0” (utilizados como referencia) en el presente estudio se obtuvieron dentro de la fecha de caducidad del medicamento, se achacaron estos valores a factores experimentales no identificados relacionados con el sistema del cromatógrafo; estos valores de los tiempos de retención menores fueron aceptados ya que se mantuvieron sin cambios los días de control, sin modificaciones en los perfiles cromatográficos, es decir, la tendencia fue similar a lo largo del tiempo en todas las muestras de medicamento, con tiempos de retención más cortos (tanto para picos de monómero como agregados) en línea con los resultados para el día “0”.

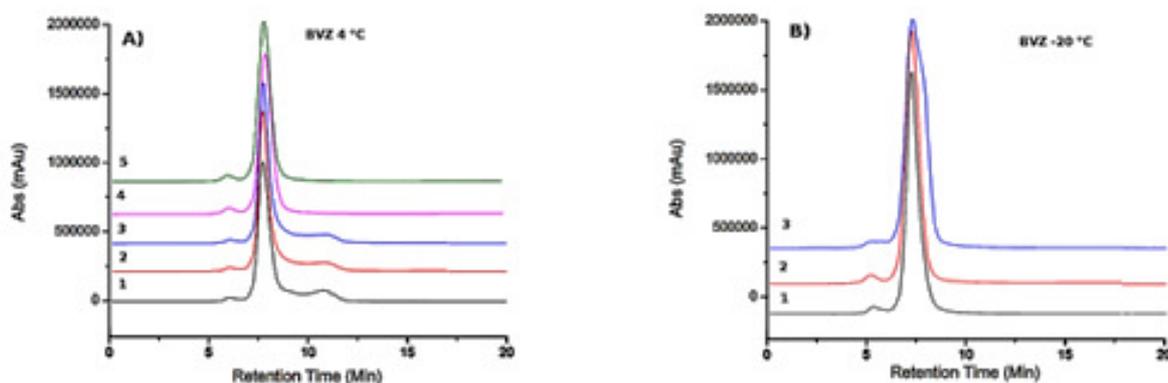


Figura 3. Estudio de estabilidad BVZ (Avastin®). Perfiles SEC de: (A) BVZ 25 mg/mL almacenado a 4 °C; (1) día “0”, (2) día 1, (3) día 2, (4) día 7, (5) día 15. (B) BVZ 25 mg/mL almacenado a -20 °C; (1) día “0”, (2) primer ciclo congelación/descongelación, (3) segundo ciclo congelación/descongelación.

El análisis de los cromatogramas reveló ligeros cambios en el porcentaje de los agregados para las dos condiciones de almacenamiento evaluadas. El porcentaje de agregación para el día de control (día “0”) fue del 1,22%. Para el día 15 esto había aumentado a 2,93% en la muestra almacenada refrigerada y al 2,79% en la muestra almacenada congelada. Esto mostró una ligera tendencia de BVZ en el medicamento Avastin® a formar agregados a lo largo del tiempo una vez que se había abierto el vial del medicamento o tras ser sometido a proceso de congelación / descongelación.

3.4. ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DE CTX: MEDICAMENTO (ERBITUX®)

En el caso del mAb CTX, se empleó el medicamento Erbitux® (CTX 5 mg/mL) para estudiar la estabilidad una vez abiertos los viales y dentro del tiempo indicado para su uso por el fabricante. Igualmente, las muestras se almacenaron refrigeradas (a 4 °C) y congeladas (a -20 °C) y

Capítulo IV

en ambos casos protegidas de la luz. Los resultados se muestran en la Figuras 4 A y B respectivamente. El pico principal en los cromatogramas de control (registrado en el día “0”) se caracterizó a $6,65 \pm 0,03$ min (monómeros de CTX). Estos cromatogramas fueron idénticos al perfil SEC para CTX discutido en el Capítulo anterior.

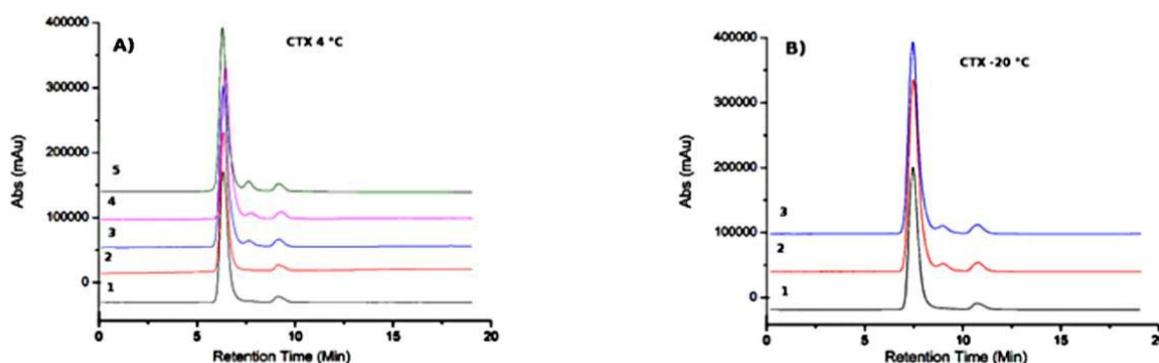


Figura 4. Estudio de estabilidad CTX (Erbix®). Perfiles SEC de: (A) CTX 5 mg/mL almacenado a 4 °C; (1) día “0”, (2) día 1, (3) día 2, (4) día 7, (5) día 15. (B) CTX 5 mg/mL almacenado a -20 °C; (1) día “0”, (2) primer ciclo congelación/descongelación, (3) segundo ciclo congelación/descongelación.

En este estudio de estabilidad, se observaron cambios mediante inspección visual de los cromatogramas registrados correspondientes al perfil de agregación (Figura 4) para ambas condiciones de almacenamiento: se detectó claramente un nuevo pico cromatográfico desde el día 2 en las muestras refrigeradas (4 °C) y desde el día 7 para la muestra congelada (-20 °C); hay que indicar que en este último caso el primer día de análisis fue el día 7, por lo que no se pudo atribuir con estos resultados mayor estabilidad a las muestras congeladas. En ambas condiciones de almacenamiento, el pico se detectó a tiempos de retención mayores que para los monómeros de CTX; por lo tanto, estos picos no se pueden atribuir a proceso de agregación y, en cambio, parecen mostrar degradación como resultado de algún tipo de ruptura de la cadena,

Capítulo IV

originando entidades ligeramente de menor masa molecular. Concretamente, en las muestras refrigeradas a 4 °C, este nuevo pico se detectó desde el día 2, cerca del pico correspondiente a la señal de los monómeros, y su área continuó aumentando progresivamente hasta el día 15 con un tiempo de retención de $7,23 \pm 0,06$ min. Se detectó un proceso similar en las muestras almacenadas congeladas a -20 °C, donde el pico se detectó con un tiempo de retención de $7,36 \pm 0,04$ min.

En cuanto al pico cromatográfico principal, correspondiente a los monómeros CTX, este se detectó a un tiempo de retención de $6,65 \pm 0,03$ min en el día "0", y aumentó gradualmente a $6,73 \pm 0,02$ min en el último día probado (día 15) en las muestras refrigeradas a 4 °C y hasta a $6,86 \pm 0,01$ min en las muestras congeladas. Dada la pequeña modificación el tiempo de retención, se asume como poco probable que estos estén asociados con la agregación en CTX y probablemente se debieron a ligeros cambios en la composición de la fase móvil. Luego, el peso molecular estimado para los monómeros CTX y el nuevo compuesto asociado a algún tipo de proceso de degradación al final del estudio de estabilidad fue de 159,66 kDa y 111,98 kDa respectivamente para las muestras almacenadas a 4 °C, y de 145,23 kDa y 102,53 kDa para las muestras congeladas. El porcentaje de degradación se estimó a partir de las áreas cromatográficas relativas y los resultados indicaron 1,56% en muestras almacenadas a -20 °C y 5,59% en muestras almacenadas a 4 °C. Como se observa de los resultados, el proceso de congelación / descongelación afecta ligeramente a los monómeros de CTX.

Capítulo IV

Finalmente indicar que se detectó un pico cromatográfico en todos los perfiles de agregación a un tiempo de retención de $9,01 \pm 0,02$ min (37,8 kDa), incluidos los de las muestras de control (día “0”). Por lo tanto, asumimos que esto fue producido por el excipiente utilizado en el medicamento Erbitux® y no estaba relacionado con la degradación de CTX.

3.5. ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DE TTZ: MEDICAMENTO (HERCEPTIN®)

El estudio de estabilidad del mAb TTZ se realizó en su formulación como medicamento Herceptin®. Los estudios se realizaron una vez que se abrieron los viales y las muestras se almacenaron refrigeradas (a 4 °C) y congeladas (a -20 °C) protegidas de la luz. Los resultados se muestran en la Figuras 5 A y B respectivamente. Una inspección visual de la Figura 5 indica una gran estabilidad en el perfil de agregación cromatográfica de TTZ y, por extensión, en el medicamento Herceptin®. El pico principal de TTZ (monómeros) se caracterizó en un tiempo de retención de $6,87 \pm 0,05$ min, que se consideró como patrón y se mantuvo estable durante el período de prueba. No se detectaron picos cromatográficos correspondientes a agregados ni picos degradados debido a la descomposición de la estructura TTZ.

Capítulo IV

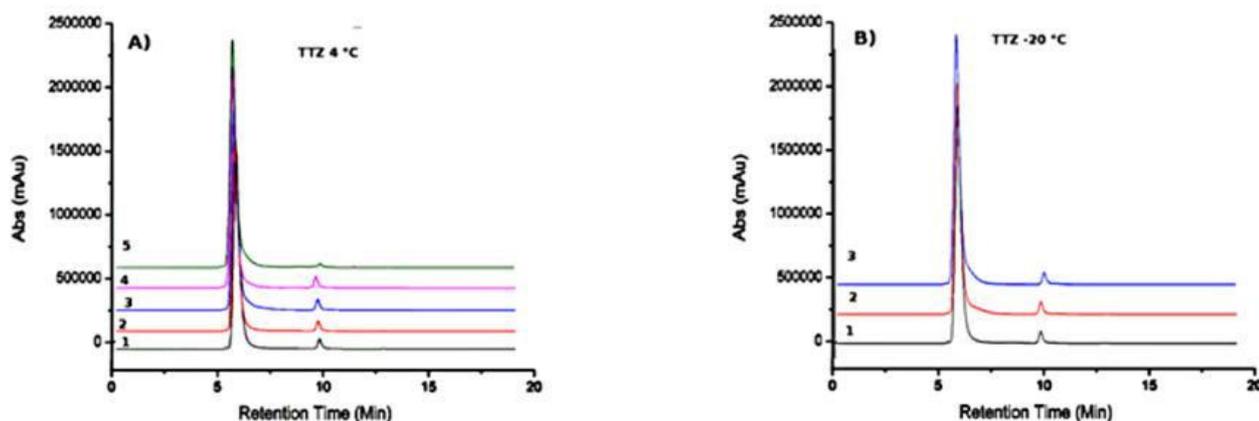


Figura 5. Estudio de estabilidad TTZ (Herceptin®). Perfiles SEC de: (A) TTZ 21 mg/mL almacenado a 4 °C; (1) día “0”, (2) día 1, (3) día 2, (4) día 7, (5) día 15. (B) TTZ 21 mg/mL almacenado a -20 °C; (1) día “0”, (2) primer ciclo congelación/descongelación, (3) segundo ciclo congelación/descongelación.

El pico para los monómeros TTZ en el último día de pruebas (día 15) para la muestra almacenada refrigerada se detectó a un tiempo de retención de $6,90 \pm 0,05$ min. El peso molecular se estimó en 141,11 kDa, el mismo que para los monómeros TTZ en las muestras de control y exactamente igual que los monómeros teóricos de IgG1. Se obtuvieron los mismos resultados para las muestras congeladas, en la que se detectaron los picos de los monómeros del TTZ el día 15 a un tiempo de retención de $6,88 \pm 0,02$ min, lo que indica un peso molecular estimado de 143 kDa.

Sin embargo, y a pesar de que la gran similitud entre todos los perfiles de agregación cromatográficos de las muestras analizadas de TTZ durante el período de estudio para ambas condiciones de almacenamiento que indicaba gran estabilidad, el pico de los monómeros de TTZ en los perfiles de agregación mostró una ligera cola en el último día de análisis (día 15). Esto podría indicar el comienzo de algún tipo de

Capítulo IV

degradación del mAb. Esto debe tenerse en cuenta al analizar la posible reutilización porque, aunque el TTZ presenta una tasa baja de inmunogenicidad clínica informada [3], se ha demostrado que cantidades mínimas de agregados inapreciables (alrededor del 3%) se asocian con un aumento significativo del potencial riesgo de inmunogenicidad clínica [4].

4. CONCLUSIONES

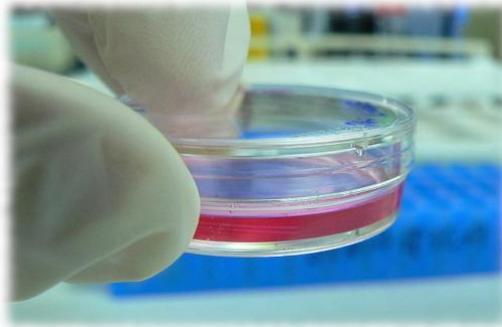
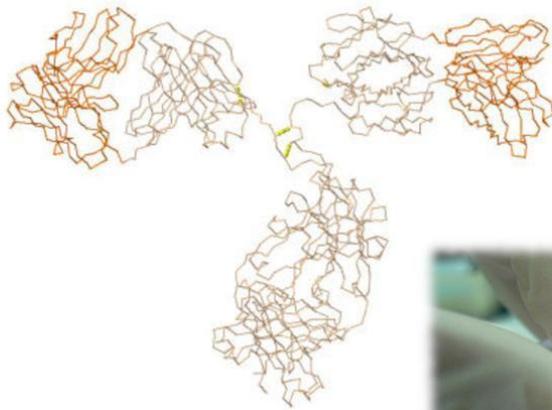
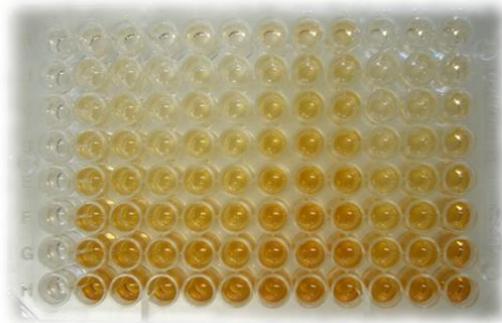
Los resultados del estudio de estabilidad durante 15 días de los medicamentos biotecnológicos una vez abiertos y sus diluciones en condiciones de uso hospitalario indicaron que BVZ (Avastin® 25 mg/mL), RTX (Mabthera® 10 mg/mL y las diluciones a 1 y 4 mg/mL) y TTZ (Herceptin® 21 mg/mL) mostraron gran estabilidad cuando se almacenaron a 4° C protegidos de la luz, sin signos de agregación en los perfiles SEC. También fueron robustos cuando las muestras almacenadas a -20 °C se sometieron a tres ciclos de congelación-descongelación a lo largo del tiempo. IFX también fue estable cuando se almacenó a 4 °C y cuando se sometió a tres ciclos de congelación-descongelación tanto en forma de medicamento como en disoluciones diluidas a 2 mg/mL. Sin embargo, las disoluciones más diluidas a 0,5 mg/mL mostraron una tendencia a agregarse en el último día de prueba (día 15). CTX (Erbix®) fue claramente el más inestable, con un nuevo pico detectado en el perfil SEC desde el segundo día de prueba y desde el primer ciclo de congelación-descongelación; este pico no es el resultado de la agregación, sino de la ruptura de las cadenas de proteínas. Estos resultados aquí expuestos contribuyen a evaluar la posible reutilización del de los excedentes de estos medicamentos en los hospitales, ya que los

Capítulo IV

agregados deben ser uno de los primeros problemas que deben controlarse debido a los episodios peligrosos que pueden ser causados por la inmunogenicidad inducida.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] N. Tokhadze, P. Chennell, Y. Le Basle, V. Sautou, Stability of infliximab solutions in different temperature and dilution conditions, *J Pharm Biomed Anal* 150 (2018) 386-395.
- [2] R.F. van Vollenhoven, P. Emery, C.O. Bingham, E.C. Keystone, R. Fleischmann, D.E. Furst, K. Macey, M. Sweetser, A. Kelman, R. Rao, Longterm Safety of Patients Receiving Rituximab in Rheumatoid Arthritis Clinical Trials, *J Rheumatol* 37(3) (2010) 558-567.
- [3] A. Martínez-Ortega, A. Herrera, A. Salmerón-García, J. Cabeza, L. Cuadros-Rodríguez, N. Navas, Study and ICH validation of a reverse-phase liquid chromatographic method for the quantification of the intact monoclonal antibody cetuximab, *J Pharm Anal* 6(2) (2016) 117-124.
- [4] M. Ahmadi, C.J. Bryson, E.A. Cloake, K. Welch, V. Filipe, S. Romeijn, A. Hawe, W. Jiskoot, M.P. Baker, M.H. Fogg, Small amounts of sub-visible aggregates enhance the immunogenic potential of monoclonal antibody therapeutics, *Pharm Res* 32(4) (2015) 1383-1394.



Capítulo V

Estudio de estabilidad funcional en el tiempo de cetuximab (Erbitux®)

Capítulo V

Contenido

1. RESUMEN.....	299
2. ESTUDIO CONFORMACIONAL DE CTX MEDIANTE ESPECTROSCOPÍA DE DICROISMO CIRCULAR LEJANO	300
2.1. CARACTERÍSTICAS CONFORMACIONALES	300
2.2. ESTABILIDAD TÉRMICA	302
3. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA.....	310
3.1. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA EN EL TIEMPO MEDIANTE CULTIVOS CELULARES	311
3.2. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA EN EL TIEMPO MEDIANTE ELISA	315
4. CONCLUSIONES.....	318
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	321

Capítulo V

1. RESUMEN

En el presente Capítulo se expone un estudio de la funcionalidad del mAb CTX en el medicamento comercial Erbitux® evaluada mediante el uso de cultivos de líneas celulares tumorales y mediante inmunoensayo tipo ELISA. Previamente, se presenta un estudio conformacional del mismo mediante dicroísmo circular para evaluar su degradación por aumento de la temperatura; esta degradación será empleada en los estudios de funcionalidad.

CTX es un anticuerpo terapéutico que se une al receptor del factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor Receptor o EGFR), un receptor de membrana con actividad de fosforilación y que juega un papel crucial en los procesos de proliferación celular. Este receptor se sobreexpresa en una gran variedad de tumores humanos (entre ellos el cáncer de colon) y, por tanto, su bloqueo mediante el uso de mAbs como CTX puede reducir la proliferación de las células tumorales y tener un efecto beneficiosos en términos de pronóstico de la enfermedad. El propósito de la presente investigación fue examinar la estabilidad funcional de CTX, almacenado a 4 °C y protegido de la luz, a lo largo del tiempo y comprobar la posible modulación de su actividad mediante el empleo de la línea SKBR3 y metodología ELISA.

2. ESTUDIO CONFORMACIONAL DE CTX MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE DICROISMO CIRCULAR LEJANO

El estudio conformacional de CTX (Erbitux®) se realizó con un doble objetivo: i) en primer lugar, realizar un estudio de su estructura secundaria de este mAb en condiciones óptimas de actividad, esto es, recién abierto el vial de medicamento, y a continuación determinar su robustez frente a un aumento de temperatura; ii) en segundo lugar, seleccionar la temperatura que garantice la degradación del medicamento -una vez conocido el comportamiento de su degradación por efecto de un aumento de la misma-, de manera que este sea degradado y así empleado como control para comparar la funcionalidad de las muestras de medicamento fresco y activo en la puesta a punto del método de funcionalidad basado en crecimiento de líneas celulares.

2.1. CARACTERÍSTICAS CONFORMACIONALES

Para la obtención del espectro de DC característico de CTX se empleó el medicamento Erbitux® (CTX 5 mg/mL), el cual se diluyó con NaCl 0,9% hasta una concentración de 0,5 mg/mL, concentración óptima de trabajo. La Figura 1 muestra el espectro de DC característico de CTX, espectro que servirá de control en las siguientes experiencia de degradación acelerada por la incremento de la temperatura. En este espectro se consideran parámetros característicos la λ que presenta elipticidad cero (209 nm), la λ de elipticidad mínima (217 nm), y el punto de inflexión (alrededor de 225 nm). Los valores de estas λ en el espectro DC de CTX son indicativos de una estructura mayoritariamente

Capítulo V

en lámina β tal y como indica la bibliografía [1]. El máximo a 190 nm no se consideró característico pues corresponde a una zona con elevado ruido espectral. Los cambios en cualquiera de estas zonas espectrales serán indicadores de cambios en la conformación de CTX, en su estructura secundaria principalmente.

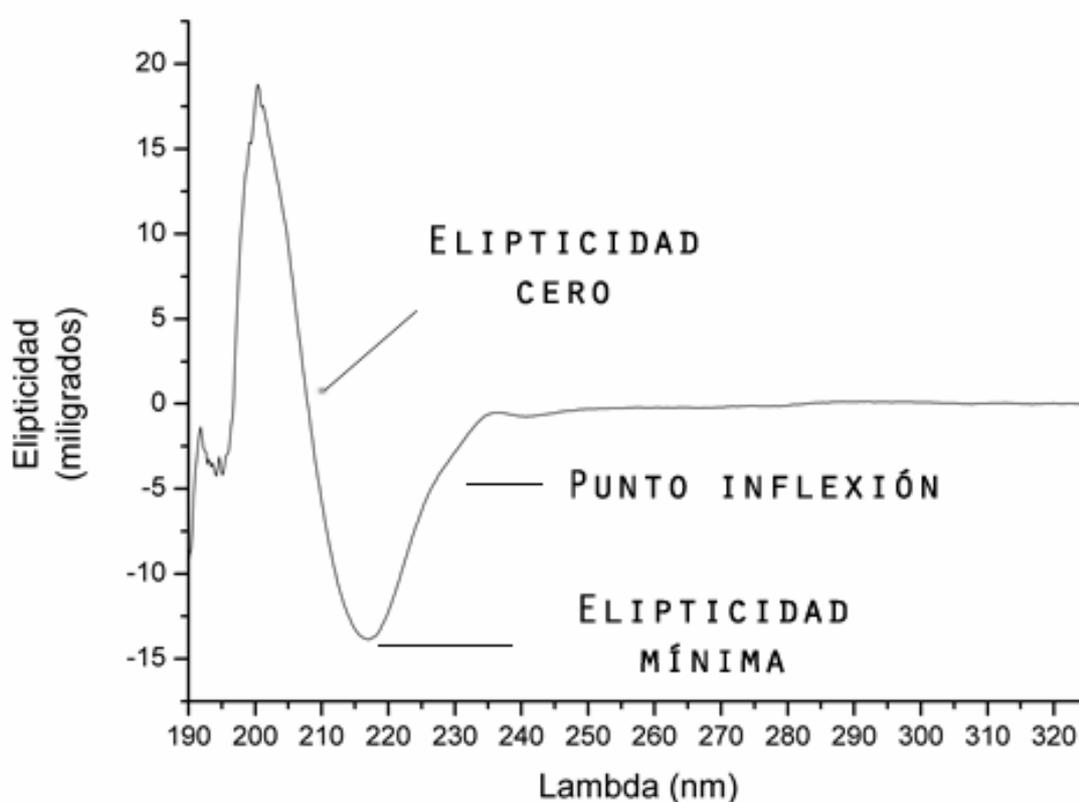


Figura 1. Espectro DC característico de CTX, obtenido a partir de una muestra de medicamento Erbitux® dentro de su fecha indicada de uso.

Además, se realizó un análisis de la estructura secundaria por estimación mediante el empleo de algoritmos empíricos y bases de datos de espectros DC de proteínas de referencia con estructura secundaria conocida [2]. De los diferentes algoritmos que pueden ser empleados, se

seleccionó el algoritmo de deconvolución denominado K2D [3, 4] por ser el que proporciona una mejor estimación del contenido helicoidal y laminar de proteínas y polipéptidos; este algoritmo opera mediante redes neuronales de Kohonen. De entre las diferentes bases de datos de espectros DC de referencia se empleó la SMP180 la cual incluye el espectro de 98 proteínas solubles, más 30 proteínas de membrana, siendo una de las bases de datos más potentes para la predicción de estructuras secundarias [2]. El resultado obtenido mediante este análisis estimó un porcentaje del 56,16% de estructura en lámina β y 39,5% de estructura aleatoria. Este es un resultado compatible con la estructura de las IgG1.

2.2. ESTABILIDAD TÉRMICA

Tras la caracterización por DC, se procedió a analizar los cambios conformacionales en CTX en un amplio intervalo de temperaturas, que comprendió desde los 20 a los 90 °C, con incrementos de 10 °C para determinar los cambios en el espectro en función de la temperatura (Figura 2). Así, se pudo observar que la visualización de coágulos blanquecinos, signo evidente del proceso de agregación, apareció en torno a los 70 °C, siendo a partir de esta temperatura cuando son notables los cambios en el espectro.

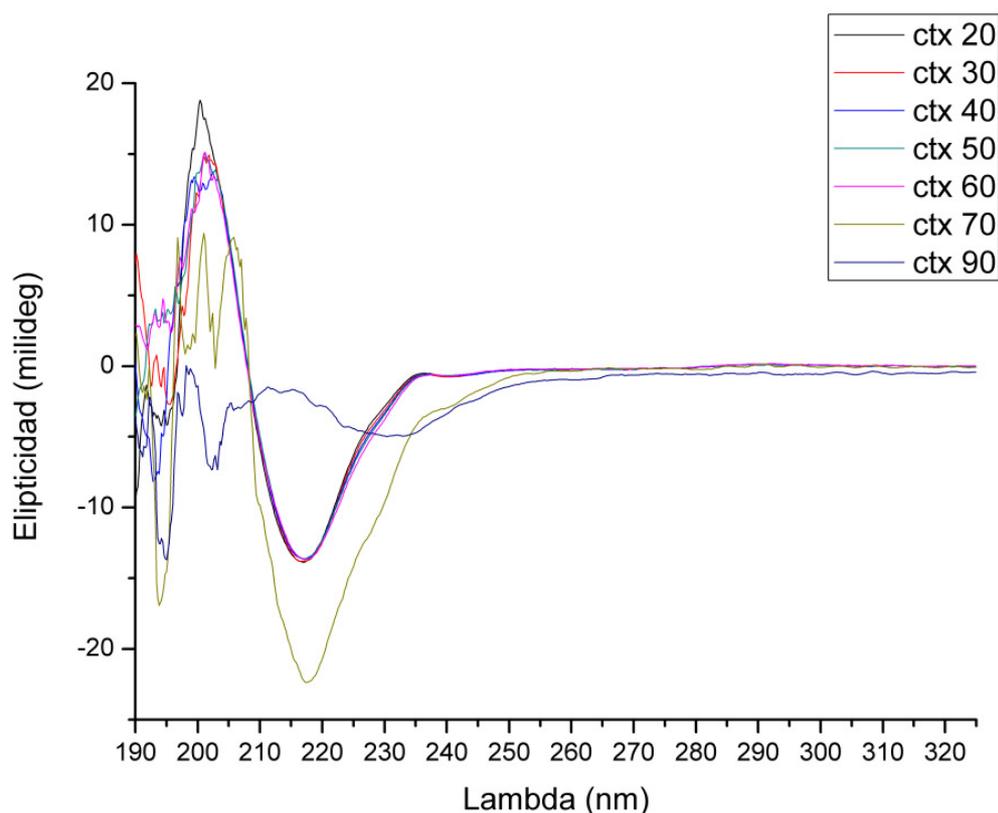


Figura 2. CTX: estudio mediante DC de la estabilidad térmica mediante rampa de temperatura de 20 °C a 90 °C.

Posteriormente, se realizó un estudio más detallado con incrementos de temperatura de 5 °C y un intervalo de temperaturas menor, entre los 20 y 70 °C, temperatura a la que aparecieron los primeros signos de agregación visual en la experiencia anterior. Este estudio se realizó para seleccionar la temperatura a la que el CTX presenta degradación no detectable visualmente por la formación de agregados de orden superior. Al ser los incrementos de temperatura de 5 °C, se pudo comprobar que la temperatura a la que aparecen las formas agregadas -no detectadas visualmente- es de 65 °C. La Figura 3 muestra los espectros de DC ultravioleta de CTX para las diferentes temperaturas a las que se sometió la muestra. En ella se puede comprobar que los

Capítulo V

espectros son superponibles hasta los 30 °C, temperatura a partir del cual se detectaron pequeñas variaciones. La Figura 3B y 3C muestra las variaciones de intensidad en el mínimo y en la zona del punto de inflexión, donde se puede apreciar más detalladamente estas pequeñas variaciones. Esta forma en los cambios, con un mantenimiento bastante importante de la estructura secundaria hasta elevadas temperaturas, sugieren que se trate de una estructura del tipo cooperativo, en la cual toda la estructura proteica “colabora” al mantenimiento de la misma y a partir de un determinado valor, la estructura “colapsa” en todos los puntos. En la región de 225 nm (la del punto de inflexión, Figura 3C) los cambios son apreciables desde los 25 °C, apoyando la teoría de que las estructuras en lámina β son menos robustos ante situaciones de estrés [5]. Sin embargo, la zona correspondiente al mínimo se ve menos afectada por el aumento de temperatura (Figura 3B) produciéndose un acentuado descenso del mismo sólo a la temperatura superior ensayada, la de 70 °C, y que corresponde con el comienzo de la detección visual de la agregación visible. Este comportamiento es común a otros mAbs similares estudiados por nuestro grupo de investigación, y al cual aún no le hemos dado explicación. Por otra parte, el análisis de los datos mediante el programa online “*dichroweb*” [6] (Tabla 1), permitió comprobar una tendencia a la pérdida parcial de estructura en lámina β a favor de una distribución aleatoria y un incremento ligero en el porcentaje de estructuras en α -hélice a partir de los 60 °C [7, 8], lo cual - esto último- no es en principio justificable y podría estar relacionado con el incremento en la intensidad (en valor absoluto) que se produce a altas temperaturas (70 °C) en el mínimo espectral. De cualquier manera, los cambios pequeños tanto en el mínimo como en el punto de inflexión en torno a 225 nm, son indicativos de cambios a nivel de la estructura

Capítulo V

secundaria por efecto del aumento de la temperatura [1]. Por lo tanto, la pérdida de la estructura secundaria nativa interviene en los procesos de agregación [9] promovidos por el aumento de la temperatura.

Tabla 1. Cambios conformacionales obtenidos mediante el programa online "dichroweb".

TTZ T (°C)	Estructura Alfa- hélice	Estructura Lámina- beta	Estructura Desordenada
ctx 20 1	0,040	0,567	0,392
ctx 20 2	0,043	0,560	0,397
ctx 20 3	0,047	0,558	0,396
media	0,043	0,562	0,395
desv	0,004	0,005	0,003
%DER ⁽¹⁾	8,104	0,841	0,670
ctx 25 1	0,045	0,559	0,396
ctx 25 2	0,043	0,563	0,394
ctx 25 3	0,044	0,563	0,393
media	0,044	0,562	0,394
desv	0,001	0,002	0,002
%DER	2,273	0,411	0,387
ctx 30 1	0,042	0,563	0,395
ctx 30 2	0,046	0,561	0,394
ctx 30 3	0,045	0,560	0,395
media	0,044	0,561	0,395
desv	0,002	0,002	0,001
%DER	4,695	0,272	0,146
ctx 35 1	0,045	0,558	0,397
ctx 35 2	0,045	0,555	0,400
ctx 35 3	0,045	0,558	0,397
media	0,045	0,557	0,398
desv	0,000	0,002	0,002
%DER	0,000	0,311	0,435

Capítulo V

(Continuación Tabla 1)

TTZ T (°C)	Estructura Alfa- hélice	Estructura Lámina- beta	Estructura Desordenada
ctx 40 1	0,043	0,559	0,398
ctx 40 2	0,044	0,556	0,399
ctx 40 3	0,044	0,559	0,397
media	0,044	0,558	0,398
desv	0,001	0,002	0,001
%DER	1,322	0,310	0,251
ctx 45 1	0,045	0,557	0,399
ctx 45 2	0,046	0,552	0,402
ctx 45 3	0,046	0,552	0,401
media	0,046	0,554	0,401
desv	0,001	0,003	0,002
%DER	1,264	0,521	0,381
ctx 50 1	0,045	0,556	0,399
ctx 50 2	0,046	0,557	0,397
ctx 50 3	0,045	0,558	0,397
media	0,045	0,557	0,398
desv	0,001	0,001	0,001
%DER	1,274	0,180	0,290
ctx 55 1	0,044	0,559	0,397
ctx 55 2	0,044	0,563	0,393
ctx 55 3	0,045	0,562	0,393
media	0,044	0,561	0,394
desv	0,001	0,002	0,002
%DER	1,302	0,371	0,586
ctx 60 1	0,045	0,55	0,405
ctx 60 2	0,046	0,569	0,385
ctx 60 3	0,044	0,569	0,387
media	0,045	0,563	0,392
desv	0,001	0,011	0,011
%DER	2,222	1,950	2,808

Capítulo V

(Continuación Tabla 1)

TTZ T (°C)	Estructura Alfa- hélice	Estructura Lámina- beta	Estructura Desordenada
ctx 65 1	0,106	0,393	0,501
ctx 65 2	0,11	0,392	0,497
ctx 65 3	0,107	0,399	0,495
media	0,108	0,395	0,498
desv	0,002	0,004	0,003
%DER	1,933	0,959	0,614
ctx 70 1	0,117	0,376	0,507
ctx 70 2	0,115	0,381	0,505
ctx 70 3	0,115	0,383	0,503
media	0,116	0,380	0,505
desv	0,001	0,004	0,002
%DER	0,998	0,949	0,396

(1)DER: Desviación estándar relativa.

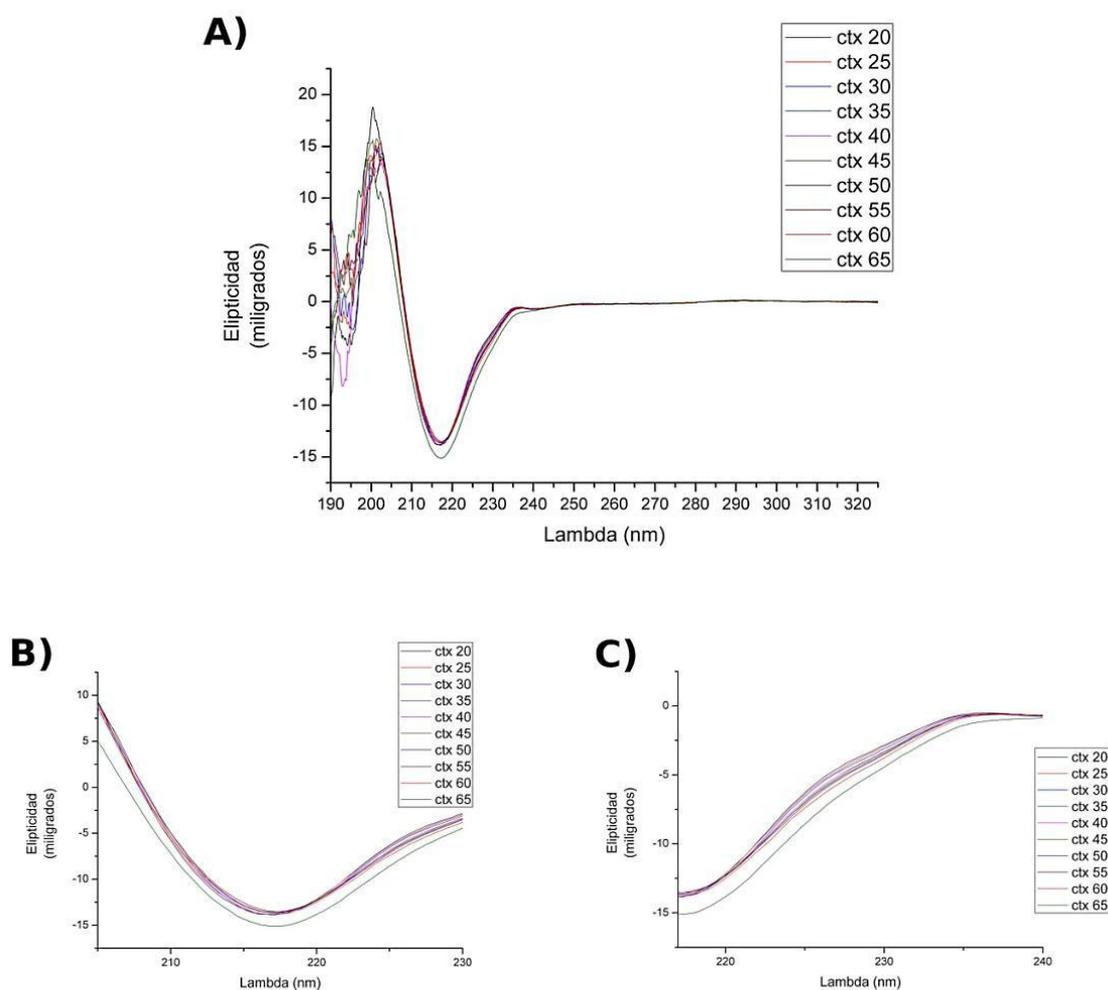


Figura 3. CTX: estudio mediante DC de la estabilidad térmica: A) mediante rampa de temperatura desde 20 °C a 70 °C; B) detalle de los cambios registrados a λ mínima de 217 nm; C) detalle de los cambios registrados alrededor del punto de inflexión 225 nm.

Por último se realizó un estudio para determinar si los cambios inducidos por la temperatura en la estructura secundaria detectados mediante los cambios en el espectro DC eran reversibles o irreversibles (Figura 4). Se seleccionó la temperatura de 60 °C para el estudio, es decir, una temperatura no excesivamente cercana a la que promueve la agregación visual, pero suficientemente alta para promover cambios

Capítulo V

conformacionales de la estructura secundaria. El estudio consistió en calentar la disolución de CTX a 60 °C durante tiempos concretos (5 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 5 horas y 24 horas), tras los cuales se registra el espectro DC, se deja en reposo durante un periodo de tiempo y se vuelve a registrar para comparar la reversibilidad o no del cambio. Los resultados demostraron que el cambio permaneció estable con el paso del tiempo, es decir, se mantiene mayoritariamente la estructura original en lámina β . De esta forma podemos corroborar que el cambio observado a esta temperatura es irreversible con respecto al tiempo. Por tanto, en los siguientes estudios de funcionalidad basados en la proliferación celular, cuando se emplearon muestras de CTX sometidas a esta temperatura de 60 °C, la actividad detectada pudo ser atribuida exclusivamente a la forma alterada y no a un revertimiento a la estructura nativa del CTX [9,10].

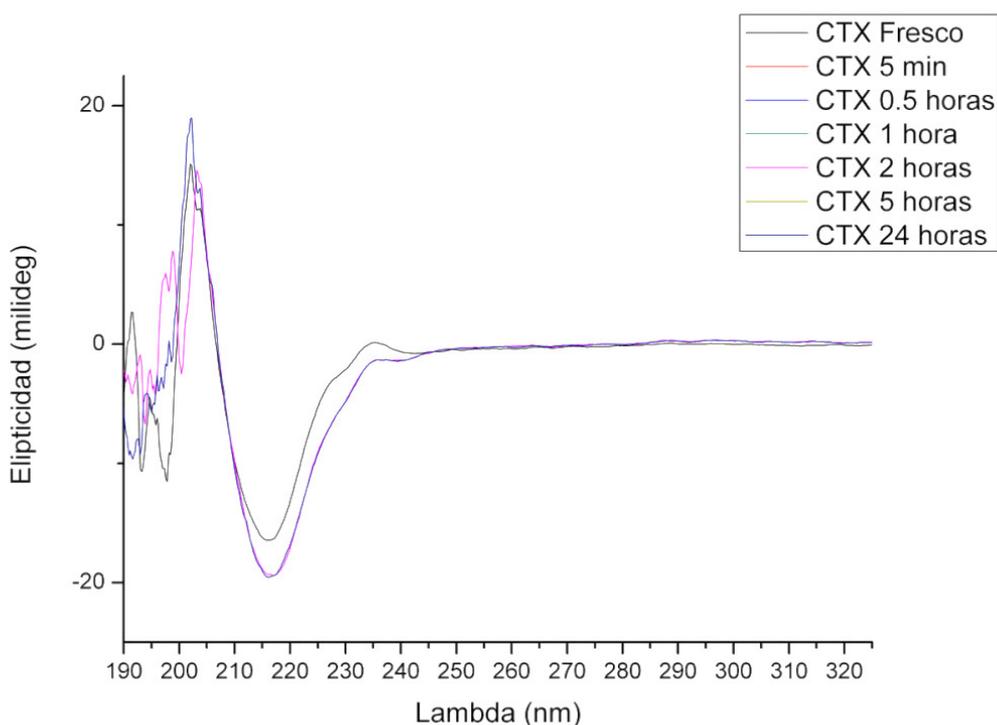


Figura 4. Estudio de la reversibilidad de los cambios en la estructura secundaria de CTX en disolución a la temperatura de 60 °C.

3. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA

La funcionalidad de CTX (Erbitux®) es un aspecto crucial a la hora de evaluar posibilidad de reutilizar los sobrantes de los viales después de su utilización para los tratamientos indicados por parte de los Servicios de Farmacia hospitalaria. En esta Tesis Doctoral dicha funcionalidad se analiza mediante cultivos celulares que expresan el antígeno específico EGFR y un inmunoensayo tipo ELISA.

3.1. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA EN EL TIEMPO MEDIANTE CULTIVOS CELULARES

Este estudio de funcionalidad se basa en determinación de la bioactividad de CTX considerando su capacidad para reducir la proliferación celular. Para ello, se usaron células SW480 ya que expresan el EGFR. La presencia de CTX en el medio reduce la proliferación celular [11] que puede ser determinada cuantitativamente mediante el ensayo con sulforodamina-B (Capítulo I).

Para la optimización del método, se procedió a la realización de una curva de calibración con el objeto de seleccionar una concentración de estudio sin saturación de la señal. Dicho intervalo óptimo de concentraciones se basó en los estudios previamente realizados y en la búsqueda bibliográfica. Como en las experiencias llevadas a cabo con otros mAbs, las concentraciones seleccionadas estuvieron limitadas por el volumen de medio incluido en cada pocillo, evitando sobrepasar un 10% el dicho contenido. De tal forma, el intervalo de concentraciones para la recta de calibración fue de 0,03 μ g/mL a 0,5 μ g/mL de CTX. La Figura 5 muestra los resultados obtenidos para la selección de la concentración de estudio, que se estableció finalmente en 0,31 μ g/mL.

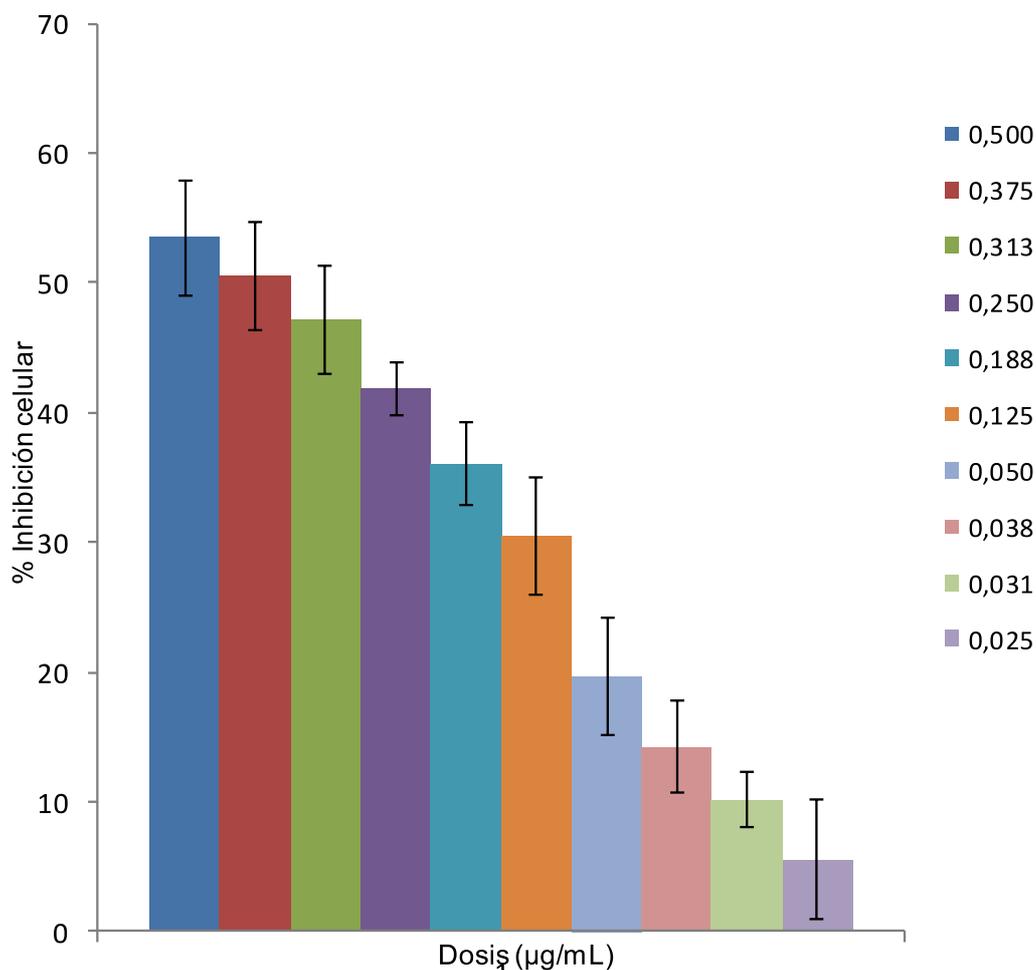


Figura 5. Representación de la inhibición celular provocada por diferentes concentraciones de CTX en la línea celular SW480.

Para el estudio de estabilidad a lo largo del tiempo, muestras del medicamento Erbitux® (CTX 5 mg/mL) se mantuvieron almacenadas refrigeradas a 4 °C y protegidas de la luz. El día que se inició el estudio, las muestras se dividieron en dos grupos: i) uno empleado para el estudio de estabilidad en el tiempo, el control del ensayo, y ii) el otro se repartió a su vez en otros dos grupos en función de la temperatura a la que fueron sometidas las muestras de medicamento durante una hora (a 50 °C o a 65

Capítulo V

°C) antes de proceder a su análisis; estas muestras fueron usadas como control negativo.

Los días analizados fueron día "0" (día de control), 1, 2, 7, 14 y 21. Cada día en que se realizó el análisis se analizó una muestra de medicamento fresco, muestras por tanto empleadas como control positivo. Los resultados fueron expresados como actividad residual frente al primer día, día "0" o control, al que se le asignó una actividad biológica del 100%, utilizando para ello la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición relativa} = \frac{\text{Inhibición detectada el día de análisis}}{\text{Inhibición detectada el día "0"}} \times 100$$

Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 6. Puede observarse la drástica pérdida de capacidad de inhibición de las muestras sometidas a estrés por temperatura, tanto a 50 °C como a 65 °C y el alto nivel de reproducibilidad en la inhibición de las muestras de control positivo (las muestras frescas de medicamento), sobre un 47%. En cuanto a las muestras empleadas para el estudio de estabilidad (controles de ensayo) la inhibición de la proliferación celular en el día "0" fue de 47,2% ($\pm 4,2\%$) (n = 5), y se mantuvo alrededor de este valor para las muestras de control positivo durante el tiempo de estudio. A las 24 horas, la inhibición de la proliferación se redujo hasta un 31,4% ($\pm 3,67\%$), lo que corresponde a un 16% de disminución absoluta con respecto al control positivo, y por tanto, un 34% de pérdida de funcionalidad. A las 48 horas, la disminución fue del 19,6% ($\pm 3,62\%$), es decir, un 27% de disminución absoluta con respecto al control positivo, por tanto, un 57% de disminución de la funcionalidad. Este porcentaje se mantuvo estable

Capítulo V

desde el día 7 hasta el final de la experiencia (día 21) registrando un 34,7% ($\pm 4,10\%$) de inhibición (12% con respecto al control positivo, pérdida una funcionalidad del 25%), 34,5% ($\pm 2,28\%$) (12% con respecto al control positivo, pérdida una funcionalidad del 25%) y 36,4% ($\pm 3,10\%$) (11% con respecto al control positivo, y pérdida de funcionalidad del 21 %) de inhibición de la proliferación en los días 7, 14 y 21, respectivamente.

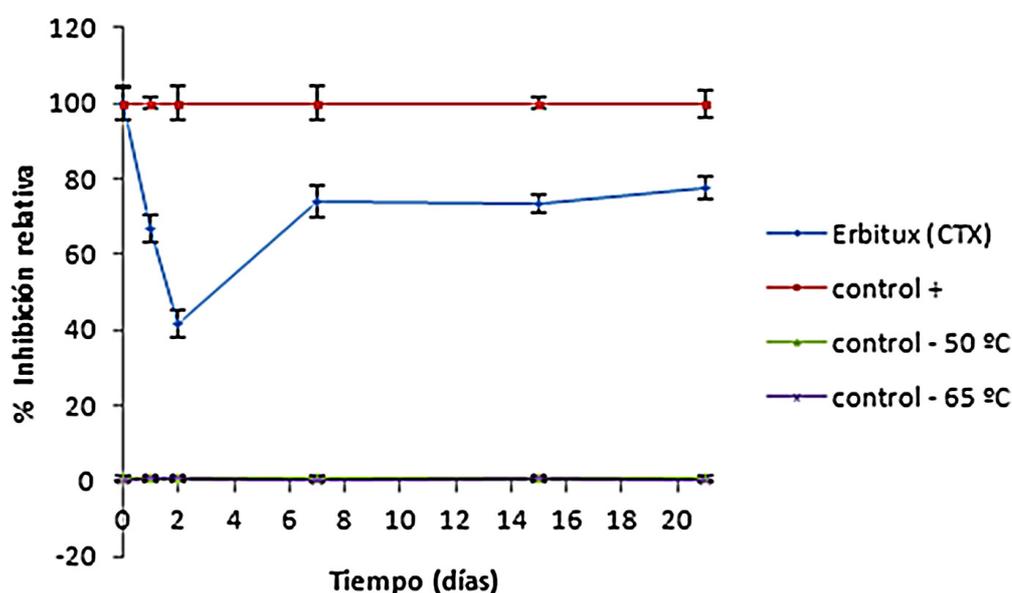


Figura 6. Resultados del estudio de estabilidad de CTX en la línea celular de SW480.

Estos datos de viabilidad mostraron por tanto una disminución importante de la funcionalidad, de hasta un 57%, en las primeras 48 horas de almacenamiento a 4 °C y protegido de la luz. A partir de ahí, la funcionalidad se recupera hasta un valor del 80% de la funcionalidad inicial y con respecto a las muestras de control. Si comparamos estos resultados con los obtenidos en la estabilidad estructural mediante la técnica (SE)HPLC-DAD, se puede comprobar la detección en el segundo

día de almacenamiento de un pico cromatográfico atribuido a la alteración de las cadenas proteicas, ya que correspondía a un tamaño menor que el del CTX [12]; esta alteración que evidencia una degradación en el tiempo (a las 24 horas) podría justificar la disminución de la inhibición del crecimiento de la línea celular SW480.

3.2. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA EN EL TIEMPO MEDIANTE ELISA

En la funcionalidad biológica de un mAb intervienen muchos factores, por lo que además del estudio anterior, se seleccionó también un ensayo tipo ELISA para cuantificar la actividad biológica de la reacción antígeno/anticuerpo específica del CTX. Por ello, se seleccionó un ELISA basado en la reacción entre el EGFR y el CTX. Este inmunoensayo ELISA fue desarrollado y validado previamente por nuestro grupo de investigación [13].

Antes de llevar a cabo el estudio de estabilidad en el tiempo, dado que la señal analítica del ELISA depende de la concentración de mAb ensayada, se procedió a la realización de una curva de calibración para seleccionar aquella concentración de estudio a la que no haya saturación de la señal. Las concentraciones empleadas fueron 0,25 µg/mL, 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL y 50 µg/mL. La Figura 7 representa la curva de calibración establecida a partir de datos experimentales triplicados. Como se puede apreciar, los resultados experimentales se ajustan a una función logarítmica neperiana ($R^2 = 0,93$). Se seleccionó como concentración para realizar el estudio de estabilidad del medicamento la concentración de 5 µg/mL, ya que no existe saturación

Capítulo V

de la señal analítica y variaciones alrededor de esta concentración serán fácilmente detectadas y puestas de manifiesto.

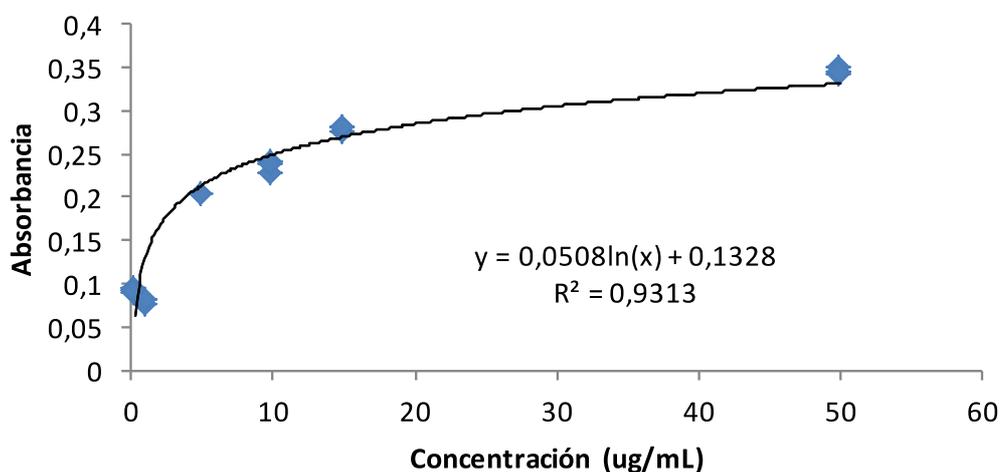


Figura 7: Curva de calibrado de CTX mediante ELISA.

Para el estudio de estabilidad en el tiempo, se almacenaron tres muestras de medicamento –pertenecientes al mismo lote y una vez abiertos los viales- refrigeradas a 4 °C y protegidas de la luz. Se realizaron los análisis los día “0” (día de preparación de las muestras, día de control o referencia), 1, 2, 7, 14 y 21. Los resultados de actividad biológica se expresaron como la actividad remanente comparada con el día inicial, el día “0”, al cual se le asignó un 100 % de actividad biológica. Para ello, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad biológica} = \frac{\text{Concentración día de análisis}}{\text{Concentración día 0}} \times 100$$

Capítulo V

La Figura 8 muestra los resultados de este estudio de estabilidad en el tiempo. Como puede observarse, se produce una pronunciada caída de la actividad biológica a las 24 horas tras la apertura de los viales, manteniéndose un 57% de la actividad inicial. A las 48 horas, esta actividad se estima en un 62% y se mantienen alrededor de este valor hasta el final del estudio. Nuevamente, la alteración detectada en estudio de estabilidad en el tiempo mediante (SE)HPLC-DAD se propone como la causa de esta disminución de funcionalidad [12], en este caso evaluada mediante la reacción específica del CTX con su proteína diana, el EGF.

En cuanto a las muestras de CTX sometidas a degradación térmica empleadas para validar los resultados del ELISA, estas sufrieron una pérdida de alrededor del 30% de actividad biológica inicial (aproximadamente un 69% remanente) frente a la muestra fresca, en consonancia con datos bibliográficos [14].

Este resultado de funcionalidad de CTX (Erbitux®), basado en la medida de la actividad biológica a través de la unión específica CTX/EGF mediante ELISA, está en consonancia con los resultados de funcionalidad expuestos anteriormente mediante la evaluación del crecimiento celular de líneas específicas sensibles a la presencia de este biofármaco. En ambos casos se produjo una disminución de la funcionalidad de forma marcada en las primeras 24/48, para luego mantener una funcionalidad relativamente constante del 50% de la funcionalidad inicial y atribuida a alteración/degradación producida en las cadenas peptídicas.

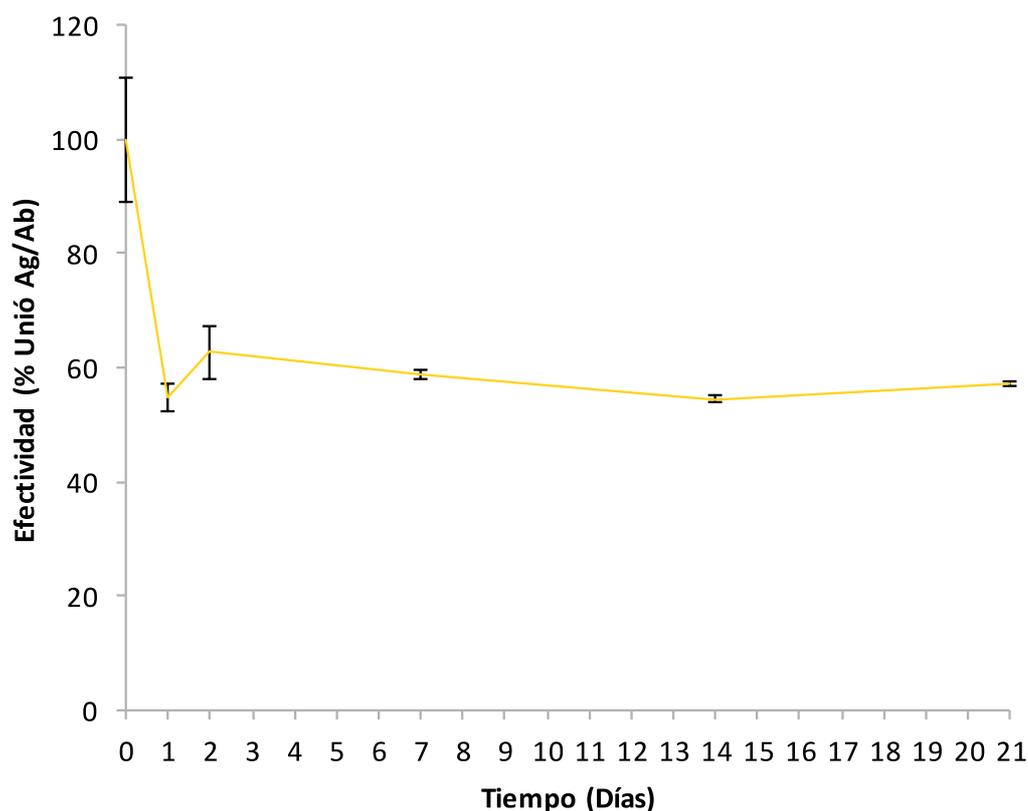


Figura 8. Estudio de estabilidad en el tiempo atendiendo a la actividad biológica de CTX (Erbitux®) mediada mediante ELISA.

Aunque los resultados de estabilidad funcional indican disminución de la misma, esta no es drástica, y está en consonancia con la descrita en trabajos similares [13,15,16].

4. CONCLUSIONES

El presente estudio demostró el potencial de dos estrategias diferentes para la evaluación de la funcionalidad del CTX en el medicamento Erbitux®. Así mismo, el empleo de la técnica de dicroísmo circular acoplada a un dispositivo de temperatura variable permitió

Capítulo V

evaluar la degradación térmica de CTX, asociándola a cambios en la estructura secundaria. Con este estudio, se ha demostrado que el aumento de la temperatura genera un cambio conformacional irreversible en la estructura del CTX, lo que lleva a un despliegue de la misma a la temperatura de 70 °C. Esta estrategia permitió seleccionar unas condiciones térmicas de degradación adecuadas para evaluar los métodos de análisis de la funcionalidad del CTX.

Con respecto a la valoración funcional mediante cultivos celulares, la línea celular SW480 ha demostrado ser sensible a la presencia en el medio del medicamento Erbitux®, por lo que se propone como la base para evaluar la funcionalidad de CTX.

En cuanto a los resultados de los estudios de estabilidad en el tiempo mediante los ensayos con la línea celular SW480 y el ELISA, estos indicaron una disminución de la funcionalidad del medicamento Erbitux® tras las 24/48 horas de su apertura y almacenamiento protegido de la luz refrigerado a 4 °C. La disminución de la funcionalidad así como la tendencia de la misma fue similar por ambos procedimientos. Estos es, se produjo importante caída de la funcionalidad a las 24 horas de almacenamiento, la cual se acentuó a las 48 horas, llegando a ser del 57% cuando se evaluó el crecimiento de la línea celular y del 40% de pérdida de capacidad de unión a la proteína a la que va dirigida su acción terapéutica, el EGF.

Estos resultados indican por tanto que el almacenamiento del medicamento Erbitux® protegido de la luz y a 4 ° C una vez abierto, no conserva plenamente su funcionalidad, evaluada mediante ELISA y

Capítulo V

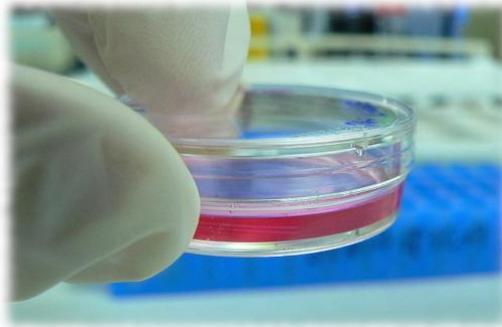
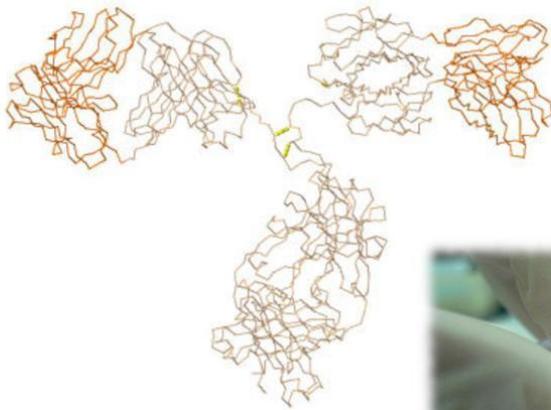
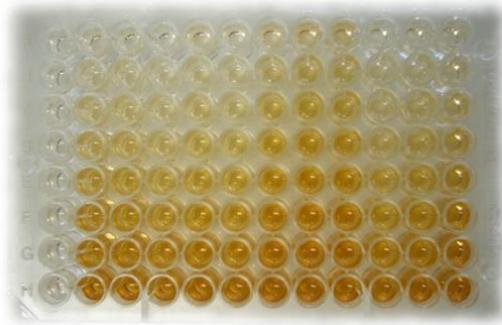
pruebas de crecimiento celular específicas. La funcionalidad se mantiene alrededor del 50%. Esta pérdida de funcionalidad se atribuyó a la alteración / degradación de las cadenas proteicas detectada mediante (SE)HPLC-DAD.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] E. Mata-Marínez, Métodos Físico-Químicos en Biotecnología: Dicroísmo Circular, Instituto de Biotecnología - UNAM, 2013. Prácticas tuteladas.
- [2] A. Abdul-Gader, A.J. Miles, B.A. Wallace, A reference dataset for the analyses of membrane protein secondary structures and transmembrane residues using circular dichroism spectroscopy, *Bioinformatics* 27(12) (2011) 1630-1636.
- [3] C. Perez-Iratxeta, M.A. Andrade-Navarro, K2D2: Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra, *BMC Struct Biol* 8(1) (2008) 25-30.
- [4] N.J. Greenfield, Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure, *Nat Protoc* 1(6) (2006) 2876-2890.
- [5] S.W. Baertschi, K.M. Alsante, R.A. Reed, *Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation*, Second Edition, CRC Press 2016.
- [6] Dichroweb. <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>. (Consultado 15 Enero 2019).
- [7] J.Y. Lim, N.A. Kim, D.G. Lim, K.H. Kim, S.H. Jeong, Effects of thermal and mechanical stress on the physical stability of human growth hormone and epidermal growth factor, *Arch Pharm Res* 38(8) (2015) 1488-1498.
- [8] A.W. Vermeer, W. Norde, The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein, *Biophys J* 78(1) (2000) 394-404.
- [9] T.T. Ito, Kouhei, Effects of subclass change on the structural stability of chimeric, humanized, and human antibodies under thermal stress, *Protein Sci* 22(11) (2013) 1542-1551.

Capítulo V

- [10] A.D. McConnell, X. Zhang, J.L. Macomber, B. Chau, J.C. Sheffer, S. Rahmanian, E. Hare, V. Spasojevic, R. Horlick, D.J. King, P. Bowers, A general approach to antibody thermostabilization, *mAbs* 6(5) (2014) 1274-1282.
- [11] C. Chu, M.S. Noël-Hudson, J. Bénard, T. Ha-Duong, F. Allaoui, R. Farinotti, L. Bonhomme-Faivre, Cetuximab directly inhibits P-glycoprotein function in vitro independently of EGFR binding, *Eur J Pharm Sci* 76 (2015) 18-26.
- [12] J. Hernández-Jiménez, A. Martínez-Ortega, A. Salmerón-García, J. Cabeza, J.C. Prados, R. Ortiz, N. Navas, Study of aggregation in therapeutic monoclonal antibodies subjected to stress and long-term stability tests by analyzing size exclusion liquid chromatographic profiles, *Int J Biol Macromol* 118(Pt A) (2018) 511-524.
- [13] I. Suárez, A. Salmerón-García, J. Cabeza, L.F. Capitán-Vallvey, N. Navas, Development and use of specific ELISA methods for quantifying the biological activity of bevacizumab, cetuximab and trastuzumab in stability studies, *J Chromatogr B* 1032 (2016) 155-164.
- [14] B. Halmos, B.Y. Yeap, B.E. Johnson, D.G. Tenen, J.A. Engelman, J. Pearlberg, L.C. Cantley, N.H. Hanna, N. Lindeman, P.A. Jänne, S. Kobayashi, T. Mukohara, Z. Tsuchihashi, Differential Effects of Gefitinib and Cetuximab on Non-small-cell Lung Cancers Bearing Epidermal Growth Factor Receptor Mutations, *J Natl Cancer Inst* 97(16) (2005) 1185-1194.
- [15] G.G.-B. Hongcheng Liu, Joanne Sun, Characterization of the stability of a fully human monoclonal IgG after prolonged incubation at elevated temperature, *J Chromatogr B* 837(1-2) (2006) 35-43.
- [16] S.N. Wei Wang, Dirk Teagarden, Protein aggregation—Pathways and influencing factors, *Int J Pharm* 390(2) (2010) 89-99.



Capítulo VI

Estudio de estabilidad funcional en el tiempo de trastuzumab (Herceptin®)

Capítulo VI

Contenido

1. RESUMEN.....	327
2. ESTUDIO CONFORMACIONAL DE TTZ MEDIANTE ESPECTROSCOPÍA DE DICROISMO CIRCULAR LEJANO	329
2.1. CARACTERÍSTICAS CONFORMACIONALES	329
2.2. ESTABILIDAD TERMICA.....	331
3. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA.....	338
3.1. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA EN EL TIEMPO MEDIANTE CULTIVOS CELULARES	339
3.2. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA EN EL TIEMPO MEDIANTE ELISA	342
4. CONCLUSIONES.....	345
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	348

Capítulo VI

1. RESUMEN

De manera similar al estudio presentado en el Capítulo anterior, aquí se presenta un estudio sobre la funcionalidad del mAb TTZ en el medicamento comercial Herceptin®. Esta funcionalidad se evalúa mediante las dos estrategias descritas anteriormente, esto es, mediante el uso de cultivos de líneas celulares tumorales y empleando un inmunoensayo tipo ELISA, ambos métodos desarrollados *ad hoc* para el estudio de la funcionalidad biológica de este mAb terapéutico en su medicamento comercial. Además, se presenta un estudio conformacional del mismo empleando la técnica de dicroísmo circular, con el objetivo de evaluar la estabilidad / degradación de esta proteína por aumento de la temperatura; estos resultados serán de utilidad en los estudios de evaluación de la funcionalidad.

TTZ es un anticuerpo terapéutico que se une de manera selectiva al receptor de tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (human epidermal growth factor receptor 2 o HER2), considerado como un receptor huérfano por no conocerse ligandos, aunque es fundamental para el crecimiento normal y la división celular, por lo que su expresión anormal está asociada a procesos cancerígenos, fundamentalmente en cáncer de mama. La finalidad del TTZ es la reducción de la proliferación de las células tumorales. La reducción de esta proliferación implica una mejora relevante en el pronóstico de vida de estos pacientes. El objetivo de esta investigación fue estudiar la estabilidad funcional en el tiempo de esta proteína terapéutica (Herceptin®) almacenada a 4 °C y protegida de la luz mediante el uso de la línea SKBR3 y la metodología ELISA. Los

Capítulo VI

resultados de estas dos posibilidades para evaluar diferentes aspectos de la funcionalidad del TTZ se presentan en este Capítulo.

2. ESTUDIO CONFORMACIONAL DE TTZ MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE DICROISMO CIRCULAR LEJANO

De manera similar al estudio del Capítulo anterior, el estudio conformacional de TTZ (Herceptin®) también se realizó con un doble objetivo, por un lado, caracterizar su estructura secundaria en condiciones óptimas de actividad, esto es, recién abierto el vial de medicamento; y por otro, la determinación de la robustez de esta conformación frente a cambios de temperatura de manera que permita seleccionar una temperatura a la que someter el medicamento y degradarlo suavemente para poder usarlo como control en la comparación de la funcionalidad de las muestras de medicamento fresco y activo en la puesta a punto del método de funcionalidad basado en crecimiento de líneas celulares.

2.1. CARACTERÍSTICAS CONFORMACIONALES

Para la obtención del espectro DC de TTZ, representativo de su estructura secundaria, se aplicó la dilución necesaria (con NaCl 0,9%) para registrar dicho espectro a la concentración óptima de trabajo de 0,5 mg/mL. Las condiciones instrumentales a las que se registraron los espectros fueron optimizadas y han sido descritas en el Capítulo I. La Figura 1 muestra el espectro de DC de TTZ en condiciones óptimas de funcionalidad. Los valores de los parámetros característicos que definen esta estructura secundaria son 209,8 nm para la λ que presenta elipticidad cero, 217,4 nm para la λ de elipticidad mínima, y 230 nm para el punto de inflexión. A diferencia de los resultados obtenidos en el espectro DC

Capítulo VI

de CTX (Capítulo V), el punto de inflexión es más prominente en el caso de TTZ, indicando esto claramente diferencias en cuanto a las estructuras secundarias de los dos mAbs, a pesar de ser los dos IgG1. De nuevo, como estructura basada en una inmunoglobulina, los valores de estas λ en el espectro DC de TTZ son indicadores de una estructura mayoritariamente en lámina β tal y como lo refleja la bibliografía [1]. Una vez definido este espectro DC de TTZ, cualquier cambio en las zonas espectrales indicadas será reflejo de alguna variación en la conformación del TTZ a nivel de la estructura secundaria del biofármaco.

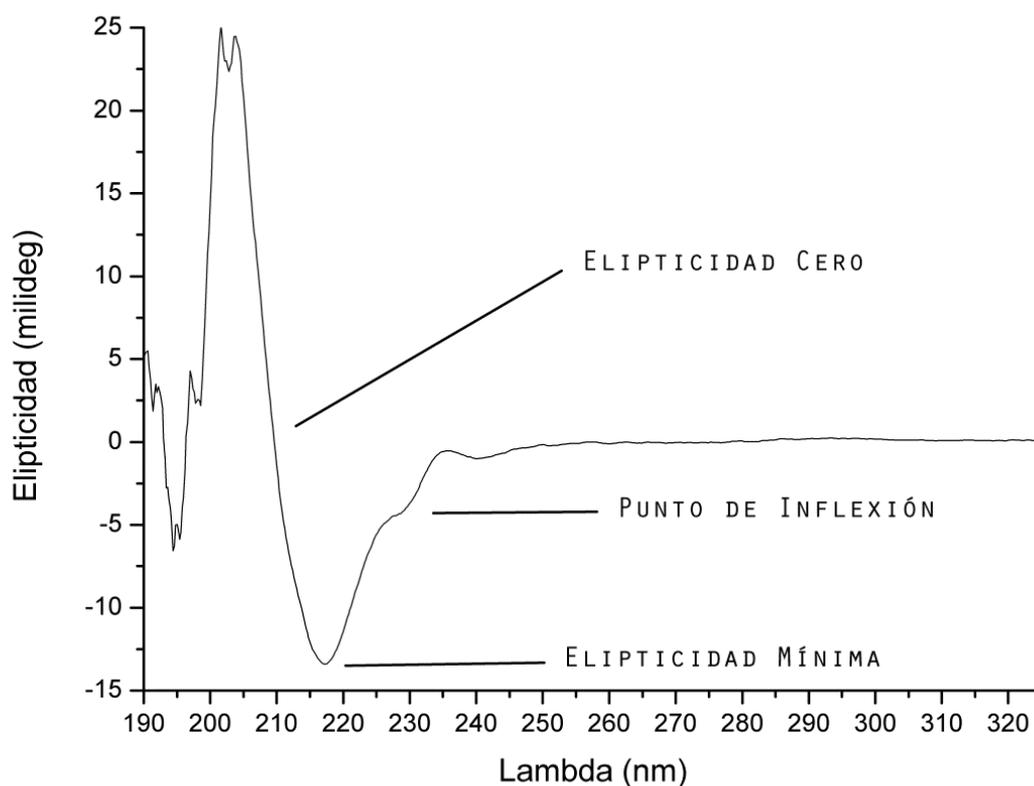


Figura 1. Espectro DC característico de TTZ, obtenido a partir de muestra de medicamento Herceptin® dentro de su fecha indicada de uso.

Capítulo VI

A partir del espectro DC, se realizó el análisis de estimación de la estructura secundaria utilizando algoritmos empíricos y bases de datos de espectros DC de referencia de proteínas cuya estructura secundaria es conocida [2]. De los diferentes algoritmos que se emplearon, de nuevo se seleccionó el de deconvolución K2D [3, 4] empleando la base de datos de espectros DC de referencia SMP180 [2] por dar lugar a resultados coherentes y en consonancia con datos descritos en la bibliografía. El resultado obtenido mediante este análisis estimó un porcentaje del 55,7% de estructura en lámina β y 39,2% de estructura aleatoria, siendo concordante con los datos de plegamiento en lámina β característico de las IgG [5].

2.2. ESTABILIDAD TERMICA

Una vez caracterizada la estructura secundaria de TTZ mediante su espectro DC, se estudió la estabilidad de esta conformación con respecto a la temperatura, analizando los cambios que se producen en dicho espectro. En primer lugar se empleó un amplio intervalo de temperatura, (de 20 °C a 90 °C, con incrementos de 10 °C. De esta forma, se pudo comprobar que el proceso de agregación se hace visible (aparición de coagulación) en torno a la temperatura de 80°C, con cambios detectables también en el correspondiente espectro DC. Los resultados de esta experiencia se recogen en la Figura 2, donde pueden observarse los cambios en los parámetros espectrales característicos del espectro DC de TTZ con el aumento de temperatura, indicando por tanto modificaciones en la estructura secundaria de esta proteína. La zona correspondiente al punto de inflexión se ve más afectada que el caso del

Capítulo VI

mAb CTX, por lo que estos datos parecen indicar una menor estabilidad térmica del TTZ.

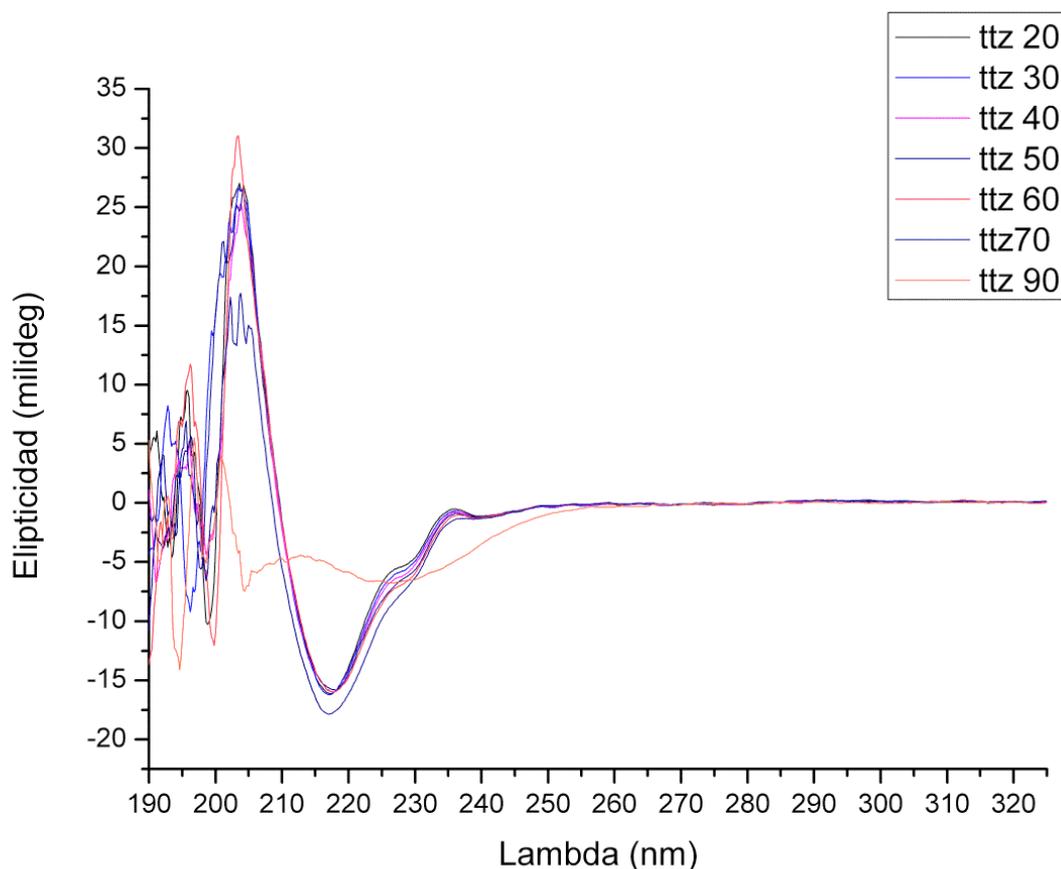


Figura 2. TTZ: estudio mediante DC de la estabilidad térmica por rampa de temperatura de 20 °C a 90 °C.

A continuación se realizó un estudio más detallado con aumentos de temperatura de 5 °C y un intervalo de temperatura de 20 a 80 °C. La temperatura a la que se formaron los agregados visibles fue la de 75 °C. La Figura 3 muestra los resultados de esta experiencia, donde también se recoge en detalle las zonas donde se producen las variaciones más importantes en el espectro DC. En la zona correspondiente a la elipticidad mínima, los cambios son moderados hasta alcanzar la temperatura de 75 °C, a partir de la cual son muy notables (Figura 3 B).

Capítulo VI

La zona correspondiente al punto de inflexión (Figura 3 C) es donde se observó mayor variabilidad, hasta el punto que entre 75 °C y a 80 °C se pudo comprobar la pérdida completa del punto de inflexión. Según la bibliografía consultada, las estructuras en lámina β presentan menor robustez frente a situaciones de estrés [6].

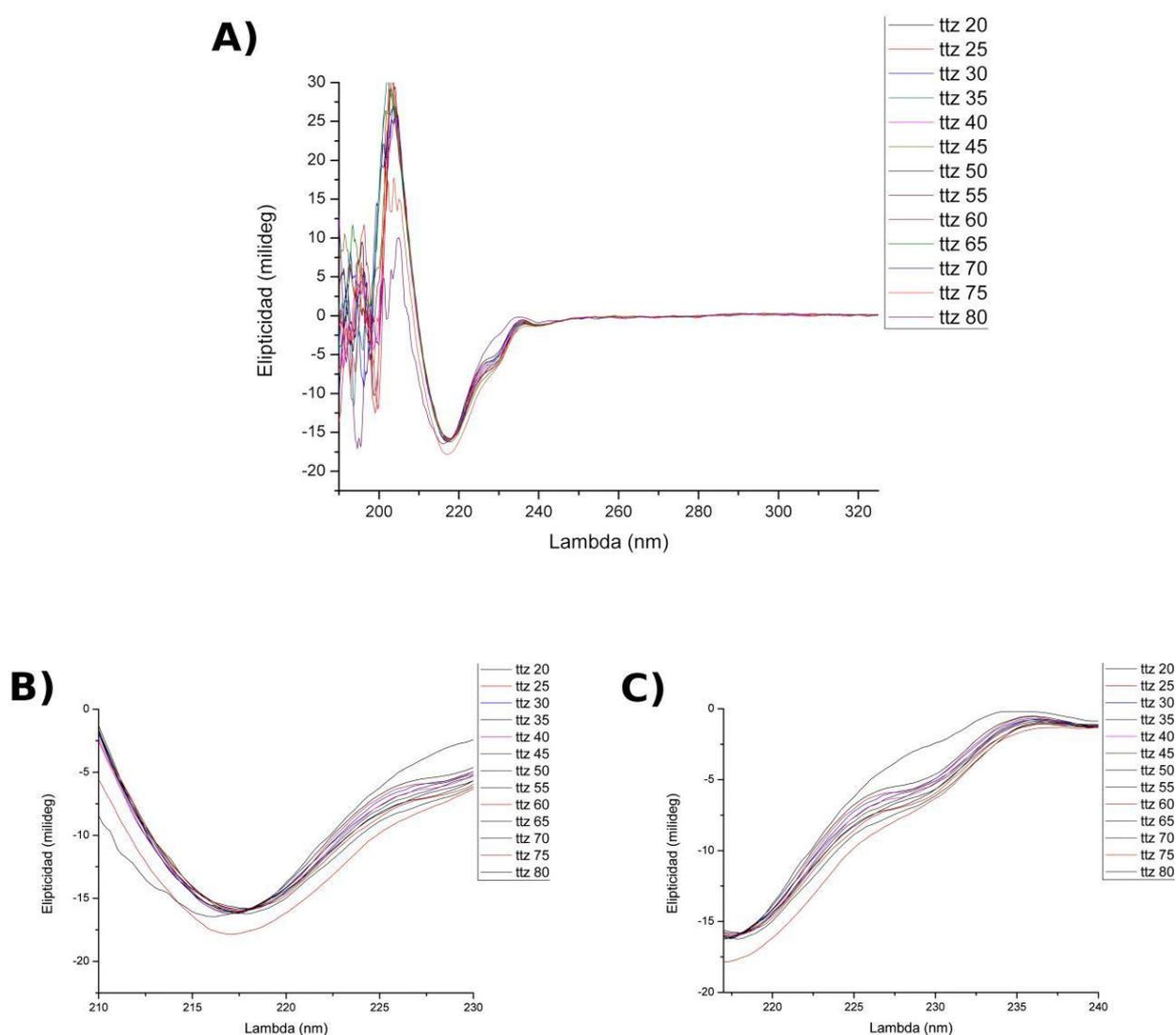


Figura 3. Estudio de degradación por incremento de la temperatura de TTZ: A) espectros de DC desde 20 °C a 80 °C; B) detalle de los cambios registrados a λ mínima de 217,4 nm; C) detalle de los cambios registrados alrededor del punto de inflexión 230 nm.

Capítulo VI

El análisis de los datos mediante el programa online "dichroweb" (Tabla 1) [7] permitió comprobar una tendencia a la pérdida estructural parcial de la lámina β a favor de una distribución aleatoria y de un ligero aumento de la fracción estructural en hélice α a partir de 70 °C, siendo más acentuada esta tendencia a la temperatura de 75 °C [8, 9]. De ello se deduce, como es lógico, que la pérdida de la estructura secundaria interviene en los procesos de agregación [10]. Los datos obtenidos mediante este análisis teórico de predicción de estructura podrían sugerir con un modelo de comportamiento cooperativo en cuanto a la estructura tridimensional del TTZ, ya que indican que el porcentaje de lámina β permanece bastante estable hasta los primeros signos visibles de agregación (temperatura de 75 °C), en la que se detecta una pérdida de esta estructura global.

Tabla 1. Cambios conformacionales mediante el programa online "dichroweb" [7].

TTZ T (°C)	Estructura Alfa-hélice	Estructura Lámina-beta	Estructura Desordenada
ttz 20 1	0,051	0,547	0,403
ttz 20 2	0,049	0,553	0,398
ttz 20 3	0,052	0,571	0,376
media	0,051	0,557	0,392
desv	0,002	0,012	0,014
%DER ¹	3,015	2,242	3,661
ttz 25 1	0,057	0,545	0,397
ttz 25 2	0,052	0,549	0,400
ttz 25 3	0,053	0,562	0,387
media	0,054	0,552	0,395
desv	0,003	0,009	0,007
%DER	4,900	1,610	1,725

Capítulo VI

(Continuación Tabla 1)

TTZ T (°C)	Estructura Alfa- hélice	Estructura Lámina- beta	Estructura Desordenada
ttz 30 1	0,051	0,549	0,401
ttz 30 2	0,053	0,563	0,385
ttz 30 3	0,053	0,548	0,398
media	0,052	0,553	0,395
desv	0,001	0,008	0,009
%DER	2,206	1,516	2,155
ttz 35 1	0,052	0,567	0,381
ttz 35 2	0,051	0,546	0,403
ttz 35 3	0,054	0,568	0,379
media	0,052	0,560	0,388
desv	0,002	0,012	0,013
%DER	2,919	2,217	3,435
ttz 40 1	0,051	0,553	0,397
ttz 40 2	0,049	0,553	0,399
ttz 40 3	0,052	0,551	0,396
media	0,051	0,552	0,397
desv	0,002	0,001	0,002
%DER	3,015	0,209	0,384
ttz 45 1	0,053	0,557	0,389
ttz 45 2	0,056	0,554	0,391
ttz 45 3	0,053	0,549	0,399
media	0,054	0,553	0,393
desv	0,002	0,004	0,005
%DER	3,208	0,730	1,346
ttz 50 1	0,054	0,559	0,388
ttz 50 2	0,052	0,549	0,398
ttz 50 3	0,055	0,554	0,391
media	0,054	0,554	0,392
desv	0,002	0,005	0,005
%DER	2,846	0,903	1,308

Capítulo VI

(Continuación Tabla 1)

TTZ T (°C)	Estructura Alfa- hélice	Estructura Lámina- beta	Estructura Desordenada
ttz 55 1	0,054	0,561	0,387
ttz 55 2	0,051	0,551	0,399
ttz 55 3	0,053	0,559	0,397
media	0,053	0,557	0,394
desv	0,002	0,005	0,006
%DER	2,900	0,950	1,630
ttz 60 1	0,055	0,556	0,390
ttz 60 2	0,053	0,547	0,401
ttz 60 3	0,052	0,547	0,402
media	0,053	0,550	0,398
desv	0,002	0,005	0,007
%DER	2,864	0,945	1,674
ttz 65 1	0,062	0,521	0,418
ttz 65 2	0,064	0,520	0,415
ttz 65 3	0,061	0,526	0,414
media	0,062	0,522	0,416
desv	0,002	0,003	0,002
%DER	2,451	0,615	0,501
ttz 70 1	0,074	0,476	0,449
ttz 70 2	0,071	0,481	0,449
ttz 70 3	0,073	0,489	0,439
media	0,073	0,482	0,446
desv	0,002	0,007	0,006
%DER	2,102	1,360	1,295
ttz 75 1	0,113	0,385	0,503
ttz 75 2	0,107	0,388	0,506
ttz 75 3	0,111	0,379	0,511
media	0,110	0,384	0,507
desv	0,003	0,005	0,004
%DER	2,769	1,193	0,798

Capítulo VI

(Continuación Tabla 1)

TTZ T (°C)	Estructura Alfa-hélice	Estructura Lámina-beta	Estructura Desordenada
ttz 80 1	0,109	0,382	0,510
ttz 80 2	0,114	0,377	0,509
ttz 80 3	0,113	0,389	0,499
media	0,112	0,383	0,506
desv	0,003	0,006	0,006
%DER	2,362	1,575	1,202

(1)DER: Desviación estándar relativa.

Al mismo tiempo, se comprobó la reversibilidad del proceso de agregación favorecido por el incremento de temperatura. La prueba consistió en someter muestras del medicamento Herceptin® (TTZ) a la temperatura crítica anterior a la aparición de los primeros signos visuales de agregación, es decir, a 70 °C, durante tiempos determinados (5 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 5 horas y 24 horas) e ir evaluando los cambios y su reversibilidad a través de la comparación de los espectros DC registrados tras el enfriamiento de las muestras a temperatura ambiente con el espectro de la muestra no sometida a estrés por temperatura. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 4; estos mostraron que las modificaciones en los espectros se mantienen, y no son reversibles, por lo que esta temperatura fue la seleccionada para degradar el TTZ en los estudios que se exponen a continuación sobre evaluación de la funcionalidad mediante cultivos celulares. Cuando se empleen muestras sometidas a esta temperatura, la actividad observada podrá ser atribuida a la forma estresada y no a una inversión de la estructura nativa de TTZ [9-11].

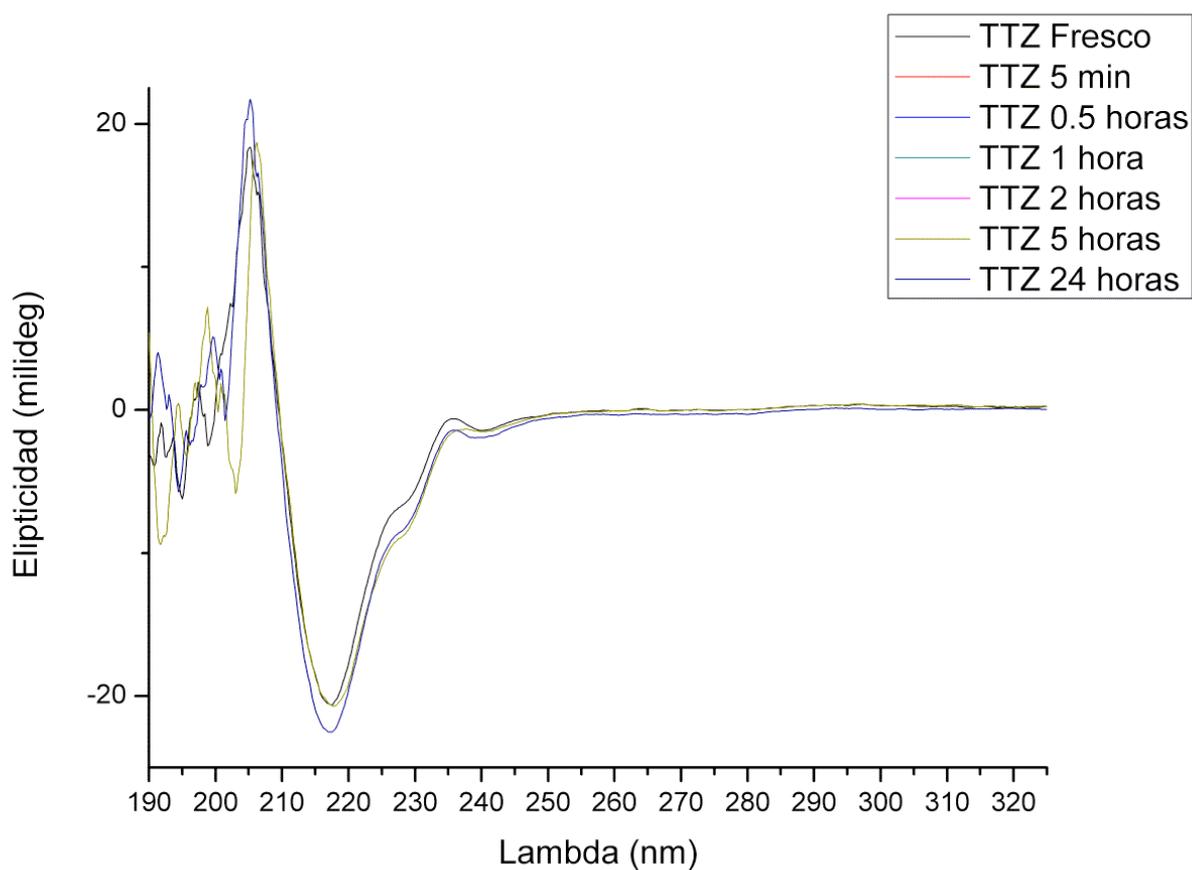


Figura 4. Estudio de la reversibilidad de los cambios en la estructura secundaria de muestra de TTZ en disolución (Herceptin®) a la temperatura de 70 °C.

3. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA.

La funcionalidad de TTZ (Herceptin®) se evaluó, como en el Capítulo anterior, mediante el empleo de cultivos celulares expresan el antígeno específico frente al que actúa el TTZ, el HER2, y mediante la evaluación directa de la reacción antígeno / anticuerpo específica a través de un inmunoensayo tipo ELISA.

3.1. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA EN EL TIEMPO MEDIANTE CULTIVOS CELULARES

El fundamento de este estudio se basa en determinar la bioactividad de TTZ, teniendo en cuenta su capacidad de acción en la reducción de la proliferación celular. Las células SKBR3 se seleccionaron por expresar HER2, proteína reconocida por el biofármaco en estudio. La modulación de la proliferación celular se determinó mediante el ensayo de sulforodamina B (Capítulo I) [12].

Para optimizar el estudio, se realizó un análisis de la inhibición de la proliferación celular para seleccionar una concentración de fármaco sin saturación de señal. Este intervalo de concentración óptimo, al igual que en el Capítulo anterior, se basó en estudios previos e investigaciones bibliográficas, donde las concentraciones seleccionadas fueron limitadas por el volumen de medio de cultivo contenido en cada pocillo, de manera que no se excedieran nunca el 10% de dicho volumen. Por lo tanto, el intervalo de concentración para obtener la función de calibración fue de 0,21 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a 2,10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de TTZ. La Figura 5 muestra los resultados de inhibición de la proliferación después de la exposición a TTZ cuyos viales fueron recién abiertos. La concentración seleccionada fue 1,31 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de TTZ.

Capítulo VI

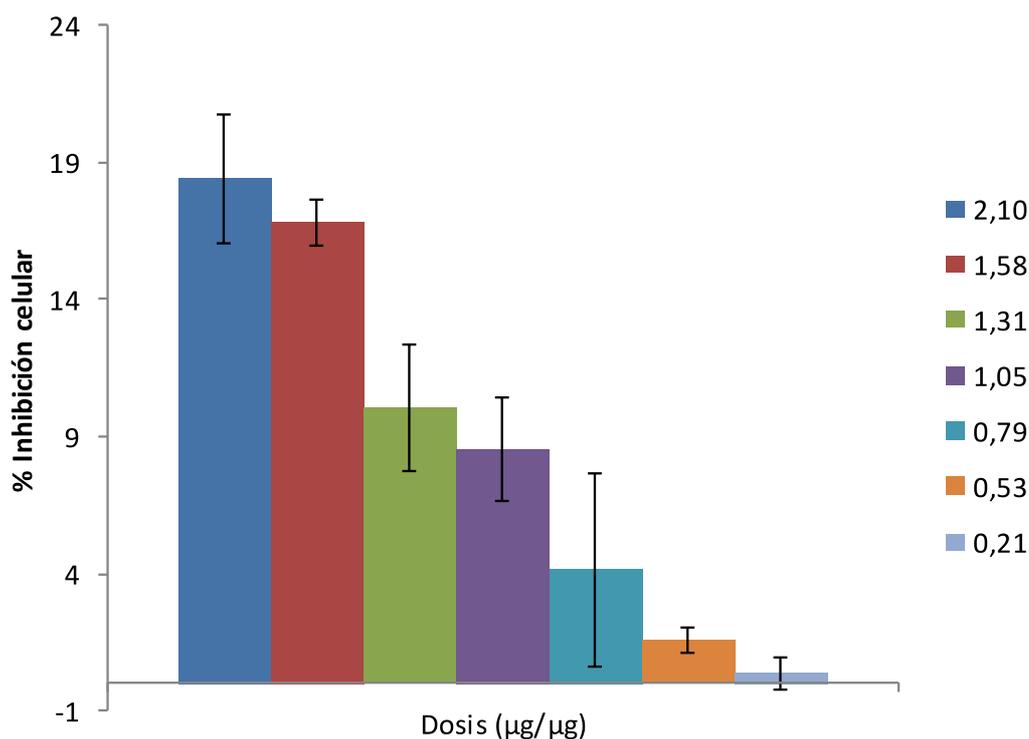


Figura 5. Representación de la inhibición celular provocada por diferentes concentraciones de TTZ en la línea celular SKBR3.

Para evaluar la estabilidad a lo largo del tiempo de TTZ (Herceptin® 21 mg/mL) almacenado refrigerado a 4 °C y protegido de la luz, se siguió la estrategia ya indicada en el Capítulo anterior, es decir, las muestras fueron repartidas en dos grupos: i) uno empleado para el estudio de estabilidad en el tiempo, el control del ensayo, y ii) y otro, el control negativo, que se dividió a su vez en otros dos subgrupos en función de la temperatura a la que se sometieron las muestras durante una hora (50 °C o 70 °C) antes de analizarlas.

Los días en que se realizaron análisis fueron el día “0” (día del control), 1, 2, 7, 14 y 21. Cada día en que se realizó el análisis se analizó también una muestra de medicamento fresco, muestras empleadas como control positivo. Los resultados fueron expresados como actividad

Capítulo VI

residual frente al primer día, día “0” o control, al que se le asignó una actividad biológica del 100%, utilizando para ello la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición relativa} = \frac{\text{Inhibición detectada el día de análisis}}{\text{Inhibición detectada día 0}} \times 100$$

La Figura 6 muestra los resultados de este estudio. La inhibición de la proliferación celular inducida por la exposición a TTZ tanto de los controles positivos (las muestras de medicamento fresco analizadas cada día) como los controles de ensayo a día “0” (las muestras objeto de estudio) fue del 10,0% ($\pm 2,1\%$). Después de 24 horas de almacenamiento del medicamento, la inhibición de la proliferación se mantuvo en un 10.8%, indicando por tanto alto nivel de estabilidad funcional, prácticamente del 100% como recoge la Figura 6. Tras 48 horas, esta inhibición se redujo al 7,0% ($\pm 0,8\%$) es decir, una pérdida de funcionalidad entorno al 30% con respecto a la muestra fresca. A los 7 días la disminución alcanzó el 6,3% ($\pm 1,3\%$) lo que representó una pérdida del 40% de su funcionalidad. En los siguientes días de análisis, la tendencia fue un aumento de la capacidad de inhibición de proliferación llegando a estar próxima al valor inicial (9% $\pm 0,6\%$) en el día 21 del análisis, representando por tanto una pérdida de funcionalidad entorno al 10% el último día de control. Las muestras estresadas por temperatura (50 °C y 75 °C, controles negativos) mostraron una actividad residual por debajo del 5% con respecto al control positivo, demostrando claramente su pérdida de funcionalidad por efecto de la temperatura, a la vez que sirvieron de muestra de validación del método.

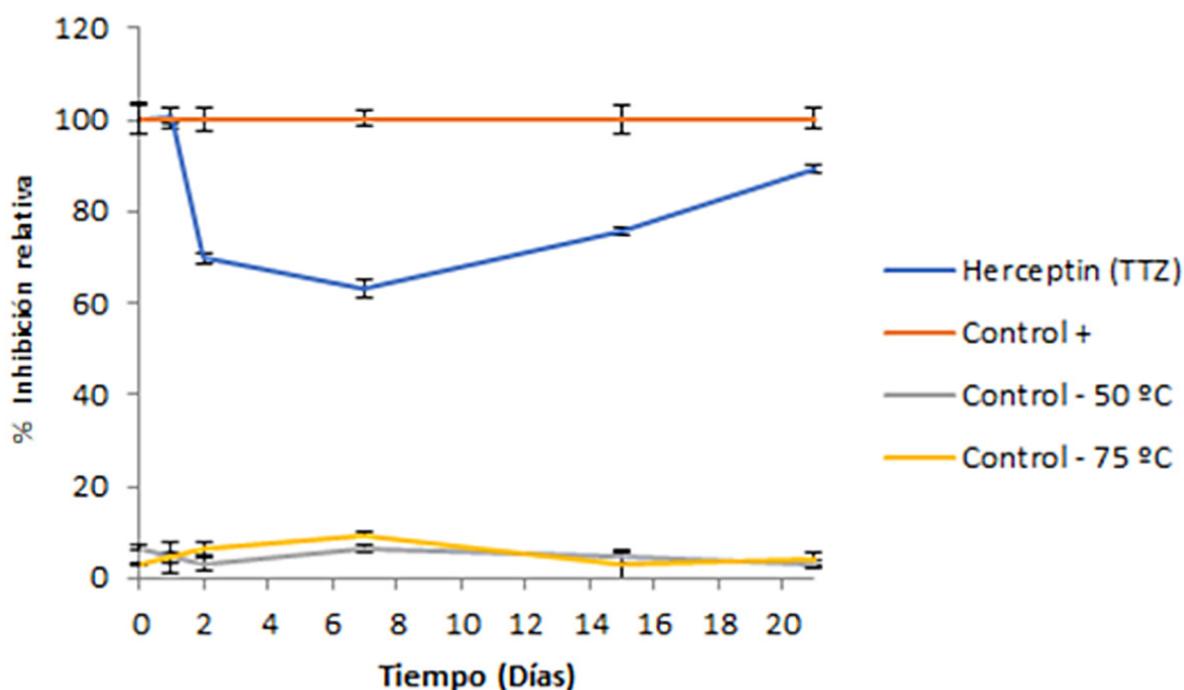


Figura 6. Resultados del estudio de estabilidad en el tiempo de TTZ (Herceptin®) en líneas celulares de SKBR3.

Por otra parte, comparando estos resultados con los obtenidos en la estabilidad frente a la formación de agregados, dado que en aquel caso se sugirió estabilidad de Herceptin® almacenado refrigerado a 4 °C protegido de la luz mediante la técnica (SE)HPLC-DAD al no detectarse picos diferentes a los monómeros [13], las variaciones en la funcionalidad aquí encontradas no han podido ser atribuidas a procesos de alteración por agregación ni fragmentación de las cadenas proteicas.

3.2. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD BIOLÓGICA EN EL TIEMPO MEDIANTE ELISA

Para evaluar la funcionalidad de TTZ a través de su unión específica con el HER2, se seleccionó un ELISA basado en la reacción

Capítulo VI

entre este receptor y TTZ, previamente desarrollado y validado por nuestro Grupo de investigación [14].

La Figura 7 muestra la función de calibrado obtenida con las concentraciones 2,5 ng/mL, 5 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 75 ng/mL, 250 ng/mL y 500 ng/mL de TTZ, obtenida a partir de datos experimentales por triplicado. Como se puede ver, los resultados experimentales se adaptan a una función logarítmica neperiana ($R^2 = 0,92$). La concentración de 75 ng/mL fue seleccionada para el estudio de estabilidad del medicamento, ya que no hay saturación de la señal analítica y las variaciones en torno a esta concentración pueden detectadas.

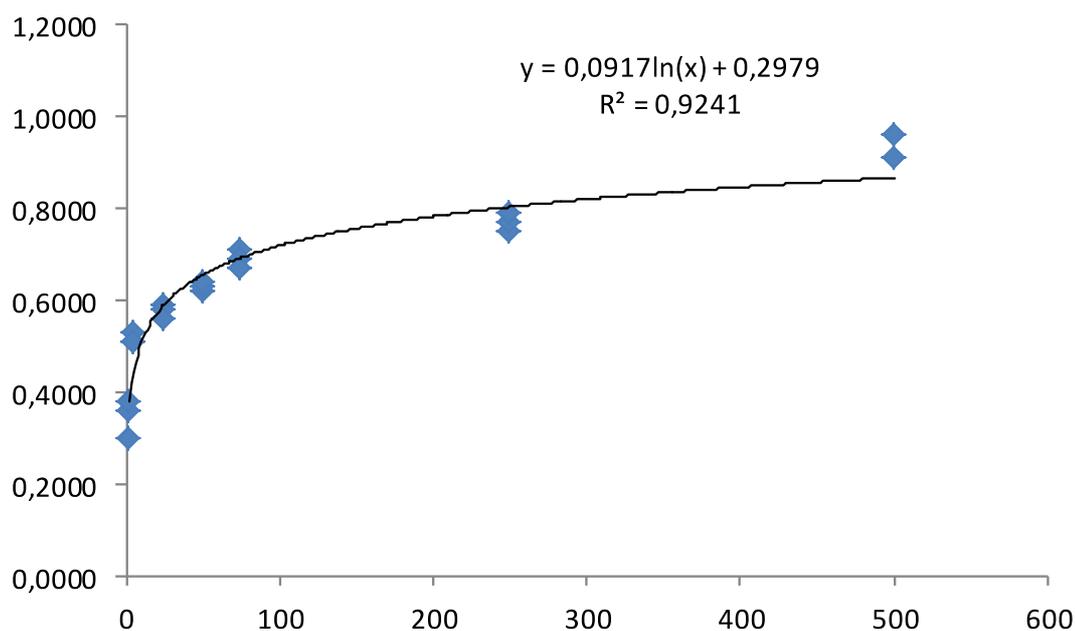


Figura 7. Curva de calibrado de TTZ mediante ELISA.

El estudio de estabilidad en el tiempo se realizó con muestras de medicamento (Herceptin®) almacenadas refrigeradas a 4 °C (procedentes del mismo lote), protegidas de la luz, y tras la apertura de los viales. Los

Capítulo VI

análisis se realizaron en los días “0” (día de preparación de la muestra, día de control o día de referencia), 1, 2, 7, 14 y 21. Los resultados de la actividad biológica se expresaron como actividad residual en comparación con el primer día, día “0” o control, al que se asignó una actividad biológica del 100%. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad biológica} = \frac{\text{Concentración día de análisis}}{\text{Concentración día 0}} \times 100$$

La Figura 8 muestra los resultados de este estudio de estabilidad a lo largo del tiempo. Como se puede observar, el comportamiento en las primeras 24 horas de almacenamiento es similar al obtenido mediante los ensayos de inhibición de líneas celulares, es decir, se mantiene la funcionalidad inicial. Tras 48 horas es cuando se detecta una disminución significativa de la actividad biológica, que disminuye a un 65% de la actividad inicial, para permanecer en torno al 75% durante el resto del tiempo evaluado hasta (21 días). La tendencia en la primera semana es por tanto muy similar a la obtenida mediante inhibición de las líneas celulares.

En cuanto a las muestras de TTZ sometidas a degradación térmica empleadas para validar los resultados del ELISA, estas sufrieron una pérdida de alrededor del 40% de actividad biológica inicial (62% de actividad remanente) en el caso de las muestras sometidas a 50 °C durante una hora, y en torno al 75% de pérdida de actividad biológica inicial (22% de actividad remanente) en el caso de las muestras sometidas a 75 °C. Estos resultados están en consonancia con datos bibliográficos [15].

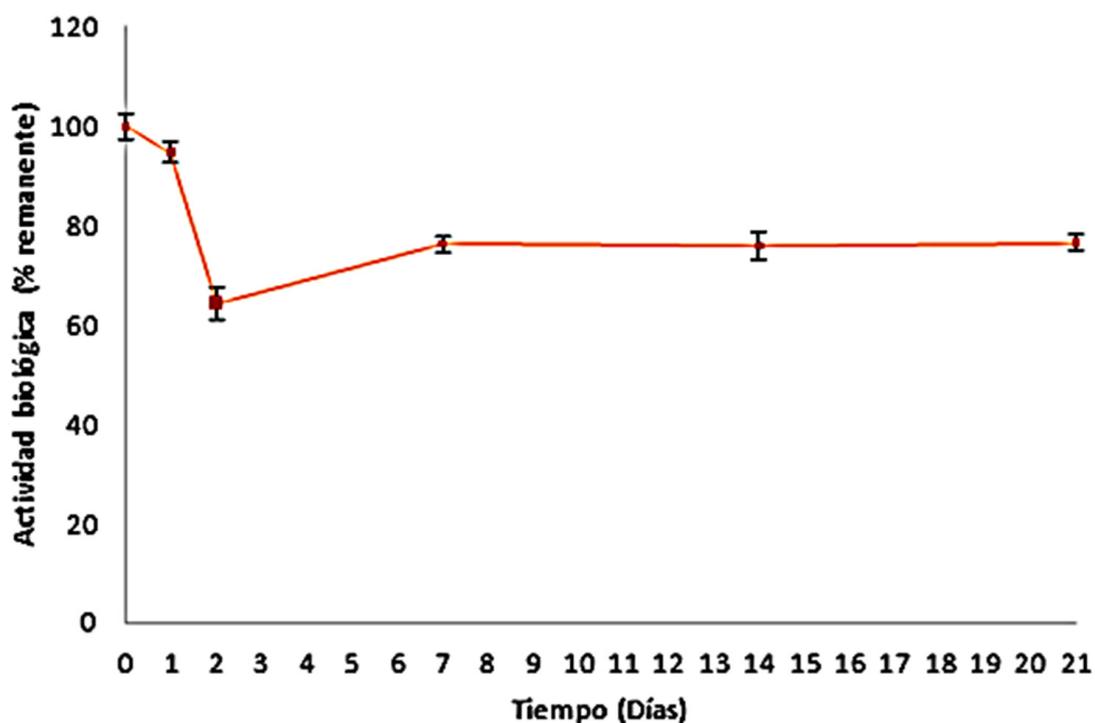


Figura 8. Estudio de estabilidad en el tiempo atendiendo a la actividad biológica de TTZ (Herceptin®) medido mediante ELISA.

A pesar de que los resultados de la estabilidad funcional indican una disminución de la misma a partir de las primeras 24 horas, ésta no es drástica al final del estudio y es acorde con la descrita anteriormente mediante inhibición de la línea SKBR3 y en experiencias similares. [14,16,17].

4. CONCLUSIONES

En este trabajo se volvió a demostrar la potencialidad del empleo conjunto de la técnica ELISA y de estudios basados en inhibición del crecimiento de líneas celulares para evaluar la funcionalidad de mAbs terapéuticos comerciales, concretamente del TTZ en el medicamento

Capítulo VI

Herceptin®. Junto a estas dos técnicas, el dicroísmo circular permitió aportar información valiosa sobre estabilidad térmica de la proteína terapéutica, siendo de interés los resultados en el contexto del desarrollo del método basado en el crecimiento de las líneas celulares.

En cuanto a la estabilidad de TTZ (Herceptin®), los resultados mediante DC sugirieron que presenta una estructura colaborativa, contribuyendo toda la estructura al mantenimiento de la conformación hasta una determinada temperatura, a partir de la cual se produce el desplegamiento “brusco” de la estructura con aparición de agregación visible (a 75 °C).

En cuanto a la evaluación funcional a través del uso del cultivo celular, la línea celular SKBR3 fue sensible a la presencia de Herceptin® en el medio de cultivo y, por lo tanto, se propone como base para el estudio de la funcionalidad de TTZ en aquellos fármacos en los que puede estar presente este mAb terapéutico.

Los resultados obtenidos en los estudios de estabilidad en el tiempo con la línea celular SKBR3 y ELISA fueron bastante coherentes entre sí, a pesar de basar sus estrategias en fundamentos muy diferentes. En ambos casos, se demostró que TTZ (Herceptin®) es estable una vez abierto el vial, almacenado refrigerado a 4 °C y protegido de la luz hasta las 48 horas, tras lo cual ambas metodologías indicaron una considerable disminución de la funcionalidad (del 40% con las líneas celulares y del 35% con ELISA), con tendencia a recuperar los valores iniciales en el caso de los ensayos con la línea celular, y manteniéndose en un 75% en los estudios realizados con el inmunoensayo ELISA.

Capítulo VI

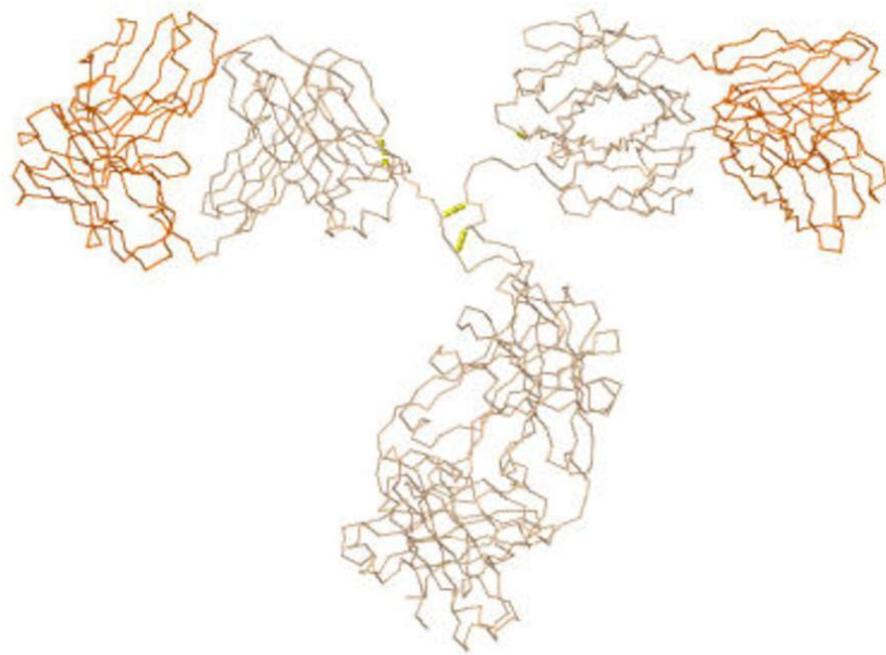
Por lo tanto, estos resultados sugieren que el almacenamiento del medicamento Herceptin®, protegido de la luz y a 4 °C después de su apertura, preserva la funcionalidad durante las primeras 24 horas; a partir de ese tiempo, disminuye, aunque manteniéndose alrededor del 75% en los datos de actividad biológica, y prácticamente recuperado funcionalidad por inhibición de la línea celular SKBR3. Estos datos, junto con los obtenidos en el estudio de estabilidad similar evaluado mediante (SE)HPLC-DAD, ponen de manifiesto una muy buena estabilidad del medicamento una vez abierto las primeras 24/48 horas, e incluso un aceptable mantenimiento de la misma hasta tres semanas.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] E. Mata-Marínez, Métodos Físico-Químicos en Biotecnología: Dicroísmo Circular, Instituto de Biotecnología - UNAM, 2013. Prácticas tuteladas.
- [2] A. Abdul-Gader, A.J. Miles, B.A. Wallace, A reference dataset for the analyses of membrane protein secondary structures and transmembrane residues using circular dichroism spectroscopy, *Bioinformatics* (Oxford, England) 27(12) (2011) 1630-1636.
- [3] C. Perez-Iratxeta, M.A. Andrade-Navarro, K2D2: Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra, *BMC Struct Biol* 8(1) (2008) 25.
- [4] N.J. Greenfield, Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure, *Nat Protoc* 1(6) (2006) 2876-2890.
- [5] R.L. Stanfield, I.A. Wilson, *Antibody Molecular Structure, Therapeutic Monoclonal Antibodies* 2009.
- [6] S.W. Baertschi, K.M. Alsante, R.A. Reed, *Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation, Second Edition*, CRC Press 2016.
- [7] Dichroweb. <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>. (Accedido el 15 de Enero de 2019).
- [8] J.Y. Lim, N.A. Kim, D.G. Lim, K.H. Kim, S.H. Jeong, Effects of thermal and mechanical stress on the physical stability of human growth hormone and epidermal growth factor, *Arch Pharm Res* 38(8) (2015) 1488-1498.
- [9] A.W. Vermeer, W. Norde, The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein, *Biophys J* 78(1) (2000) 394-404.

Capítulo VI

- [10] T. Ito, K. Tsumoto, Effects of subclass change on the structural stability of chimeric, humanized, and human antibodies under thermal stress, *Protein Sci* 22(11) (2013) 1542-1551.
- [11] A.D. McConnell, X. Zhang, J.L. Macomber, B. Chau, J.C. Sheffer, S. Rahmanian, E. Hare, V. Spasojevic, R. Horlick, D.J. King, P. Bowers, A general approach to antibody thermostabilization, *mAbs* 6(5) (2014) 1274-1282.
- [12] B. Colzani, L. Pandolfi, A. Hoti, P.A. Iovene, A. Natalello, S. Avvakumova, M. Colombo, D. Prosperi, Investigation of antitumor activities of trastuzumab delivered by PLGA nanoparticles, *Int J Nanomedicine* 13 (2018) 957-973.
- [13] J. Hernández-Jiménez, A. Martínez-Ortega, A. Salmerón-García, J. Cabeza, J.C. Prados, R. Ortíz, N. Navas, Study of aggregation in therapeutic monoclonal antibodies subjected to stress and long-term stability tests by analyzing size exclusion liquid chromatographic profiles, *Int J Biol Macromol* 118(Pt A) (2018) 511-524.
- [14] I. Suárez, A. Salmerón-García, J. Cabeza, L.F. Capitán-Vallvey, N. Navas, Development and use of specific ELISA methods for quantifying the biological activity of bevacizumab, cetuximab and trastuzumab in stability studies, *J Chromatogr B* 1032 (2016) 155-164.
- [15] S. Awwad, U. Angkawinitwong, Overview of Antibody Drug Delivery, *Pharmaceutics* 10(3) (2018) 83.
- [16] H. Liu, G. Gaza-Bulsecu, J. Sun, Characterization of the stability of a fully human monoclonal IgG after prolonged incubation at elevated temperature, *J Chromatogr B* 837(1-2) (2006) 35-43.
- [17] W. Wang, S. Nema, D. Teagarden, Protein aggregation—Pathways and influencing factors, *Int J Pharm* 390(2) (2010) 89-99.



Conclusiones

Conclusiones

En esta apartado se recogen de nuevo las conclusiones que han derivado de cada uno de los capítulos, y que han sido ya incluidas en los mismos. También se exponen las conclusiones generales de la presente Tesis Doctoral en base a los objetivos marcados.

1. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS

CAPÍTULO II

Aunque los anticuerpos son esenciales hoy en día en la lucha contra varias enfermedades importantes y son ampliamente utilizados, se sabe relativamente poco acerca de cómo la fotodegradación afecta a los mAbs comercializados. Dada la naturaleza compleja de los mAbs, es importante entender cómo los factores externos pueden afectarlos, sobre todo la acción de la luz a la cual se encuentra expuestos durante su manipulación y administración. Por lo tanto, este estudio investigó los efectos de la exposición a la luz sobre la formación de agregados en medicamentos comercializados, y en formas diluidas de los mismos de uso clínico, en los que el principio activo es un mAb. El estudio se llevó a cabo utilizando medicamentos autorizados que contienen BVZ, CTX, IFX, RTX y TTZ como su único principio activo. Aunque es bien sabido que la distribución del tamaño de los agregados probables es amplia, decidimos evaluar los que podrían detectarse mediante SEC, que son los órdenes de agregación inferiores pero que representan el punto de partida para el proceso de agregación. Los agregados inducidos por la luz no son dímeros naturales, ya que son el resultado de un proceso de agresión, y su detección es un signo de la degradación de los mAbs.

Conclusiones

El perfil de agregación de BVZ antes de la exposición a la luz obtenido por SEC, tanto en los medicamentos como en las dos formas diluidas, ya indica la presencia de agregados. Por lo tanto, la detección de agregados no pudo atribuirse directamente a la concentración del medicamento Avastin (25 mg/mL de BVZ, la concentración más alta de los cinco medicamentos), ya que estaban presentes en porcentajes similares cuando el medicamento se diluyó a 5 mg/mL y 2 mg/mL; esto sugirió la presencia de agregados naturales (dímeros probablemente) de BVZ.

La exposición a la luz indujo la formación de agregados en todas las muestras, tanto en medicina como en sus diluciones. Siguiendo las indicaciones del fabricante de la columna, los agregados podrían identificarse como dímeros ya que no se detectaron otros picos cromatográficos en los tiempos de retención más cortos. Excepto en el caso de BVZ, la fragmentación del mAb, que se detectó en los medicamentos y formas diluidas, fue probablemente el resultado de la ruptura del puente de disulfuro entre las dos cadenas pesadas.

La formación de agregados debido a la fotodegradación parecía estar relacionada sobre todo con la concentración inicial de mAb en el caso de los medicamentos; sin embargo, las características particulares de los mAbs también influyen en este proceso de descomposición de proteínas, que podría verse afectado por la presencia de aditivos en el medicamento. De esta forma, el medicamento BVZ (25 mg/mL) fue el más afectado por la agregación y los medicamentos TTZ (15 mg/mL) e IFX (10 mg/mL) fueron los menos afectados; los medicamentos CTX (5

Conclusiones

mg/mL) y RTX (10 mg/mL) se vieron afectados pero de forma intermedia.

Cuando los mAb se estudiaron en concentraciones idénticas para estudiar el proceso en condiciones experimentales comparables, es decir, en las dos formas diluidas a 5 mg/mL y 2 mg/mL, el proceso de agregación no se vio afectado por la concentración, con todos los mAb obteniendo resultados idénticos a excepción de IFX, que parecía más resistente a la agregación en la concentración más baja de 2 mg/mL. Si comparamos los resultados para los diferentes mAbs, BVZ, CTX y RTX se comportaron de manera similar, al igual que IFX a una concentración de 5 mg/mL. Los resultados indican que TTZ es el más resistente a la formación de agregados inducidos por la luz. Todo esto sugiere que sus propiedades estructurales intrínsecas jugarían un papel importante en la agregación inducida por la luz.

En general, los espectros ultravioleta para monómeros y agregados fueron muy similares para los cinco mAbs que estudiamos, compartiendo los mismos máximos de absorción. La formación de agregados no promovió, por lo tanto, nuevas bandas de absorción en los espectros ultravioleta. Hubo una tendencia común en la evolución de los espectros ultravioleta de los monómeros que tendían hacia los espectros de los agregados. Esto sugirió que los monómeros experimentan algún tipo de degradación química que los “acerca” a las entidades superiores de agregación. El análisis de los espectros ultravioleta-visibles en todos los casos confirmó que la fotodegradación no promovía cambios químicos que afectaran significativamente los espectros de absorción UV. Los análisis de similitud también corroboraron los altos niveles de

Conclusiones

similitud entre los espectros para los monómeros y los agregados antes de que se detectara la turbidez.

Finalmente, y como dato de gran interés, este estudio muestra que los cinco medicamentos y sus diluciones utilizados en la práctica clínica diaria se ven afectados por la exposición a la luz debido que promueve la agregación de proteínas. Aunque el estudio realizado aquí se realizó en condiciones extremas de exposición a la luz, indicó que estos medicamentos y sus formas diluidas deben manejarse con cuidado y protegerse de la luz del día en todas las situaciones para evitar riesgos innecesarios. La evaluación de la formación de estos agregados solubles debería ser un aspecto importante a estudiar cuando se determinen fechas de uso fuera de las indicadas por los fabricantes.

CAPÍTULO III

Esta investigación ofrece un estudio en profundidad del proceso de agregación en disoluciones clínicas de los cinco mAbs terapéuticos más utilizados en todo el mundo. Los estudios se llevaron a cabo en sus formulaciones medicas innovadoras, es decir, BVZ empleando Avastin®, CTX empleando Erbitux®, IFX empleando Remicade®, RTX empleando Mabthera® y TTZ empleando Herceptin®. Los perfiles de agregación cromatográficos obtenidos por (SE)HPLC-DAD fueron utilizados para este propósito.

En primer lugar, se obtuvieron perfiles de agregación SEC de control y se caracterizaron en condiciones que aseguran que los mAbs se encuentran en un estado activo óptimo, tal como los suministra el

Conclusiones

fabricante, en la formulación del medicamento y también en diversas diluciones de uso clínico. Para lograr esto, el perfil de agregaciones SEC de control se registró dentro de la fecha de vencimiento indicada por el fabricante con muestras preparadas y manipuladas según lo indicado en las especificaciones técnicas del medicamento. Se sometieron alícuotas de los medicamentos a estudios de degradación forzada (estrés) por elevación de temperatura, medios oxidativos, ácidos y básicos. Como se esperaba, todos los mAbs sufrieron degradación que dio como resultado tanto la agregación como la ruptura de las cadenas de proteínas. Dado que las condiciones de estrés se aplicaron durante el mismo período de tiempo a todas las muestras, las más afectadas fueron las que estaban más diluidas, es decir, las muestras diluidas de IFX 0,5 y 2 mg/mL y RTX 1 y 4 mg/mL. A estas concentraciones más bajas, ambos mAb se comportaron de manera similar cuando se sometieron a estrés, con la detección de agregados después de 24 horas de calentamiento a 50 °C, la supresión del perfil de SEC cuando se sometió a medios de estrés ácido y básico, y principalmente la agregación en medios oxidativos. BVZ, en forma de medicamento, que además se corresponde con la disolución más concentrada de las estudiadas, (25 mg/mL), sufrió agregación en todas las condiciones de estrés aplicadas, excepto cuando se somete a temperaturas de 50 °C donde el perfil de SEC permanece comparable al control, indicando por tanto, gran resistencia a la degradación térmica. CTX, estudiado en el medicamento Erbitux®, fue el único mAb que mostró un pico claro en el perfil SEC atribuido a la ruptura de las cadenas de proteínas y se detectó en todos los estudios de estrés. Los resultados en el caso de TTZ (Herceptin®) parecen indicar dimerización en todas las condiciones de degradación ensayadas.

Conclusiones

CAPÍTULO IV

Los resultados del estudio de estabilidad durante 15 días de los medicamentos biotecnológicos una vez abiertos y sus diluciones en condiciones de uso hospitalario indicaron que BVZ (Avastin® 25 mg/mL), RTX (Mabthera® 10 mg/mL y las diluciones a 1 y 4 mg/mL) y TTZ (Herceptin® 21 mg/mL) mostraron gran estabilidad cuando se almacenaron a 4° C protegidos de la luz, sin signos de agregación en los perfiles SEC. También fueron robustos cuando las muestras almacenadas a -20 °C se sometieron a tres ciclos de congelación-descongelación a lo largo del tiempo. IFX también fue estable cuando se almacenó a 4 °C y cuando se sometió a tres ciclos de congelación-descongelación tanto en forma de medicamento como en disoluciones diluidas a 2 mg/mL. Sin embargo, las disoluciones más diluidas a 0,5 mg/mL mostraron una tendencia a agregarse en el último día de prueba (día 15). CTX (Erbix®) fue claramente el más inestable, con un nuevo pico detectado en el perfil SEC desde el segundo día de prueba y desde el primer ciclo de congelación-descongelación; este pico no es el resultado de la agregación, sino de la ruptura de las cadenas de proteínas. Estos resultados aquí expuestos contribuyen a evaluar la posible reutilización del de los excedentes de estos medicamentos en los hospitales, ya que los agregados deben ser uno de los primeros problemas que deben controlarse debido a los episodios peligrosos que pueden ser causados por la inmunogenicidad inducida.

Conclusiones

CAPÍTULO V

El presente estudio demostró el potencial de dos estrategias diferentes para la evaluación de la funcionalidad del CTX en el medicamento Erbitux®. Así mismo, el empleo de la técnica de dicroísmo circular acoplada a un dispositivo de temperatura variable permitió evaluar la degradación térmica de CTX, asociándola a cambios en la estructura secundaria. Con este estudio, se ha demostrado que el aumento de la temperatura genera un cambio conformacional irreversible en la estructura del CTX, lo que lleva a un despliegue de la misma a la temperatura de 70 °C. Esta estrategia permitió seleccionar unas condiciones térmicas de degradación adecuadas para evaluar los métodos de análisis de la funcionalidad del CTX.

Con respecto a la valoración funcional mediante cultivos celulares, la línea celular SW480 ha demostrado ser sensible a la presencia en el medio del medicamento Erbitux®, por lo que se propone como la base para evaluar la funcionalidad de CTX.

En cuanto a los resultados de los estudios de estabilidad en el tiempo mediante los ensayos con la línea celular SW480 y el ELISA, estos indicaron una disminución de la funcionalidad del medicamento Erbitux® tras las 24/48 horas de su apertura y almacenamiento protegido de la luz refrigerado a 4 °C. La disminución de la funcionalidad así como la tendencia de la misma fue similar por ambos procedimientos. Estos es, se produjo importante caída de la funcionalidad a las 24 horas de almacenamiento, la cual se acentuó a las 48 horas, llegando a ser del 57 % cuando se evaluó el crecimiento de la línea celular y del 40% de

Conclusiones

pérdida de capacidad de unión a la proteína a la que va dirigida su acción terapéutica, el EGF.

Estos resultados indican por tanto que el almacenamiento del medicamento Erbitux® protegido de la luz y a 4 ° C una vez abierto, no conserva plenamente su funcionalidad, evaluada mediante ELISA y pruebas de crecimiento celular específicas. La funcionalidad se mantiene alrededor del 50%. Esta pérdida de funcionalidad se atribuyó a la alteración/degradación de las cadenas proteicas detectada mediante (SE)HPLC-DAD.

CAPÍTULO VI

En este trabajo se volvió a demostrar la potencialidad del empleo conjunto de la técnica ELISA y de estudios basados en inhibición del crecimiento de líneas celulares para evaluar la funcionalidad de mAbs terapéuticos comerciales, concretamente del TTZ en el medicamento Herceptin®. Junto a estas dos técnicas, el dicroísmo circular permitió aportar información valiosa sobre estabilidad térmica de la proteína terapéutica, siendo de interés los resultados en el contexto del desarrollo del método basado en el crecimiento de las líneas celulares.

En cuanto a la estabilidad de TTZ (Herceptin®), los resultados mediante DC sugirieron que presenta una estructura colaborativa, contribuyendo toda la estructura al mantenimiento de la conformación hasta una determinada temperatura, a partir de la cual se produce el desplegamiento “brusco” de la estructura con aparición de agregación visible (a 75 °C).

Conclusiones

En cuanto a la evaluación funcional a través del uso del cultivo celular, la línea celular SKBR3 fue sensible a la presencia de Herceptin® en el medio de cultivo y, por lo tanto, se propone como base para el estudio de la funcionalidad de TTZ en aquellos fármacos en los que puede estar presente este mAb terapéutico.

Los resultados obtenidos en los estudios de estabilidad en el tiempo con la línea celular SKBR3 y ELISA fueron bastante coherentes entre sí, a pesar de basar sus estrategias en fundamentos muy diferentes. En ambos casos, se demostró que TTZ (Herceptin®) es estable una vez abierto el vial, almacenado refrigerado a 4 °C y protegido de la luz hasta las 48 horas, tras lo cual ambas metodologías indicaron una considerable disminución de la funcionalidad (del 40% con las líneas celulares y del 35% con ELISA), con tendencia a recuperar los valores iniciales en el caso de los ensayos con la línea celular, y manteniéndose en un 75% en los estudios realizados con el inmunoensayo ELISA.

Por lo tanto, estos resultados sugieren que el almacenamiento del medicamento Herceptin®, protegido de la luz y a 4 °C después de su apertura, preserva la funcionalidad durante las primeras 24 horas; a partir de ese tiempo, disminuye, aunque manteniéndose alrededor del 75% en los datos de actividad biológica, y prácticamente recuperando funcionalidad por inhibición de la línea celular SKBR3. Estos datos, junto con los obtenidos en el estudio de estabilidad similar evaluado mediante (SE)HPLC-DAD, ponen de manifiesto una muy buena estabilidad del medicamento una vez abierto las primeras 24/48 horas, e incluso un aceptable mantenimiento de la misma hasta tres semanas.

Conclusiones

2. CONCLUSIONES GENERALES

Se ha desarrollado y validado un método de cromatografía líquida de alta resolución con detección por diodos en fila para el estudio del proceso de agregación (y fragmentación) de los 5 anticuerpos monoclonales terapéuticos seleccionados. Este método ha demostrado su potencialidad en estudios de degradación acelerada y estudios de estabilidad en el tiempo.

La degradación acelerada por el efecto de la luz indujo la formación de agregados de bajo orden en los 5 mAbs en sus medicamentos. La luz por tanto es un factor que induce y promueve la degradación por formación de agregados no naturales. Esto ha de tenerse en cuenta a la hora de la manipulación de estos medicamentos y de sus diluciones y preparaciones farmacéuticas.

En cuanto a la degradación acelerada por factores tales como presencia de medio ácido, básico, oxidante y efecto de una temperatura de 50 °C, no se demostró un comportamiento similar en todos ellos, a pesar de compartir una estructura de IgG1. Los más robustos frente a la degradación parecieron ser BVZ y TTZ. Las diferentes fortalezas que manifestaron frente a la degradación se atribuyeron a las diferentes concentraciones a las que están formulados. Cuanto mayor es la dilución, mayor es la degradación, tal y como es esperado.

Desde el punto de la formación de agregados de bajo orden y fragmentos, se comprobó una alta estabilidad de Avastin® (BVZ), Remicade® (IFX), Mabthera® (RTX) y Herceptin® (TTZ) cuando se

Conclusiones

almacenaron refrigerados a 4 °C, protegidos de la luz y tras la apertura de los correspondientes viales, salvo en el caso del medicamento Erbitux® (CTX), en el cual tras las primeras 24 horas se detectaron evidencias de alteraciones por fragmentación.

CTX (Erbitux®) y TTZ (Herceptin®) mostraron diferente estabilidad funcional en el tiempo cuando se almacenaron refrigerados a 4 °C, protegidos de la luz y tras la apertura de los correspondientes viales, evaluada mediante ensayos de inhibición de líneas celulares y mediante inmunoensayos ELISA. CTX fue inestable a partir de las primeras 24 horas mientras que TTZ mostró gran estabilidad.