

UNIVERSIDAD DE GRANADA



ANALYTICAL STRATEGIES FOR THE
STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF
MONOCLONAL ANTIBODIES AND FUSION
PROTEINS USING MASS SPECTROMETRY

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Farmacia

Facultad de Ciencias

Departamento de Química Analítica

Raquel Pérez Robles

Granada, enero 2020

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Raquel Pérez Robles
ISBN: 978-84-1306-446-8
URI: <http://hdl.handle.net/10481/59769>

Part of this PhD Thesis has been developed during an international research stay period (3 month) in the National Institute for Bioprocessing Research and Training (NIBRT), Dublin, Ireland. The name of the project carried out is Quantitative Accuracy of Monoclonal Antibodies Characterization across the Different Domains of Analysis. In this PhD Thesis are recorded part of the work done during the research stay (Chapter 3).

Supervisor of the International research stay

Dr. Jonathan Bones

National Institute for Bioprocessing Research and Training, NIBRT.

Dublin, Ireland.

PhD Thesis reviewers

Dr. Florian Füssl

National Institute for Bioprocessing Research and Training, NIBRT.

Dublin, Ireland.

Dr. Cédric Delporte

University of Brussels, Faculty of Pharmacy.

Brussels, Belgium.

A los pilares de mi vida

Agradecimientos

Hace cuatro años me embarqué en un proyecto que no estaba enmarcado en lo que yo pensaba que iba a ser mi futuro, hacer un Doctorado. Cuando estudiaba mi carrera de Licenciatura en Química, recuerdo que le comentaba a mi compañera y amiga Mónica lo ideal que sería el llegar al grado máximo de estudios en nuestra disciplina pero siempre lo vi muy lejano. A pesar de todo eso, al final el destino puso en mi camino la oportunidad de realizar el Doctorado y la cogí sin dudarlo. Ha sido un tiempo duro, lleno de altibajos que han contribuido a que sea la persona que soy a día de hoy. Tener el título de Doctor no solo te aporta conocimientos, si no que te cambia y te hace crecer como persona.

Al ver finalizado tanto trabajo es inevitable auto felicitarse y sentirse realizado, sin embargo muchas son las personas que han hecho posible que este proyecto se haya llevado a cabo. Quiero que sepan lo agradecida que estoy y no quiero terminar sin dedicarles unas palabras.

En primer lugar agradecer a mis directores de Tesis Doctoral: la Dra. Natalia Navas Iglesias y el Dr. Luis Cuadros Rodríguez por la oportunidad dada de iniciar mi carrera investigadora. Ambos me han recibido siempre con cariño y me han ayudado en todo lo que he requerido. Sois un ejemplo de constancia, perseverancia y calidad científica.

Quiero agradecer a las personas que forman parte del laboratorio donde he realizado la Tesis Doctoral. Agradezco al Dr. Antonio González Casado por los ratitos de charla en el laboratorio y por comprenderme tantas veces. A mis compañeros de Laboratorio Lucía, Ana, Fidel y Sandra, quiero agradecer tantos ratos de risas, de debates y de "arreglar el mundo" con nuestras conversaciones. Han sido de gran apoyo en momentos difíciles. A Jesús por compartir sus conocimientos sobre ELISA conmigo y por los momentos de risas.

Quiero agradecer al Dr. Jonathan Bones del National Institute for Bioprocessing Research and Training (Dublín, Irlanda) por aceptarme en su laboratorio durante mi estancia Doctoral. A la Dra. Sara Carrillo, la Dra. Amy Farrell, Dr. Florian Füssl y a Craig Jakes por toda la ayuda prestada durante la ejecución del proyecto que allí realice y por compartir sus conocimientos conmigo. A la Dra. Noemí Dorival por ayudarme haciendo que me encontrara como si no estuviera lejos de casa. Quiero agradecer a todos los integrantes del 'Characterisation and Comparability Laboratory'

por tan buen acogimiento y por hacerme sentir una integrante más del grupo. Nunca olvidaré lo vivido en Dublín, ahí empezó a crecer una de las historias más bonitas de mi vida.

Quiero agradecer a mis padres María Virtudes y Manuel, por todos los sacrificios que han hecho por mí, que no han sido pocos, sin ellos nada de esto hubiera sido posible. Habéis hecho de mi la persona que soy a día de hoy, siempre habéis sido mi ejemplo a seguir y jamás me habéis quitado un sueño de la cabeza, habiéndolos hecho siempre realidad, costase lo que costase. Agradecer a mis Hermanos por estar ahí y por escucharme cuando lo he necesitado.

Quiero dar las gracias a mi compañero de vida, Javier. A pesar de haber llegado a mi vida en la segunda mitad de mi Tesis Doctoral, sin todo su apoyo no hubiera aguantado todo lo que conlleva esta etapa de mi vida. Es mi gran apoyo, la persona con la que soy yo y no tengo que esconderme de nada. Jamás hubiera podido elegir mejor.

Dar las gracias a los proyectos financiados por el Instituto de Salud Carlos III FIS PI010-00201 y FIS PI17-00547 (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades; Fondos de Investigación en Salud,) y los proyectos con la empresa Farmacéutica Rovi S.A. por toda la financiación de mi Tesis Doctoral.

Agradecer a la Unidad de Farmacia Hospitalaria del Hospital Clínico San Cecilio de Granada por todas las muestras de medicamentos cedidos. Gracias por vuestra buena disposición.

ÍNDICE

ACRÓNIMOS	19
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS / HYPOTHESIS AND AIMS	23
RESUMEN / ABSTRACT	29
INTRODUCCIÓN	37
1. MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS	39
1.1. Definición y características de los medicamentos biotecnológicos. Diferencias con los medicamentos de origen químico	39
1.2. Clasificación de los medicamentos biotecnológicos	43
1.3. Marco legal de los medicamentos biotecnológicos	44
1.4. Gasto farmacéutico en medicamentos biotecnológicos	45
2. ANTICUERPOS MONOCLONALES TERAPÉUTICOS	46
2.1. Definición	46
2.2. Estructura y tipos de mAb terapéuticos IgG1	47
2.3. Modificaciones postrasduccionales	50
2.4. N-Glicosilación	54
3. PROTEÍNAS DE FUSIÓN Fc	57
3.1. Características y estructura	57
3.2. Ventajas que presentan las proteínas de fusión Fc.....	58
3.3. Modificaciones postrasduccionales en proteínas de fusión Fc.....	59

4. MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS ESTUDIADOS	60
4.1. Aflibercept	60
4.1.1. Características y mecanismo de acción	60
4.1.2. Forma farmacéutica, composición y excipientes	62
4.2.3. Aplicaciones.....	63
4.2. Bevacizumab	63
4.2.1. Características y mecanismo de acción	63
4.2.2. Forma farmacéutica, composición y excipientes	64
4.2.3. Aplicaciones.....	65
4.3. Cetuximab	65
4.3.1. Características y mecanismo de acción	65
4.3.2. Forma farmacéutica, composición y excipientes	66
4.3.3. Aplicaciones	66
4.4. Infliximab	67
4.4.1. Características y mecanismo de acción	67
4.4.2. Forma farmacéutica, composición y excipientes	67
4.4.3. Aplicaciones	68
4.5. Rituximab	69
4.5.1. Características y mecanismo de acción	69
4.5.2. Forma farmacéutica, composición y excipientes	70
4.5.3. Aplicaciones	70
4.6. Trastuzumab	71
4.6.1. Características y mecanismo de acción	71
4.6.2. Forma farmacéutica, composición y excipientes	71
4.6.3. Aplicaciones	71

5. HERRAMIENTAS ANALÍTICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE mAb Y PROTEÍNAS DE FUSIÓN	72
5.1. Cromatografía de líquidos.....	73
5.1.1. Modos cromatográficos no desnaturizantes	74
5.1.1.1. <i>Cromatografía de exclusión molecular</i>	74
5.1.1.2. <i>Cromatografía de intercambio iónico</i>	76
5.1.1.3. <i>Cromatografía de interacción hidrofóbica</i>	77
5.1.2. Modos cromatográficos desnaturizantes	78
5.1.2.1. <i>Cromatografía de fase inversa</i>	78
5.1.2.2. <i>Cromatografía de interacción hidrofílica</i>	80
5.2. Espectrometría de masas	81
5.2.1. Enfoques analíticos en el análisis de mAb y proteínas de fusión Fc mediante espectrometría de masas	83
5.2.2. Tratamiento de datos de espectrometría de masas procedentes del análisis de mAb y proteínas de fusión Fc	85
5.2.3. Ionización mediante láser asistida por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo	86
5.2.4. Ionización mediante electroespray acoplada a un analizador de alta resolución Orbitap	88
5.4. Quimiometría	91
 REFERENCIAS	 98

CÁPITULO 1. Method for the comparison of complex matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectra. Stability of therapeutical monoclonal antibodies	111
1.1. Introducción al capítulo 1	113
1.2. Recursos	114
Artículo científico:	
Method for the comparison of complex matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectra. Stability of therapeutical monoclonal antibodies	117
1.3. Conclusiones	143
CÁPITULO 2. Development and validation of a (RP)UHPLC UV (HESI/Orbitrap)MS method for the simultaneous quantification and identification of mixtures of intact therapeutical monoclonal antibodies using a monolithic column	145
2.1. Introducción al capítulo 2	147
2.2. Recursos	149
Artículo científico:	
Development and validation of a (RP)UHPLC UV (HESI/Orbitrap)MS method for the simultaneous quantification and identification of mixtures of intact therapeutical monoclonal antibodies using a monolithic column	153
2.3. Conclusiones	184
CÁPITULO 3. Comparing different domains of analysis for the characterisation of N-glycans on monoclonal antibodies	187

3.1. Introducción al capítulo 3	189
3.2. Recursos	190
Artículo científico:	
Comparing different domains of analysis for the characterisation of N-glycans on monoclonal antibodies	195
3.3. Conclusiones	245
CÁPITULO 4. Charge variant analysis of Ziv-aflibercept by cationic exchange liquid chromatography: comparison between volatile and non-volatile salts in the mobile phase	247
4.1. Introducción al capítulo 3	249
4.2. Recursos	250
Artículo científico:	
Charge variant analysis of Ziv-aflibercept by cationic exchange liquid chromatography: comparison between volatile and non-volatile salts in the mobile phase	253
4.3. Conclusiones	280
COMUNICACIONES A CONGRESOS DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL / CONGRESS PRESENTATIONS DERIVED FROM THE DOCTORAL THESIS	281
ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS A LA TESIS DOCTORAL / COMPLEMENTARY STUDIES	285
CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS / FINAL CONCLUSIONS AND FUTURE PROSPECTS	289

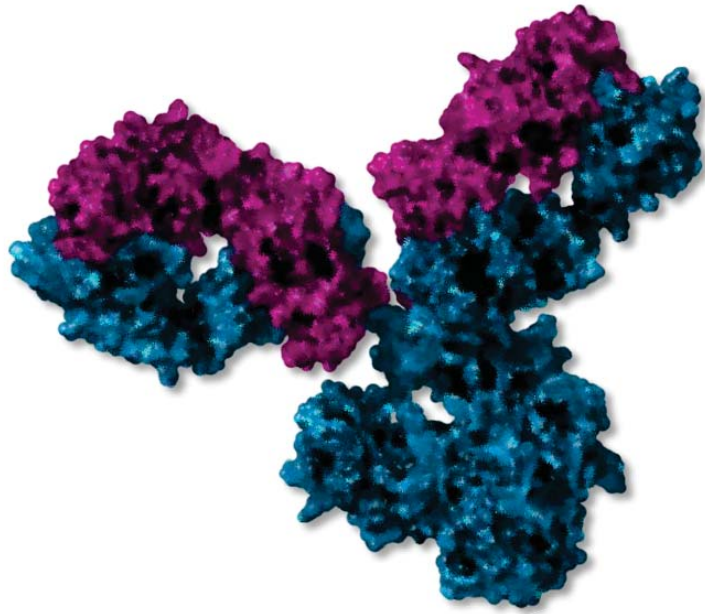
ACRÓNIMOS

(HILI)HPLC	Cromatografía de interacción hidrofílica de altas prestaciones
(IXC)HPLC	Cromatografía de intercambio iónico de altas prestaciones
(SE)HPLC	Cromatografía de exclusión molecular de altas prestaciones
ADCC	Citotoxicidad dependiente de anticuerpos (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
AXC	Cromatografía de intercambio aniónico
AFL	Aflibercept
ANOVA	Ánalysis de la varianza
APCI	Ionización química a presión atmosférica
Arg	Arginina
Asn	Asparragina
BC	Índice de similitud Bray-curtis
BEV	Bevacizumab
CCRM	Cáncer colorrectal metastásico
CD20	Cluster of differentiation 20
CDC	Citotoxicidad dependiente del complemento (Complement dependent cytotoxicity)
CDR	Regiones determinantes del complemento (Complementary determining region)
Células CHO	Células de cáncer de ovario de ratón
Células HEK	Células embrionarias de riñón
Células NSO	Células hibridoma
CXC	Cromatografía de intercambio cationico
CH ₁	Primer dominio de la cadenas pesadas
CH ₂	Segundo dominio de la cadenas pesadas
CH ₃	Tercer dominio de la cadenas pesadas
CHMP	Committee for Human Medicinal Products
C _L	Región constante de las cadenas ligeras

COS	Coseno
CTX	Cetuximab
Cys	Cisteína
DART	Análisis directo en tiempo real
DC	Dicroísmo circular
DESI	Ionización por desorción con electrospray
DLS	Dispersión dinámica de la luz
DMAE	Degeneración macular asociada a la edad
DoE	Diseño estadístico de experimentos
DTT	Ditiotreitol
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EMA	Agencia Europea del Medicamento
ESI	Ionización mediante electrospray
FA	Ácido fórmico
Fab	Región variable
Fc	Region constante
FcRn	Receptor Fc neonatal
FDA	Food and Drugs Administration
FWHM	Resolución de pico a media altura
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
HCA	Análisis jerárquico de agrupamientos
HCCA	α -ciano-4-hidroxi- <i>trans</i> -cinámico
HER-2	Receptor del factor de crecimiento 2
HESI	Ionización de electrospray asistido con calor
HIC	Cromatografía de interacción hidrofóbica
HILIC	Cromatografía de interacción hidrofílica
His	Histidina
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
ICH	International Conference on Harmonisation
IT-FS	Espectroscopia de fluorescencia intrínseca de triptofános

IXC	Cromatografía de intercambio iónico
IgG	Inmunoglobulina de tipo G
INF	Infliximab
kDa	Kilo dalton
Lys	Lisina
mAb	Anticuerpo monoclonal
MALDI	Ionización mediante láser asistida por matriz
MANOVA	Análisis multivariante de la varianza
Met	Metionina
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas de alta resolución en tándem
PC	Componente principal
PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Análisis de regresión en componentes principales
PIGF	Placental growth factor
PLS-DA	Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales
PLS-R	Análisis de regresión por mínimos cuadrados parciales
PSD	Post source decay
PMF	Huella dactilar peptídica (Peptide mass fingerprint)
PTM	Modificación postrasduccional
QTOF	Analizador de tiempo de vuelo
R ²	Coefficiente de determinación
RPC	Cromatografía de fase inversa
RTX/RIT	Rituxumab
SEC	Cromatografía de exclusión molecular
Ser	Serina
SIMCA	Análisis de modelado flexible independiente por analogía de clases
SVMR	Análisis mediante sistema de aprendizaje automático soportado por vectores
TCEP	Tris(2-carboxietil)fosfina
TFA	Ácido trifluoroacético

TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
TRA/TTZ	Trastuzumab
UV/Vis	Ultravioleta/visible
VEGF	Factor de crecimiento vascular
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento vascular
V _H	Región variable de las cadenas pesadas
V _L	Región variable de las cadenas ligeras
ziv-AFL	Ziv-aflibercept



Hipótesis y objetivos/Hypothesis and aims

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los anticuerpos monoclonales (mAb) y las proteínas de fusión son actualmente los biofármacos más usados en terapias oncológicas y autoinmunes. Han supuesto un gran avance en el ámbito farmacéutico y han permitido reducir la mortalidad y la morbilidad de los pacientes. La mayor parte del consumo de mAb terapéuticos y proteínas de fusión tiene lugar en el ámbito hospitalario. A pesar de su elevado precio, se producen importantes cantidades de sobrantes en los hospitales de este tipo de medicamentos –así como de sus preparaciones de uso clínico–, ya que se administran por peso de paciente. La estabilidad indicada por las empresas farmacéuticas comercializadoras no va más allá de 24 horas en la mayoría de los casos. La reutilización de estos sobrantes contribuiría sin duda a la sostenibilidad de los Sistemas Públicos de Salud. Para reutilizar los sobrantes con total seguridad y eficacia para el paciente, es necesario estudiar la estructura y funcionalidad de estas complejas proteínas terapéuticas. Por tanto, se debe avanzar en el diseño de metodologías analíticas que permitan evaluar su calidad como fármaco.

HYPOTHESIS AND AIMS

Monoclonal antibodies (mAbs) and fusion proteins are currently the most important type of biodrugs used in cancer and autoimmune diseases. They represent an important step forward in the pharmaceutical field as they have reduced the mortality and morbidity of patients. Most mAbs and fusion proteins are consumed in hospitals. Although they are very expensive, large amounts of surplus biodrugs are discarded in hospitals due to the fact that they are supplied by patient weight and remain stable for a very short period once the vial is open (less than 24 hours according to the pharmaceuticals companies). The reuse of surplus medicines would undoubtedly produce savings so contributing to the sustainability of the Public Health System. In order to reuse the daily surplus in a way that is effective and completely safe for the patient, it is necessary to study their structure and functionality. Progress must therefore be made in the design and development of analytical methodologies which enable us to evaluate the quality of these surplus amounts as drugs.

Hipótesis y objetivos/ Hypothesis and aims

La hipótesis que sustenta los estudios realizados se basa en que *el empleo de tecnologías avanzadas de análisis basadas en la espectrometría de masas de alta resolución junto con la cromatografía de líquidos de ultra alta prestaciones permitirá estudiar los anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión. El estudio de estos permitirá valorar su calidad como fármaco. Además, el empleo de técnicas de análisis de datos multivariantes permitirá un estudio de datos complejos procedentes de los análisis de anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión.*

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, proyectos FIS PI010-00201 y FIS PI17-00547), mediante los cuales se está estudiando la estabilidad de sobrantes hospitalarios de anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión terapéuticas cuyo impacto económico en el Sistema Sanitario es elevado.

Los mAb estudiados han sido: bevacizumab, cetuximab, infliximab, rituximab y trastuzumab en sus medicamentos innovadores Avastín®,

Our research is based on the hypothesis that *The quality of monoclonal antibodies and fusion proteins can be studied using advanced analytical technologies based on high-resolution mass spectrometry coupled with ultra-high-performance liquid chromatography. The complex data produced by the analysis of the monoclonal antibodies and fusion proteins can be studied using multivariate data analysis techniques.*

The goals of this PhD Thesis fall within the objectives of two projects funded by the Institute of Health 'Carlos III'. (Ministry of Science, Innovation and Universities; Health Research Funds, projects FIS PI010-00201 and FIS PI17-00547). These projects focus on the stability of hospital-surplus therapeutic monoclonal antibodies and fusion proteins, which have a high economic impact on the Public Health System.

The target mAbs are: bevacizumab, cetuximab, infliximab, rituximab and trastuzumab in the medicines Avastín®, Erbitux®, Remicade®, Mabthera® and

Hipótesis y objetivos/ Hypothesis and aims

Erbix[®], Remicade[®], Mabthera[®] y Herceptin[®], respectivamente La proteína de fusión estudiada ha sido aflibercept en su medicamento original oncológico Zaltrap[®].

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es por tanto el desarrollo y validación de metodologías analíticas para el estudio de la calidad y de la estabilidad estructural de mAb y proteínas de fusión terapéuticas en condiciones de uso hospitalario. Estas metodologías se centran en el empleo de técnicas analíticas de espectrometría de masas de alta resolución, aunque no de forma exclusiva. También se hace uso de cromatografía de líquidos de altas prestaciones y de técnicas quimiométricas. De este objetivo general se derivan los objetivos específicos que se detallan a continuación.

1. Diseñar y aplicar herramientas quimiométricas específicas para el estudio de la estabilidad en el tiempo de mAb más allá de la fecha de caducidad indicada por el fabricante (Capítulo 1).
2. Desarrollar una metodología analítica basada en la cromatografía líquida de ultra altas prestaciones para la separación, identificación y cuantificación de mezclas formadas por los mAb bevacizumab, cetuximab, infliximab, rituximab y trastuzumab (Capítulo 2).
3. Caracterizar el perfil de isoformas de

Herceptin[®]. We will also study the fusion protein aflibercept in its original presentation as the oncological medicine Zaltrap[®].

The general aim of this PhD Thesis is therefore to develop and validate analytical methodologies for the study of the quality and structural stability of therapeutic mAbs and fusion proteins under hospital use conditions. These methodologies focus above all on the development of high-resolution mass spectrometry analytical techniques. Ultra-high-performance liquid chromatographic techniques and chemometric tools will also be used. This general aim encompasses the following more specific objectives:

1. To design and apply specific chemometric tools for studying the long-term stability of mAbs after the expiry date specified by the manufacturer (Chapter 1).
2. To develop an analytical methodology based on ultra-high-performance liquid chromatography for the separation, identification and quantification of mAbs mixtures i.e. bevacizumab, cetuximab, infliximab, rituximab and trastuzumab (Chapter 2).
3. To characterise the isoform profile of certain mAbs (bevacizumab,

Hipótesis y objetivos/ Hypothesis and aims

los mAb bevacizumab, cetuximab, infliximab, rituximab y trastuzumab, mediante espectrometría de masas de alta resolución (Capítulo 2).

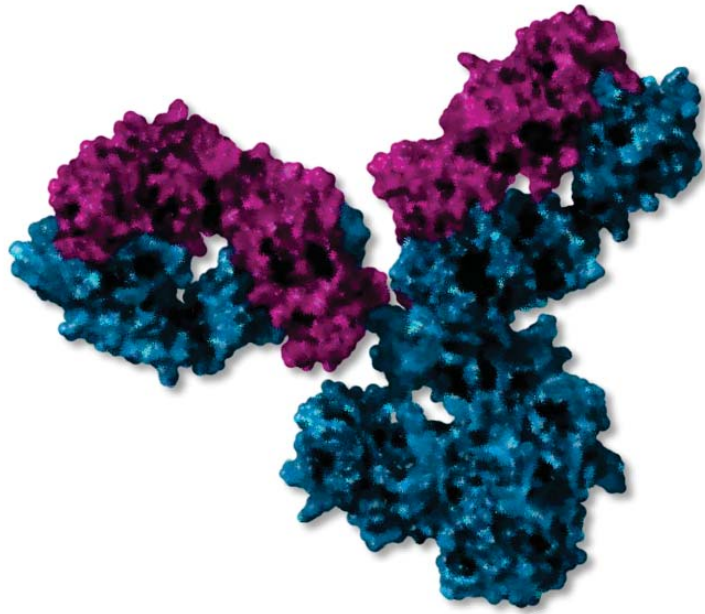
4. Determinar el perfil de N-glicosilación de los mAb bevacizumab, infliximab, rituximab y trastuzumab a partir de varias estrategias de análisis de proteínas ('top-down, 'middle-down" y 'bottom up') (Capítulo 3) realizando un estudio comparativo para determinar diferencias y similitudes entre ellas.

5. Estudiar la heterogeneidad de carga de la proteína de fusión aflibercept mediante el desarrollo de metodología basada en cromatografía de líquidos ultra altas prestaciones de intercambio catiónico (Capítulo 4).

cetuximab, infliximab, rituximab and trastuzumab) using high-resolution mass spectrometry (Chapter 2).

4. To determine the N-glycosilation profile of these mAbs (bevacizumab, infliximab, rituximab and trastuzumab) using different protein analysis strategies ('top-down, 'middle-down" and 'bottom-up') (Chapter 3).

5. To study the heterogeneity of the fusion protein aflibercept by developing an analytical methodology based on ultra-high-performance liquid chromatography (Chapter 4).



Resumen / Abstract

RESUMEN

En esta Tesis se han desarrollado y puesto a punto estrategias analíticas para la evaluación de aspectos que afectan a la calidad de mAb y proteínas de fusión mediante espectrometría de masas. Para alcanzar los objetivos propuestos se han realizado cuatro estudios experimentales que serán expuestos en cada uno los capítulos que la conforman. Los tres primeros estudios han sido desarrollados en el análisis de anticuerpos monoclonales y el último ha sido aplicado sobre una proteína de fusión.

En el primer capítulo se ha detallado una estrategia analítica para la comparación de espectros de masas complejos procedentes de las huellas dactilares peptídicas obtenidas mediante espectrometría de masas MALDI/TOF tras digestión enzimática. Para llevar a cabo la primera parte de la estrategia, se ha desarrollado una función matemática sobre Matlab, denominada "Protiago". Esta función realiza un pre-procesado de datos para que puedan ser analíticamente comparados mediante técnicas quimiométricas. Se ha aplicado el análisis de similitud y se ha desarrollado un nuevo índice llamado "Índice de proximidad". Para conocer la

ABSTRACT

In this PhD Thesis several analytical strategies were developed and optimised for the evaluation using mass spectrometry analysis of the quality of both mAbs and fusion proteins. To achieve the proposed goals, four experimental studies were performed, as described in the different chapters of this Thesis. The first three studies involved the analysis of mAbs and the fourth focused on a fusion protein.

The first chapter describes an analytical strategy for comparing complex mass spectra from the peptide mass fingerprint (PMF) obtained from MALDI/TOF mass spectrometry after enzymatic digestion. To carry out the first stage of the analytical strategy, a mathematical function called "Protiago", was developed on a Matlab environment. This function enables the data to be pre-processed so that it can be analytically compared using suitable chemometric techniques. Similarity analysis was also performed and a new index called "Nearness index" was proposed. Two exploratory data methods, principal component analysis (PCA) and multivariate analysis of

agrupación y la relación natural de los datos dos métodos exploratorios de datos han sido aplicados, análisis de componentes principales (PCA) y análisis multivariante de la varianza (MANOVA). Esta metodología ha sido aplicada a un estudio de estabilidad en el tiempo de los anticuerpos monoclonales infliximab y rituximab. Se ha podido comprobar que las modificaciones estructurales más importantes son causadas las primeras 24 horas.

El segundo estudio que se ha presentado es un método analítico que permite la separación, identificación y cuantificación de mAb terapéuticos en mezclas mediante un método de ultra altas prestaciones de cromatografía de líquidos en fase inversa, acoplada a dos sistemas de detección en línea, esto es, absorción en el ultravioleta y espectrometría de masas de alta resolución (RP)UHPLC-UV-(HESI/Orbitrap)MS. Se han analizado 5 mAb terapéuticos: bevacizumab, cetuximab, infliximab, rituximab y trastuzumab. El método se ha optimizado mediante la aplicación de diseño estadístico de experimentos (DoE). Mediante espectrometría de masas se han identificado y caracterizado el perfil de isoformas de los anticuerpos monoclonales

variance (MANOVA) were applied to help understand the natural relation and grouping and of the data. This methodology was applied in a study of the long-term stability of two marketed therapeutic mAbs, i.e. infliximab and rituximab. The most important structural changes took place during the first 24h of storage.

The second study involved an analytical method enabling the separation, identification and quantification of therapeutic mAbs in mixtures using a reverse phase ultra-high-performance liquid chromatographic methods coupled with two in-line detection systems, i.e. ultraviolet absorption and high-resolution mass spectrometry (RP)UHPLC-UV-(HESI/Orbitrap)MS.

Five mAbs were analysed: bevacizumab, cetuximab, infliximab, rituximab and trastuzumab. Separation was performed using a specific monolithic column and optimised by applying design of experiments (DoE). The isoform profile of the mAbs was identified and characterized by mass spectrometry. The method was validated for quantification using the ultraviolet absorption detector signal. The performance characteristics of the method were studied i.e. linearity, accuracy (precision and trueness),

estudiados. Tanto el método de detección por absorción en el ultravioleta como el método utilizando espectrometría de masas han sido validados mediante el estudio de determinados parámetros de calidad del método como linealidad, exactitud (precisión y veracidad), límites de detección y cuantificación y robustez. La identificación de los mAb fue también validada mediante la comparación de espectros obtenidos mediante un método de inyección directa en el espectrómetro de masas desarrollado en este trabajo. Se ha discutido el uso de diferentes modificadores de la fase móvil como son el ácido trifluoroacético y el ácido fórmico.

Como tercer trabajo se presenta un estudio comparativo aplicando diferentes enfoques analíticos ('top-down', 'middle-down' y 'bottom up') para la caracterización del patrón de N-glicosilación de cuatro anticuerpos monoclonales terapéuticos: bevacizumab, infliximab, rituximab y trastuzumab. Se han desarrollado diferentes métodos analíticos de cromatografía de líquidos de ultra altas prestaciones acoplada a espectrometría de masas de alta resolución. Los dominios de análisis son los siguientes: (i) proteína intacta usando condiciones desnaturalizantes y nativas; (ii) caderas

limits of detection and quantification and robustness. The intact isoform profile of each mAb was characterized and validated using direct-infusion MS. The advantages and disadvantages of the use of trifluoroacetic acid or formic acid as ion-pairing agents for mass spectrometric analysis and chromatographic separation were discussed.

The third chapter offers a comparative study of different analytical approaches ('top-down', 'middle-down' and 'bottom-up') for the characterization of the N-glycosylation pattern of four therapeutic mAbs, i.e. bevacizumab, infliximab, rituximab and trastuzumab. Several analytical methods using high performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry were compared. The different domains of analysis were: (i) intact mass analysis using denatured and native conditions; (ii) reduced mAb (heavy/light chain analysis); (iii) intact Fc region (gingipain digestion); (iv) single chain Fc analysis (IdeS digested subunits); (v) tryptic digestion based peptide mapping and released N-glycan analysis; and (vi) the N-glycans released from the protein part labelled with two different substances 2-AA and 2-AB. In order to choose the most

pesadas y ligeras (bajo condiciones reducidas); (iii) región Fc intacta (digestión con gingipain); (iv) cadenas simples de la región Fc (digestión con IdeS); v) proteína completa por mapeo peptídico (digestión con tripsina); y vi) los N-glicanos liberados de la parte proteica (marcados con dos sustancias diferentes, 2-AA y 2-AB). Los métodos han sido comparados entre sí en función de la calidad de información suministrada, el nivel de experiencia del analista, la instrumentación requerida para la preparación de muestra y el análisis de datos, la relevancia e idoneidad de los datos obtenidos para la caracterización estructural y la comparación lote a lote.

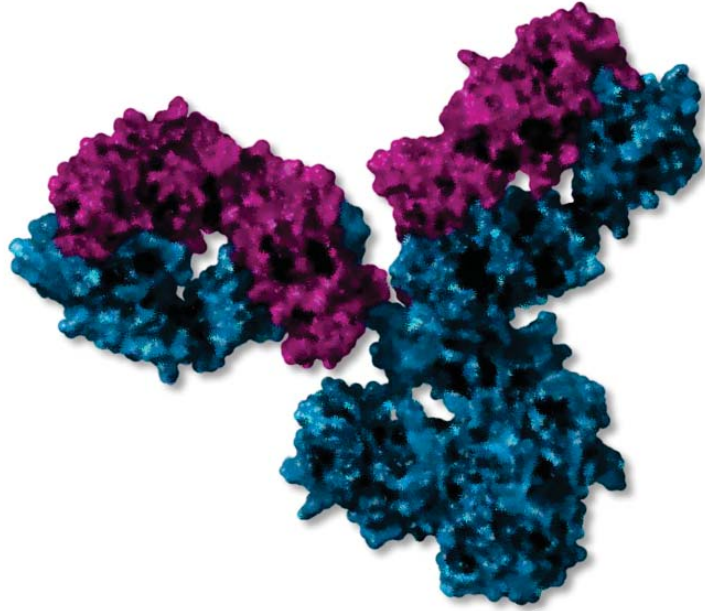
El último trabajo reúne un estudio comparativo entre dos estrategias de cromatografía de intercambio catiónico (CXC) para el análisis de las variantes de carga de la proteína de fusión ziv-afliberceptp (ziv-AFL). La primera estrategia usa sales volátiles en la composición de la fase móvil con el fin de acoplar el sistema cromatográfico con detección a espectrometría de masas de alta resolución, la otra estrategia usa sales no volátiles clásicas con fuerza iónica elevada mediante detección UV. Se aplicó DoE para ajustar las condiciones cromatográficas del primer método publicado de CXC

suitable technique for N-glycan analysis, the methods were compared in terms of the reliability of the information supplied, the level of experience of the analyst, the instrumentation required for sample preparation and data analysis, the relevance and suitability of the data obtained for structural characterization, and the batch-to-batch comparison.

The last investigation includes a comparison study between two cation exchange chromatography (CXC) strategies for charge variant analysis of the Fc-fusion protein ziv-aflibercept (ziv-AFL). One of the strategies uses volatile salts in the mobile phase in order to couple the chromatographic eluent to high resolution mass detection, and the other uses classical non-volatile salts with stronger ionic strength recording the UV signal. DoE was used to adjust the chromatographic conditions of the first published method of CXC coupled to high resolution mass detection to the charge variant analysis of ziv-AFL. The method using classical non-volatile salts was developed and optimized ad hoc. Fresh and controlled degraded samples were used to evaluate the capacity of both CXC strategies for detecting charge variants in ziv-AFL. CXC with non-volatile salts in the

acoplado a detección de espectrometría de masas de alta resolución para el análisis de las variantes de carga de ziv-aflibercept (ziv-AFL). El método que usa sales no volátiles fue desarrollado y optimizado en este trabajo. Tanto muestras frescas como estresadas de ziv-AFL se analizaron para evaluar la capacidad de ambas estrategias CXC para la detección de variantes de carga. La estrategia CXC que usa sales no volátiles en las fases móviles ha proporcionado una mejor detección de los perfiles de carga de ziv-AFL tanto en muestras frescas como estresadas que la estrategia que usa sales volátiles. Por otro lado, la complejidad de los datos generados mediante espectrometría de masas ha hecho imposible la identificación de variantes de carga de ziv-AFL.

mobile phase enabled better detection of charge variants in both fresh and degraded ziv-AFL samples than the method using volatile salts with lower ionic strength. In addition, the complexity of the mass spectra data generated made it impossible to identify the multicharge variant species of ziv-AFL.



Introducción

INTRODUCCIÓN

1. MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS

1.1. Definición y características de los medicamentos biotecnológicos. diferencias con los medicamentos de origen químico.

Los medicamentos biotecnológicos se pueden definir como *aquellos medicamentos biológicos producidos por técnicas de ADN recombinante o tecnología de hibridoma (en el caso de anticuerpos monoclonales) que se usa como fármaco o con propósitos de diagnóstico in vivo, el cual es producido en su totalidad o parcialmente por técnicas biotecnológicas modernas* [1]. Esta definición ubica a los medicamentos biotecnológicos como un grupo dentro de los medicamentos biológicos. Sin embargo, a día de hoy no existe a nivel mundial unanimidad en la definición y clasificación de medicamentos biotecnológicos y medicamentos biológicos. La autoridad regulatoria sanitaria de los diferentes países establece en cada caso la definición que aplicará [2].

En numerosas ocasiones se usa el término medicamento biotecnológico y biofármaco indistintamente, sin embargo son dos conceptos diferentes. El término biofármaco se refiere únicamente al principio activo del medicamento, sin embargo medicamento biotecnológico está formado por el principio activo que es el biofármaco y por todos sus componentes, es decir, tiene en cuenta la formulación del biofármaco.

En España, la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), bajo la coordinación de la Agencia Europea del Medicamento (EMA), es la encargada del seguimiento de los medicamentos biotecnológicos tanto para llevar a cabo el registro del medicamento como su correspondiente vigilancia en el mercado.

Los medicamentos biotecnológicos tienen características propias que los diferencian de los medicamentos procedentes de síntesis química a nivel de propiedades farmacológicas, uso clínico, aspectos regulatorios y seguridad, por lo que algunos conceptos de farmacología clásica no pueden ser aplicados directamente [3]. Las principales diferencias que existen entre los medicamentos biotecnológicos y los de síntesis química se pueden resumir en los siguientes puntos:

- ➔ **El componente activo de los medicamentos biotecnológicos es heterogéneo, por lo que su producción será más compleja que los fármacos de síntesis química.** Son sustancias terapéuticas que en su mayoría son de naturaleza proteica. El primer paso para su obtención es modificar el material genético de una célula (mamífero o microbiano) o un microorganismo introduciéndole la secuencia para que produzca la secuencia de la proteína. Estos procesos requieren etapas muy complejas que son claves para definir el resultado final, de manera que pequeños cambios pueden generar alteraciones clínicamente significativas en aspectos de bioseguridad y eficacia [4].

La complejidad de los procesos induce que estos fármacos no puedan replicarse de forma exacta (se producen modificaciones postraduccionales PTM, véase el apartado 2.4) de manera que su estructura y propiedades dependerán de los procesos elegidos, por lo que existirá un grado de variabilidad controlada y admitida por las autoridades sanitarias entre lotes del mismo fármaco.

- ➔ **Estructura molecular de mayor complejidad y tamaño que los de síntesis química.** En comparación con los medicamentos de origen químico, los medicamentos biotecnológicos están compuestos por estructuras moleculares grandes y a menudo complejas (<1000 Da). Para estudiar sus propiedades fisicoquímicas y funcionales, como la estructura molecular, las modificaciones de la misma y la actividad biológica, se emplean técnicas analíticas sofisticadas (por ejemplo, identificación genética, espectrometría de masas de alta resolución, etc. [5].
- ➔ **La estabilidad de los medicamentos biotecnológicos suele ser mucho menor que la de los medicamentos de origen químico.** Los medicamentos biotecnológicos tienen una estabilidad física y química menor ya que pueden sufrir procesos que modifican químicamente la estructura del principio activo, como por ejemplo son los procesos de oxidación, deamidación, ruptura de puentes disulfuro, etc. y procesos físicos que afectan a la estructura como son procesos de agregación, adsorción, precipitación, etc. Otro aspecto que los diferencia es la interacción con los componentes de la propia formulación farmacéutica [2].
- ➔ **Los medicamentos biotecnológicos pueden generar una respuesta de inmunogenicidad.** Es un riesgo a tener en cuenta en este tipo de medicamentos

mientras que en los de síntesis química es mínimo. La inmunogenicidad es un proceso por el que el ser humano genera respuesta frente a una proteína u otra sustancia que el organismo lo detecta como agente extraño, como no propio. La posibilidad de que se produzcan cambios químicos (modificaciones postrasduccionales) y físicos en la estructura conlleva posibilidad de originar respuesta inmune adversa en el paciente [6].

Hay numerosos factores que influyen a la inmunogenicidad. Entre los más importantes cabe destacar la presencia de modificaciones postrasduccionales, la secuencia de aminoácidos, la naturaleza proteica (las proteínas endógenas causan menos inmunogenicidad que las exógenas), el patrón de glicosilación, la pureza del medicamento, los excipientes, la dosis a la que se suministra el medicamento y la duración del tratamiento [7]. Por ejemplo, las proteínas de fusión causan menos inmunogenicidad que los anticuerpos monoclonales.

La inmunogenicidad representa un aspecto muy importante en la seguridad y eficacia del medicamento, de manera que existen directrices específicas que regulan este aspecto [8]. Principalmente, se asume que es imposible de caracterizar la posible respuesta de inmunogenicidad en ausencia de pruebas clínicas en humanos y esta respuesta sigue siendo el factor principal para el fracaso de medicamentos en pruebas pre-clínicas.

- ➔ **El número de pruebas control** a los que es necesario someter un medicamento biotecnológico son mucho mayores (~250 test) que a los que se somete un medicamento de síntesis química (40-50 test) [9,10].
- ➔ **Un gran número de fármacos de origen biotecnológico se administran por inyección o por infusión en medio hospitalario**, a diferencia de los de síntesis química [9].
- ➔ **Los medicamentos biotecnológicos son mucho más caros que los de síntesis química**, ya que su producción es mucho más compleja y hay pocas alternativas para que su producción sea más barata, aunque actualmente la incorporación de los medicamentos biosimilares ha venido a paliar este aspecto.
- ➔ **El estudio farmacocinético es más complejo**. Esta complejidad radica en la similitud que existe entre las proteínas procedentes del medicamento biotecnológico y las propias del organismo.

Introducción

Cuando se administra un medicamento biotecnológico no se conoce bien cuál es la cantidad de biofármaco que va a alcanzar el sitio de acción y cuáles son las consecuencias que se pueden derivar de ello. Algunos medicamentos biotecnológicos son similares a proteínas endógenas y, en principio, cabría esperar que sus efectos fueran parecidos. Sin embargo, esto no sucede así porque su mecanismo de acción puede diferir de las sustancias endógenas

En la Tabla I.1 se muestra un resumen de las principales diferencias que existen entre los medicamentos biotecnológicos y los de síntesis química.

Tabla I.1. Principales características diferenciales entre los medicamentos de origen biotecnológico y los procedentes de síntesis química [11].

Características	Medicamentos de origen biotecnológico	Medicamento de síntesis química
Estructura	Muy compleja. Mezclas heterogéneas	No muy compleja. Homogeneidad en los principios activos
Peso molecular	Alto (>50 kDa)	Bajo (<1 kDa)
Proceso de producción	A partir de células/ microorganismos vivos	Controlado. Pocos pasos críticos en su síntesis
Dosis	Dosis biológica óptima	Dosis máxima tolerada
Estabilidad	Baja, la mayoría de los casos es < 24 h	Alta
Curva dosis-respuesta	No lineal	Lineal
Mecanismo de acción	Variables / desconocidos	Conocidos, generalmente específicos
Eliminación	Por degradación	Por metabolización
Administración	Generalmente por vía parenteral	Usualmente vía oral
Inmunogenicidad	Muy alta	Baja
Costes	Mayores	Menores
Monitorización terapéutica	Compleja	Más simple
Medicamentos no innovadores	Biosimilares	Genéricos

1.2. Clasificación de los medicamentos biotecnológicos

Los medicamentos biotecnológicos pueden estar compuestos de péptidos, proteínas o ácidos nucleicos; y de acuerdo a su naturaleza química pueden dividirse en 3 grupos: i) ácidos nucleicos; ii) péptidos; y iii) proteínas [12]. El diagrama de la Figura I.1 muestra gráficamente esta clasificación.

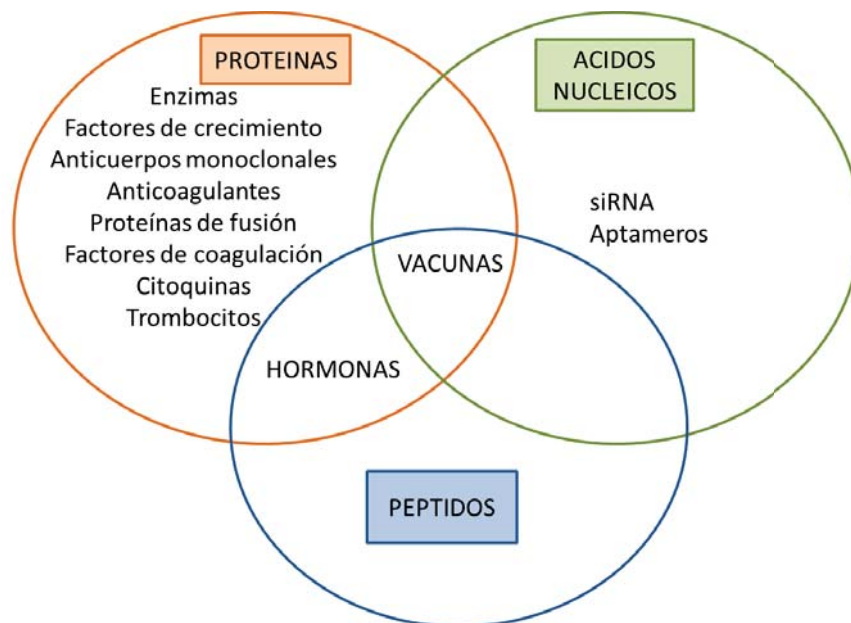


Figura I.1. Diagrama en el que se clasifican según su naturaleza los medicamentos biotecnológicos.

La clase de biofármacos que son ácidos nucleicos es una clase pequeña que comprende pocos biofármacos, pero su producción está en incremento [13,14].

En el grupo de las proteínas, los más importantes y más complejos son los anticuerpos monoclonales (mAb) y las proteínas de fusión. Estas últimas son de más reciente desarrollo. Las enzimas son otro grupo complejo que incluye proteínas como la α -galactosidasa, o la asparaginasa entre otras. En el caso de las hormonas, estructuralmente pueden estar formadas por una simple cadena de péptidos como el glucagón o la insulina, o por largas cadenas heterodiméricas de proteína como la hormona del factor de crecimiento [15,16]. En el grupo de los anticoagulantes se incluyen el factor VIII y el factor IX, que se emplean en el tratamiento de la hemofilia A y B respectivamente. Entre los factores de crecimiento podemos encontrar el factor de

crecimiento endotelial y proteínas osteogénicas como es la eptotermina- α , que se emplea en tratamientos de regeneración del hueso. Finalmente, las citoquinas actualmente en el mercado, se pueden dividir entre interleucinas e interferones.

Numerosas moléculas usadas para la prevención de enfermedades son clasificadas como vacunas. Pueden estar formadas por péptidos, ADN o proteínas recombinantes [17].

1.3. Marco legal de los medicamentos biotecnológicos

Al igual que ocurre con los medicamentos de síntesis química, a nivel europeo, la evaluación y autorización de los medicamentos biotecnológicos se realiza mediante requerimiento legal por la Agencia Europea del Medicamento (EMA). El procedimiento es efectuado en todos los países miembros de forma coordinada. Para la autorización se requiere un periodo largo de tiempo que concluye con la opinión científica del Comité de Medicamentos para Uso Humano (CHMP, *Committee for Human Medicinal Products*).

La EMA también regula la autorización (mediante procedimiento centralizado) de medicamentos biosimilares, es decir, medicamentos biotecnológicos equivalentes a otros ya autorizados y cuya patente ha expirado [18]. El procedimiento centralizado de autorización está recogido en Reglamento (EC) N°. 726/2004 [19].

La Tabla 1.2 reúne las directrices más relevantes aplicables a medicamentos biotecnológicos [11].

Tabla I.2. Directrices aplicables a los medicamentos de origen biotecnológico [11].

Título	Código
Producción y control de calidad de productos medicinales obtenidos por tecnología del ADN recombinante.	EMA 3AB1A [20]
Guía de especificaciones: procedimientos de ensayo y criterios de aceptación para productos biotecnológicos/biológicos.	ICH Q6B [21]
Derivatización y caracterización de sustratos celulares usados para producción de productos biotecnológicos/biológicos	ICH Q5D [22]
Calidad de productos biotecnológicos: análisis de la expresión creada en líneas celulares usadas para la expresión de r-ADN derivado de productos proteicos.	ICH Q5B [23]
Guía sobre productos biotecnológicos/biológicos sujetos a cambios en su proceso de fabricación.	ICH Q5E [24]
Calidad de productos biotecnológicos: Análisis de estabilidad de productos biotecnológicos/biológicos.	ICH Q5C [25]
Calidad de productos biotecnológicos: Evaluación de seguridad viral de productos biotecnológicos derivados de líneas celulares de origen humano o animal.	ICH Q5A [26]
Estudio de validación virus: diseño, contribución e interpretación de estudios de validación, inactivación, eliminación virus	EMA AB8A [27]
Producción y control de calidad de anticuerpos monoclonales	EMA 3AB4A [28] / CHMP/BWP/64/04 [29]
Producción y control de calidad de productos citoquinas obtenidos por procesos biotecnológicos.	EMA 3AB3A [30]
Uso de animales transgénicos en la fabricación de productos medicinales biológicos para uso humano.	EMA 3AB7A [31]
Medicamentos biológicos similares que contienen proteínas derivadas de biotecnología como sustancia activa: temas de calidad.	CHMP/49348/05 [32]
Medicamentos biológicos similares.	CHMP/437/04 [33]

1.4. Gasto farmacéutico en medicamentos biotecnológicos

Los medicamentos biotecnológicos han supuesto una revolución para el tratamiento de muchas enfermedades de gran prevalencia, que contaban con escasas alternativas terapéuticas. Sin embargo, es necesario tener en cuenta la considerable inversión en I+D+i y el elevado coste del complejo proceso de producción que supone el desarrollo de un nuevo medicamento biotecnológico, junto con el riguroso control de calidad que se debe llevar a cabo durante la producción del mismo, y el coste asociado a su distribución

El 20% de los medicamentos disponibles en el mercado son fruto del avance de la biotecnología, un campo sujeto a un proceso de constante y rápida evolución, del que

se benefician cerca de 350 millones de personas en el mundo [34]. Ha supuesto un crecimiento del 7,5% de los medicamentos biotecnológicos en detrimento de los medicamentos de síntesis química que ha sufrido un aumento del 5% [35].

En España se ha producido un crecimiento en el empleo de los medicamentos biotecnológicos de más de un 40%. En los últimos 20 años, estos medicamentos han ido teniendo un papel creciente en el tratamiento de muchas enfermedades, a pesar de que determinados precios son verdaderamente elevados, llegando a alcanzar costes de más 16.000 € anuales por paciente tratado, lo que supone muchas veces costes superiores al 120% de un tratamiento con un medicamento de síntesis química [36]. Así, y a pesar del elevado precio y el impacto creciente que tienen en la factura farmacéutica de los sistemas públicos de salud, un tercio de los nuevos medicamentos aprobados en los últimos años, son medicamentos biotecnológicos [36Error! Bookmark not defined.].

Interesante indicar que el principal gasto farmacéutico asociado a estos biofármacos se produce a nivel hospitalario, de ahí que la preparación y suministro de las dosis de la mayoría de los fármacos biotecnológicos se realiza directamente a nivel de farmacia hospitalaria, ya que de otro modo el gasto asociado al tratamiento sería mucho mayor.

2. ANTICUERPOS MONOCLONALES TERAPÉUTICOS

2.1. Definición

Un anticuerpo monoclonal (mAb) es *un anticuerpo homogéneo capaz de reconocer una parte del antígeno de forma específica, procedente de un único clon de células linfocitos B y diseñada para atacar a un antígeno concreto* [37]. Dicho clon procede de una célula híbrida originada de la fusión de una célula madre del sistema inmune y otra plasmática de tipo tumoral. Puesto que proceden de un único linfocito B, los mAb son idénticos entre sí por lo que presentan un alto grado de especificidad.

La respuesta inmunológica específica en el cuerpo humano se desarrolla cuando un organismo ha sido expuesto a uno o varios antígenos, originando una respuesta policlonal, es decir, la producción de anticuerpos contra un rango amplio de estructuras presentes en los antígenos. Por el contrario, la respuesta monoclonal se da por la

selección de un solo clon activado de linfocitos B, que produce un anticuerpo para un determinante antigénico único.

Hasta el momento, la EMA ha aprobado más de 70 mAb, 8 de ellos destinados a diagnóstico y 62 terapéuticos [35]. Se emplean en el tratamiento de enfermedades de gran prevalencia, como las enfermedades oncológicas (cáncer de colon, pulmón, mama, etc.) y las enfermedades autoinmunes como la (artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, etc.).

2.2. Estructura y tipos de mAb terapéuticos IgG1

Estructuralmente, los mAb terapéuticos más empleados son inmunoglobulinas de tipo 1 (IgG1). Aunque actualmente también existen en el mercado otro tipo de inmunoglobulinas con uso terapéutico, pero en menor número. Son varias las razones por las cuales las IgG1 se han consolidado como la estructura base de elección para producir un mAb terapéutico, pero la más importante es su mayor vida media en los fluidos biológicos.

Los mAbs IgG1 son glicoproteínas de elevado peso molecular (aprox. 150 kDa) altamente especializadas, ya que tienen estructuras muy específicas en función del antígeno que reconozcan. Están compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas: dos pesadas (~50 kDa) formadas por entre 450 a 550 aminoácidos y dos ligeras (~25 kDa) formadas por aproximadamente 220 aminoácidos. Contienen dieciséis puentes disulfuro que, junto con interacciones no covalentes, conforman una estructura tridimensional en forma de "Y". Una molécula típica de mAb contiene 16 puentes disulfuro en total, 4 encargados de unir las cuatro cadenas y los otros 12 son puentes intermoleculares que delimitan 6 dominios diferentes: 2 en las cadenas ligeras (uno variable (V_L) y otro constante (C_L)), y 4 en las cadenas pesadas (uno variable (V_H) y tres constantes (CH_1 , CH_2 y CH_3)). Funcionalmente hay una región variable (Fab), responsable de la unión al antígeno, y una región constante (Fc) común a todos los anticuerpos. La región Fab se conoce como 'fragment-antibody binding' y es la región encargada de unirse al antígeno y la región Fc se denomina 'fragment-crystallizable', que es la región fácil de cristalizar. [38]. La Figura I.2 muestra un esquema de la estructura de un mAb.

El fragmento Fab reconoce al antígeno por una región de aproximadamente 30 aminoácidos, la región denominada CDR ('complementary determining region'), que está formada por 6 segmentos polipeptídicos situados en las cadenas ligeras y cadenas

Introducción

pesadas (véase la Figura 2). En la mayoría de las uniones se emplean los 6 segmentos polipéptidos para el reconocimiento del antígeno, pero no siempre es así, ya que cuando se trata de un antígeno muy pequeño son suficientes los segmentos situados en la región V_H .

Los mAb presentan una región bisagra cuyo aminoácido predominante es la prolina, ubicada entre los dominios CH_1 y CH_2 . 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.

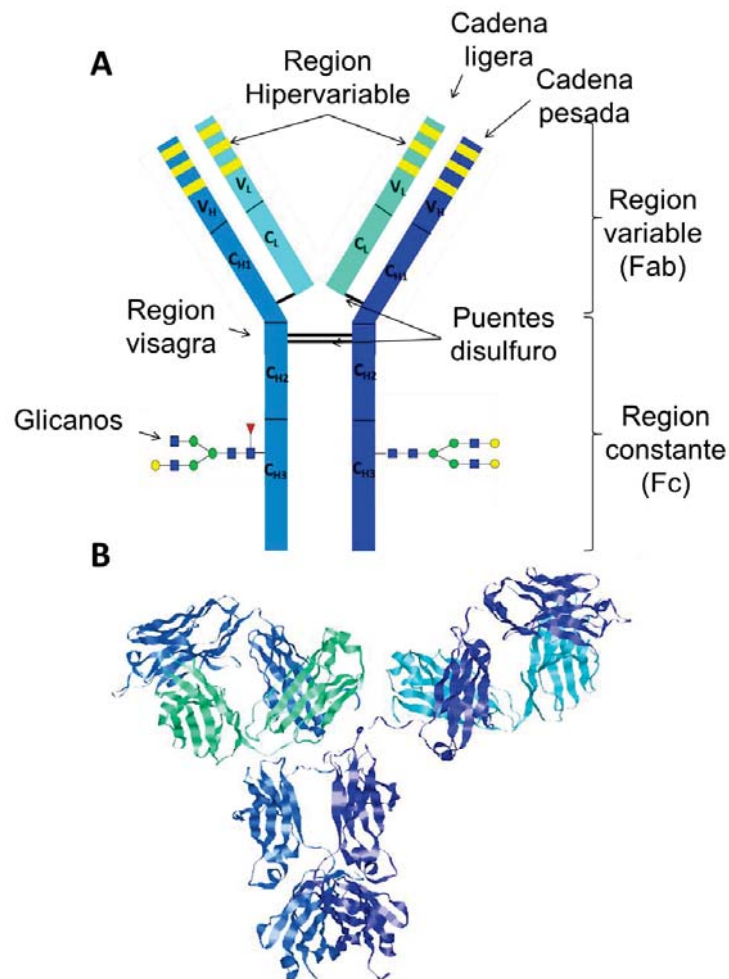


Figura I.2. (A) Diagrama de la estructura de un mAb; (B) Estructura tridimensional de un mAb.

Introducción

Los mAb terapéuticos se pueden dividir en cuatro tipos en función de su origen [39]:

- ➔ **mAb murinos.** El 100% de la estructura del anticuerpo procede del ratón. La respuesta inmune que producen estos biofármacos en el ser humano ha limitado sus aplicaciones. El sistema inmune humano reconoce a estos mAb como extraños y genera sus propios anticuerpos frente a ellos y los inactiva y elimina.
- ➔ **mAb quiméricos.** En este tipo, las regiones variables proceden de ratón y las regiones constantes son humanas. Se construyen gracias a técnicas de ingeniería genética. La respuesta inmune que producían los anticuerpos murinos se vio reducida con el uso de estos mAb. Existen actualmente bastantes de este tipo en el mercado.
- ➔ **mAb humanizados.** En estos anticuerpos solamente las CDR de las partes variables de los anticuerpos proceden del ratón siendo el resto del anticuerpo de origen humano. La tendencia es a producir este tipo, por su menor respuesta inmunogénica en los pacientes.
- ➔ **mAb humanos.** Estos anticuerpos son en su totalidad de origen humano, reduciendo así la respuesta inmune del cuerpo. Estos son los de mayor impacto económico, por la complejidad de su desarrollo y producción.

La Figura I.3 muestra una imagen resumen de estos tipos de mAb en función de su origen.

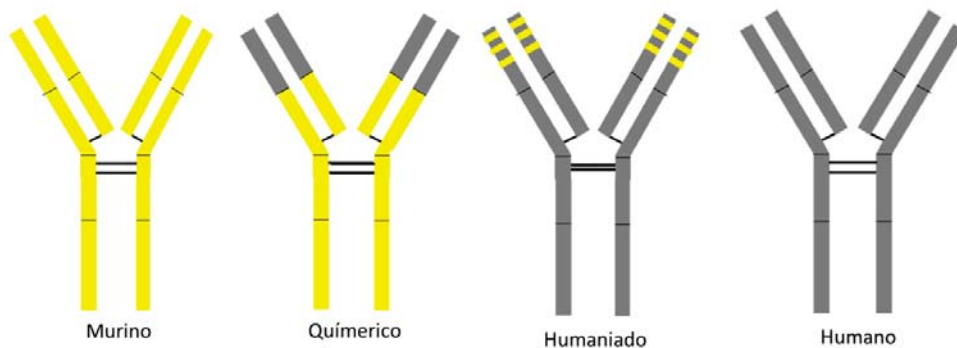


Figura I.3. Tipos de mAb terapéuticos en función de su origen.

2.3. Modificaciones postrasduccionales

Las modificaciones postrasduccionales (PTM) son modificaciones, generalmente enzimáticas, que ocurren en las células y que dan lugar a lo que se denominan "proteínas maduras". Las PTM incrementan la diversidad del proteoma por adiciones covalentes de grupos químicos, por rupturas proteolíticas de subunidades proteicas, o incluso se consideran PTM la degradación selectiva y parcial de proteínas. Es muy numeroso el tipo de PTM que puede ocurrir. Entre estas modificaciones se encuentran la O-glicosilación, N-glicosilación, acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, γ -carboxilación, β -hidroxilación, formación de puentes disulfuro, fosforilación y sulfonación. Todas las células vivas usan las PTM para regular su actividad celular. De muchas de ellas se conoce su función biológica, pero de otras no.

El perfil de PTM en un mAb depende de diferentes factores incluyendo el tipo de célula hospedadora, el proceso de manufactura, de formulación y de las condiciones de almacenamiento entre otras [6]. No todos los aminoácidos son susceptibles de sufrir PTM, los aminoácidos que no se suelen modificar son glicina, alanina (aminoácidos pequeños), leucina, isoleucina, valina o triptófano (aminoácidos hidrófobos).

En la Tabla I.3 se reúnen las PTM que se pueden producir en una proteína, ordenadas por el aminoácido modificable en la que se producen.

Tabla I.3. Tipos de modificaciones postrasduccionales (PTM) en proteínas, ordenadas por aminoácidos [40].

Aminoácido	Modificación
Arginina	ADP-ribosilación
Asparagina	N-glicosilación, deamidación, β -hidroxilación, ADP-ribosilación
Aspartato	β -hidroxilación
Cisteína	Formación de puentes disulfuro, oxidación
Glutamato	γ -carboxilación, ADP-ribosilación
Glutamina	Deamidación, formación de piroglutamato
Histidina	ADP-ribosilación, oxidación
Lisina	Glicación, ruptura lisina terminal, ADP-ribosilación
Metionina	Oxidación
Fenilalanina	O-glicosilación
Prolina	Hidroxilación
Serina	Fosforilación, O-glicosilación,
Treonina	Fosforilación, O-glicosilación,
Triptófano	Oxidación
Tirosina	Fosforilación, sulfonación, oxidación

Las PTM inducen heterogeneidad e inmunogeneidad en el mAb. Un buen conocimiento de la relación que existe entre la estructura primaria del mAb y el mecanismo celular ayuda a evitar posibles efectos indeseables producidos por las PTM.

La mayoría de las proteínas terapéuticas son sintetizadas en el retículo endoplasmático para su posterior secreción. Mientras que numerosas modificaciones ocurren antes de que las proteínas sean secretadas, otras ocurren después y durante el proceso *in vitro*, incluyendo las etapas de purificación, formulación, almacenamiento y administración a los pacientes. Durante su producción biotecnológica en los reactores, las PTM se pueden producir a tres niveles: en el retículo endoplasmático, en el aparato de Golgi y en espacio extracelular [41].

Las modificaciones que tienen lugar en el retículo endoplasmático son la formación de puentes disulfuro, γ -carboxilación, β -hidroxilación y la N-glicosilación. La sulfonación, O-glicosilación, fosforilación, amidación son PTM que tiene lugar en el aparato de Golgi. Por último, hay PTM que se producen una vez que ya se ha liberado la proteína al espacio extracelular, estas son la deamidación, glicación, la formación de N-terminal piroglutamato, oxidaciones y algunos procesos proteolíticos como la truncación de los extremos C-terminales de lisina.

Seguidamente se describe con más detalle las PTM más importantes que se dan en proteínas terapéuticas [41].

➔ **Formación de puentes disulfuro.** Es una de las PTM más comunes encontradas en proteínas extracelulares, como los mAb. La formación de puentes disulfuro se produce entre dos residuos de cisteínas y ayudan a estabilizar la estructura terciaria y a mantener la integridad conformacional de la proteína.

Es una modificación que se da en los mAb, los cuales contienen 16 puentes disulfuro (véase el apartado 2.2. Estructura de mAb) ayudan a mantener unidos las cadenas pesada y las ligeras entre sí, además de identificar zonas específicas en los mismos.

➔ **γ -Carboxilación de los residuos glutamato.** Es una modificación en la que se convierte el glutamato (Glu) en γ -carboxiglutamato (Gla). En presencia de CO_2 , O_2 y vitamina K, la enzima GGXX convierte el residuo glutamato en γ -carboxiglutamato.

➔ **β -Hidroxilación de aspartato y asparagina.** Se produce por la acción de una enzima hidroxilasa que convierte los residuos de aspartato (Asp) en residuos de

- β -hidoxiaspartato (Hya) o los residuos de asparagina (Asn) en residuos de β -hidoxiasparagina (Hyn). Es una reacción compleja que se cataliza por una proteína de membrana β -hidoxilasa en la que se introduce un grupo hidroxilo (OH) en un compuesto reemplazando un átomo de hidrógeno.
- ➔ **N-Glicosilación.** Es la PTM más común en células eucariotas. Esta modificación se da en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi. Es la unión de un azúcar ramificado de diferentes monómeros a la asparragina (Asn) de la secuencia Asn-X-Ser o Asn-X-Thr donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. Esta PTM se comentará de forma más extensa en el apartado 2.4 de esta Memoria.
 - ➔ **Sulfonación de la tirosina.** Es una reacción en la que se introduce un grupo sulfato a un residuo de tirosina y es catalizada por una enzima llamada TPST.
 - ➔ **O-Glicosilación.** Se produce por la unión de un azúcar a la unión de residuos de serina (Ser) o de treonina (Thr). A diferencia de la N-glicosilación, esta PTM se produce únicamente en el aparato de Golgi. Un azúcar, la N-acetilgalactosamina (GalNAc), se une al grupo hidroxilo de la Ser o la Thr. La elongación de este azúcar da lugar a 8 diferentes estructuras de O-glicanos.
 - ➔ **Fosforilación.** La realizan las proteínquinasas, transfiriendo el grupo fosfato del ATP. La desfosforilación la catalizan las proteínfosfatasas.
 - ➔ **Amidación.** Es un remplazamiento del grupo carboxilo C terminal de una proteína por grupo amida. Esta modificación previene la ionización del extremo C-terminal, de manera que lo convierte en más hidrofóbico y aporta un mejor enlace para su receptor.
 - ➔ **Deamidación.** Se produce por la transformación del residuo asparagina (Asn) y glutamina (Gln) a aspartato y glutamato, respectivamente. Es una reacción no enzimática muy común en proteínas. Se produce por una reacción hidrolítica con el agua para formar los productos mediante intermediarios de succinimida.
La deamidación contribuye a la heterogeneidad de carga de la proteína terapéutica ya que cuando la reacción se da, se introducen especies más ácidas que le confieren a la proteína una carga más negativa. Las deamidaciones suelen asociarse a procesos de degradación de la proteína.
 - ➔ **Glicación.** Es una reacción de condensación entre el grupo carbonilo de azúcares reductores y una amina de una lisina lateral. Mediante esta reacción, se añaden a

la estructura proteica residuos de glucosa o fructosa. A diferencia de la glicosilación, es una reacción no enzimática.

La glicación se produce en anticuerpos recombinantes durante el proceso celular, esto genera heterogeneidad y puede afectar a la estabilidad del producto.

- ➔ **Formación de piroglutamato.** El extremo N-terminal de una glutamina se cicla con su propio grupo amino terminal para formar un grupo piroglutamato cíclico. Se encuentra muy comúnmente en las cadenas pesadas y ligeras de los mAb.

La formación de piroglutamato hace que disminuya la masa molecular de la proteína en 17 Da.

- ➔ **Oxidación.** Esta PTM puede ocurrir en varios aminoácidos (cisteína, histidina, triptófano y tirosina, pero es más abundante en la metionina (Met), la cual se oxida para dar la metionina sulfóxido. Es una reacción no enzimática y se da en un alto grado en los mAb.

Esta modificación incrementa la masa 16 Da y convierte la cadena más polar. La Met255 y Met431 de la región constante son los sitios más susceptibles de sufrir oxidación. Se considera un proceso de degradación proteica.

- ➔ **Ruptura de la lisina C-terminal.** Es una modificación muy común en la cadena pesada de los mAb.

Esta PTM hace que la masa molecular de la proteína disminuya en 128 Da y se le confieran una unidad de carga positiva. Esta PTM es común en los mAb y no afecta a la estabilidad y eficacia del producto final.

- ➔ **ADP-Ribosilación.** Es una modificación reversible sobre residuos de histidina (His), arginina (Arg), asparagina (Asn), lisina (Lys) o glutamato (Glu) empleando NAD⁺ como sustrato.

De todas las PTM, hay algunas que se dan en mayor medida que otras, por lo que tendrán mayor o menor impacto en la heterogeneidad del mAb. Es necesario un riguroso control de estas modificaciones, ya que algunas pueden producir inmunogenicidad una vez que el mAb ha sido administrado al paciente. Para la caracterización de estas modificaciones es necesario el uso de técnicas analíticas avanzadas, por ejemplo, la espectrometría de masas de alta resolución. Este aspecto se tratará con mayor profundidad en el apartado 5 de esta Memoria (Herramientas analíticas para la caracterización de mAb y proteínas de fusión).

2.4. N-Glicosilación

Las N-glicosilaciones son PMT fundamentales en los mAb. Como acaba de ser comentado, esta es la modificación postrasduccional mayoritaria en los mAbs y se da en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi. La N-glicosilación ocurre mayoritariamente en la secuencia Asn-X-Ser/Thr donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina, pero también se puede producir en la secuencia Asn-X-Cys [41]. Las IgG1, y por tanto los mAbs terapéuticos, han conservado un sitio de anclaje de N-glicanos en la fracción cristalizable (Fc), en la posición Asn297 [42]. Los azúcares son compuestos polares, por lo que entre sus funciones biológicas, se encuentran la de dar solubilidad en medios acuosos a las IgG.

Los N-glicanos se pueden dividir en tres grandes grupos, denominados glicanos oligomanosa (denominados "altos en manosa"), glicanos complejos y glicanos híbridos. Los tres tipos comparten la estructura del núcleo común que incluye los dos primeros residuos de N-acetilglucosamina y los tres primeros residuos de manosa. Los residuos "altos en manosa") contienen, además del núcleo, solo residuos de manosa. Los glicanos complejos, en el núcleo suelen tener un residuo de fucosa, y suelen contener también residuos de galactosa y de ácido N-acetilneurámico. Los N-glicanos híbridos contienen elementos de los glicanos altos en manosa y de los glicanos complejos [47]. En la Figura I.4 se muestra el esquema de identificación de la estructura de los diferentes tipos de N-glicanos.

Para facilitar la descripción de la estructura, sin la necesidad de dibujar las estructuras de los oligosacáridos, se han desarrollado diferentes nomenclaturas, entre las que se destacan: 'Oxford Glycobiology Institute notation', 'UOXF color notation', 'Consortium for Functional Glycomics (CFG) notation', 'CFG blank and white notation', y 'linkage placement notation' [43]. A continuación, la Tabla I.4 recopila los N-glicanos más abundantes en los mAbs y su nomenclatura más habitual (CFG notation)

Introducción

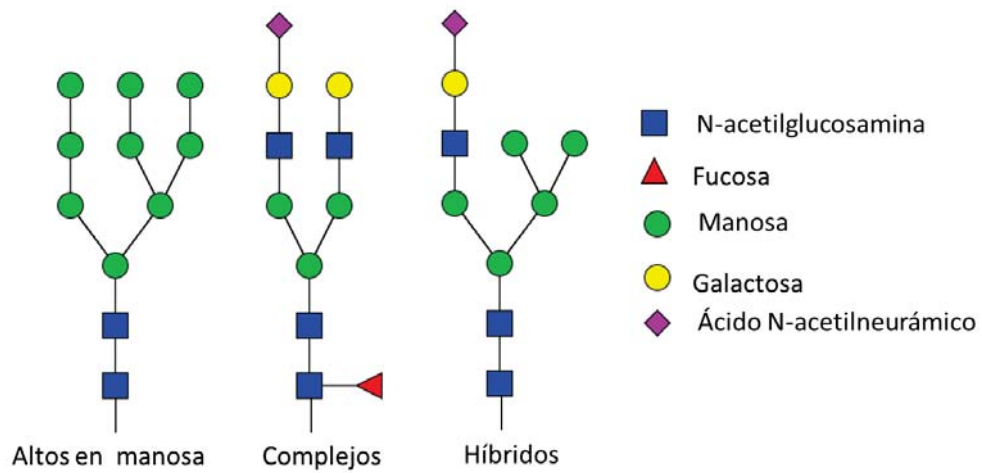


Figura I.4. Tipos de N-glicanos :altos en manosa, complejos e híbridos.

Tabla I.4. N-glicanos más comunes en mAb.

Estructura	Nomenclatura	Estructura	Nomenclatura
	A1G0		M5
	A1G0F		A2G1F
	A2G0		A2G2F
	A2G0F		A1G1S1F
	A1G1F		A2G2S1F

El patrón de glicosilación de una proteína depende de la célula que la produce, Las células de cáncer de ovario de ratón (células CHO) son los sistemas más empleados actualmente (pero no los únicos) para la expresión de mAb; sin embargo, tienen la desventaja de que la glicosilación no es consistente, debido a la acción de las

numerosas enzimas que están involucradas en dicho proceso durante la síntesis de la proteína que da lugar a diferentes patrones de glicosilación en una misma cadena proteica, y por tanto, a diferencias de repetibilidad entre lotes de medicamento [44]. El patrón de glicosilación es un atributo crítico de la calidad de los mAb, por lo que es necesario controlarlo, de manera que se asegure que este sea lo más repetitivo posible para producir un producto seguro y eficaz [45].

Se ha demostrado que cambios en el patrón de glicosilación expresado en una glicoproteína tiene efecto directo en la eficacia, la vida media, la estabilidad y la seguridad del biofármaco. También influyen en la función efectora, incluyendo los procesos de citotoxicidad mediada por el complemento ('antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity' (ADCC) y 'complement dependent cytotoxicity' (CDC)) [46]. Para obtener un patrón de glicosilación constante, se requiere de una producción eficiente y muy controlada, minimizando las variaciones en las diferentes etapas del proceso de producción, y además se requiere metodología de caracterización efectiva [47].

Por tanto, la caracterización del patrón de glicosilación en mAbs terapéuticos es un requisito reglamentario, no solo para la liberación de lotes, sino también para nuevos medicamentos y para la aprobación de biosimilares, según especifica la guía de la Conferencia Internacional para la Harmonización de los requerimientos de comercialización de medicamentos de uso humano, la ICH Q6B [21]. La EMA sugiere que hay prestar especial atención al nivel de manosilación, galactosilación, fucosilación y sialilación, y su distribución entre los glicanos principales debe de ser determinada [47].

A continuación se mencionan algunos de los efectos más importantes que los N-glicanos confieren a los mAb:

- La N-glicosilación estabiliza la estructura tridimensional del mAb, de manera que la deglicosilación de las cadenas hace al mAb térmicamente menos estable, más susceptible a desplegarse y con más tendencia a la agregación [48,49].
- La ausencia de fucosas (afucosilación) en un mAb puede dar lugar a un incremento en la afinidad por los receptores presentes en la superficie de las células efectoras, los cuales pueden aumentar el proceso ADCC [50,51].
- Los glicanos que contienen ácido siálico terminal están implicados en respuestas antiinflamatorias, reduciendo el efecto ADCC in vivo e inhibiendo reacciones alérgicas [52,53].

- ➔ La presencia de galactosas (galactosilación) no influye en el efecto ADCC, sin embargo, incrementa el efecto CDC [54,55] y la actividad antiinflamatoria [56].
- ➔ Los glicanos que contienen manosa al final del glicano ('altos en manosa') están relacionados con una alta eliminación en sangre, disminuyendo la vida media del mAb en el organismo [57,58,59].

3. PROTEÍNAS DE FUSIÓN Fc

3.1. Características y estructura

Una proteína de fusión Fc es una proteína compuesta por la fracción cristalizable (Fc) de una inmunoglobulina IgG1 unida mediante ingeniería genética a un péptido o a un fragmento de una proteína de interés. Las proteínas de fusión Fc se generan artificialmente por tecnología de ADN recombinante y son, por tanto, derivadas de los mAb. Estas proteínas son nuevas entidades biológicas que tiene un gran potencial para ser empleadas como biofármacos.

A principios de la década de los 80, la estrategia seguida por la mayoría de las compañías biotecnológicas farmacéuticas, fue producir proteínas recombinantes que fueran estructuralmente lo más cercano posible a las producidas naturalmente por el cuerpo humano, para minimizar así la antigenicidad. El desarrollo de proteínas de fusión promueve la unión de dos actividades diferentes en una sola molécula con un efecto sinérgico. Una aplicación amplia de este tipo de fármacos biotecnológicos ha sido la de fusionar una proteína de unión activa (le confiere la actividad que se desee) con el dominio Fc de una inmunoglobulina IgG1. El dominio de unión confiere la actividad deseada, mientras que el dominio Fc sirve para incrementar el tamaño molecular y prolongar el tiempo de circulación en los fluidos biológicos.

Una de las partes más complejas de la producción de las proteínas de fusión Fc es la unión de la proteína de interés con la región Fc, ya que estas conexiones deben de ser estables en la circulación en la sangre, y tiene que permitir una interacción entre la molécula y la célula diana. Tres tipos de uniones son las más empleadas: uniones por puentes disulfuro, uniones sensibles al pH y uniones basadas en péptidos [60].

No hay una estructura definida para las proteínas de fusión Fc, ya que la proteína de interés es diferente en cada caso particular. En la Figura I.5 se muestran algunos ejemplos de proteínas de fusión Fc.

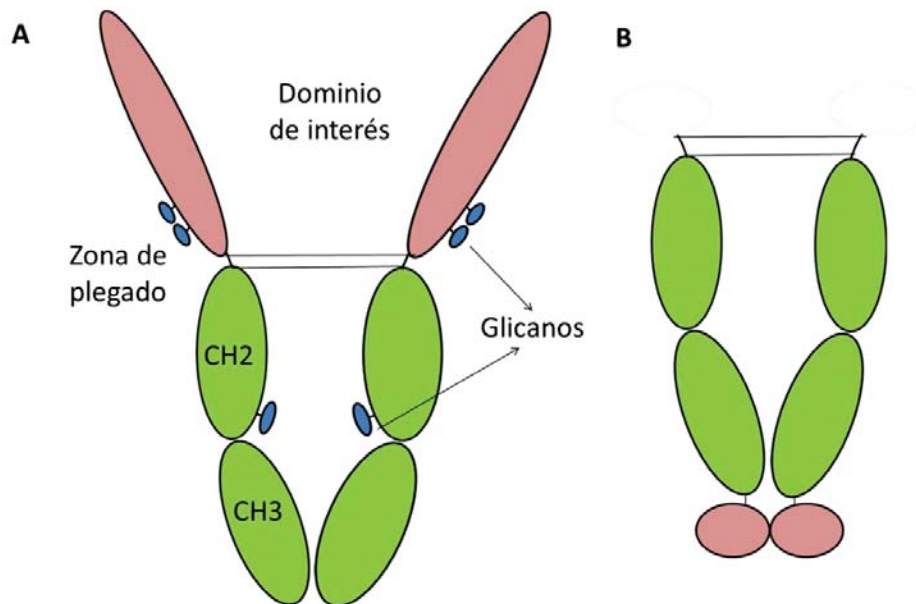


Figura I.5. Estructura de proteínas de fusión Fc. A) Estructura de etanercept, proteína de fusión Fc anti TNF- α ; posee un alto grado de glicosilación (N-glicanos y O-glicanos). B) Estructura de romiplostim, proteína de fusión Fc, expresada en los extremos C-terminal de la Fc y no posee glicosilación.

3.2. Ventajas que presentan las proteínas de fusión Fc

El conocimiento y la comprensión de la biología de las inmunoglobulinas ha aumentado de forma drástica, lo que permite crear nuevas generaciones de moléculas cuyo mecanismo está basado en las modificaciones de biofármacos ya existentes; este es el caso de las proteínas de fusión Fc. La mayoría de estas modificaciones se basan en las propiedades que tiene el dominio Fc de las IgG1 y su relación con el receptor Fc neonatal (FcRn). El FcRn es una proteína que juega un papel crucial en la regulación del catabolismo y en la vida media de las IgG1, así como en las funciones del sistema inmunitario, ya que protege a la IgG1 de su degradación en el endosoma. Esto hace que se necesite administrar menos frecuentemente el medicamento. La región Fc se une al FcRn retrasando la degradación lisosomal y prolongando su vida media en circulación en plasma [60].

Las principales ventajas que tienen las proteínas de fusión Fc en cuanto a posibilidad de empleo como base de medicamentos, derivan de por tanto de las propiedades que le confiere la región Fc, ya que la fracción proteica fusionada es la encargada de actuar únicamente como biofármaco específico en la aplicación que se requiera a través de la unión con el antígeno, mientras que la estabilización y características de su comportamiento en el medio fisiológico dependen en gran medida de la región Fc.

Otra ventaja que presenta este tipo de proteínas quiméricas es que la propia tecnología de creación de proteínas de fusión Fc facilita el proceso de manufactura. Esto pasa debido a que la región Fc, al igual que ocurre con los mAb, en el proceso de purificación se une a la proteína A, facilitando el proceso de purificación y aislamiento, que sería más complicado si no estuviera presente en la proteína la región Fc fusionada.

Todo esto, unido a la capacidad inmunomoduladora de la región Fc, hace que actualmente las proteínas de fusión Fc sean un campo de desarrollo muy prometedor en el ámbito de la industria farmacéutica biotecnológica.

3.3. Modificaciones postraduccionales en proteínas de fusión Fc

A pesar de que las proteínas de fusión pueden ser expresadas en varios sistemas de expresión, las células de mamíferos son las preferidas, ya que permiten la conformación correcta, además del plegado y modificaciones postraduccionales adecuadas. Normalmente van ser expresadas en células CHO, células de hibridoma NSO, células embrionarias de riñón (HEK) o células Sp2/0, ya que todas estas células presentan la ventaja de que el patrón de glicosilación resultante en la proteína es heterogéneo pero constante [61].

Al igual que ocurre con los mAb, las proteínas de fusión Fc son susceptibles de las modificaciones postraduccionales que han sido mencionadas en el apartado 2.3 de esta Memoria de Tesis Doctoral. Las modificaciones postraduccionales, sobre todo la glicosilación, son muy dependientes de la célula hospedadora donde se ha sintetizado el biofármaco; puesto que se emplean células hospedadoras similares que en la síntesis de mAb, las modificaciones serán similares.

Por tanto, las proteínas de fusión Fc presentan la misma heterogeneidad en cuanto al patrón de glicosilación que los mAb, ya que éstas conservan el sitio de glicosilación de la fracción cristalizable en Asn297. Existe también una gran variedad en cuanto al patrón de glicosilación de una proteína de fusión a otra, mayor que el que existe entre diferentes

mAb terapéuticos. Hay proteínas de fusión que no están glicosiladas, como por ejemplo la proteína de fusión romiplostim (Figura I.5 B), principio activo de medicamento N-plate®; sin embargo, hay otras altamente glicosiladas, que contiene en su estructura proteica N-glicanos y O-glicanos, como ocurre en la proteína de fusión Fc etanercept, principio activo del medicamento Enbrel® (Figura I.5 A)

Los glicanos tienen un papel fundamental en la actividad biológica de las proteínas de fusión Fc, al igual que ocurre con los mAb [62].

4. MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS ESTUDIADOS

En esta Tesis Doctoral se han estudiado 5 mAb y 1 proteína de fusión empleando para ello el medicamento comercial que los contiene como ingrediente activo. Los mAb y el correspondiente medicamento son Bevacizumab (Avastin®), Cetuximab (Erbix®), Infliximab (Remicade®), Rituximab (Mabthera®) y Trastuzumab (Herceptin®). La proteína de fusión es Aflibercept (Zaltrap®).

A continuación se hace una descripción más detallada de los citados fármacos.

4.1. Aflibercept

4.1.1. Características y mecanismo de acción

Aflibercept (AFL) es una proteína de fusión Fc recombinante que consiste en la unión de una secuencia derivada del receptor del factor de crecimiento epidérmico vascular (VEGF) humano extracelular, fusionado con la Fc de un mAb (IgG1). Posee dos secuencias del VEGFR correspondientes al dominio extracelular, la VEGFR-1 y la VEGFR-2. Cada VEGFR está formado por 7 dominios extracelulares, de los cuales el dominio 2 y 3 contribuyen a la mayoría de los enlaces con el VEGF.

De esta manera AFL contiene en su estructura la secuencia del dominio 2 del VEGFR-1 y el dominio 3 del VEGFR-1, ambos a su vez fusionados a la Fc de una IgG1. No hay secuencias enlazadoras extrañas entre ninguno de los dominios peptídicos [63]. En la Figura I.6 se muestra la estructura de AFL.

AFL consta de 96.9 kDa de parte proteica, con alrededor del 15% de glicosilaciones, esto le confiere un tamaño global de aproximadamente 115 kDa.

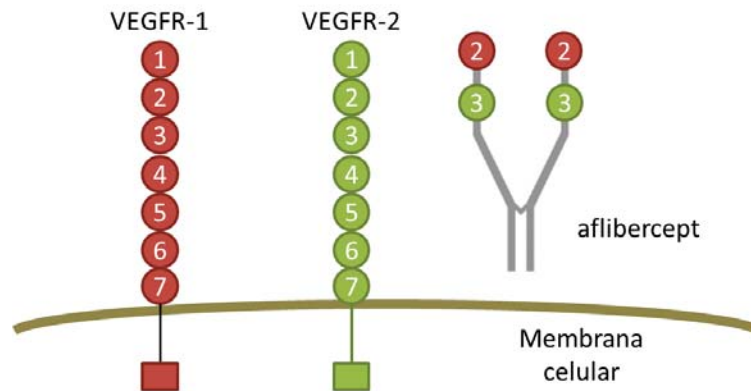


Figura I.6. Estructura de AFL y de los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2.

Los factores de crecimiento del endotelio vascular A y B (VEGF-A, VEGF-B) forman parte de la familia de factores angiogénicos VEGF, que pueden actuar como potentes factores mitogénicos, quimiotácticos y de permeabilidad vascular para las células endoteliales. El VEGF-A actúa a través de la tirosina quinasas de dos receptores, el VEGFR-1 y el VEGFR-2, presentes en la superficie de las células endoteliales. Por su parte, el factor VEGF-B y el PlGF ('placental growth factor') se unen al receptor VEGFR-1. La activación excesiva de estos receptores por los VEGF puede dar lugar a una neovascularización patológica y una permeabilidad vascular excesiva, permitiendo la extravasación de macromoléculas desde los vasos tumorales. AFL se une al VEGF-A, VEGF-B y PlGF, con una afinidad más alta que sus receptores nativos, con lo que previene la unión de los ligandos a dichos receptores y, de esta forma, bloquea la señalización correspondiente. Todo ello da lugar a un bloqueo de la proliferación de células endoteliales, inhibiendo así el crecimiento de nuevos vasos (neovasos tumorales) que proporcionan oxígeno y nutrientes a los tumores [64].

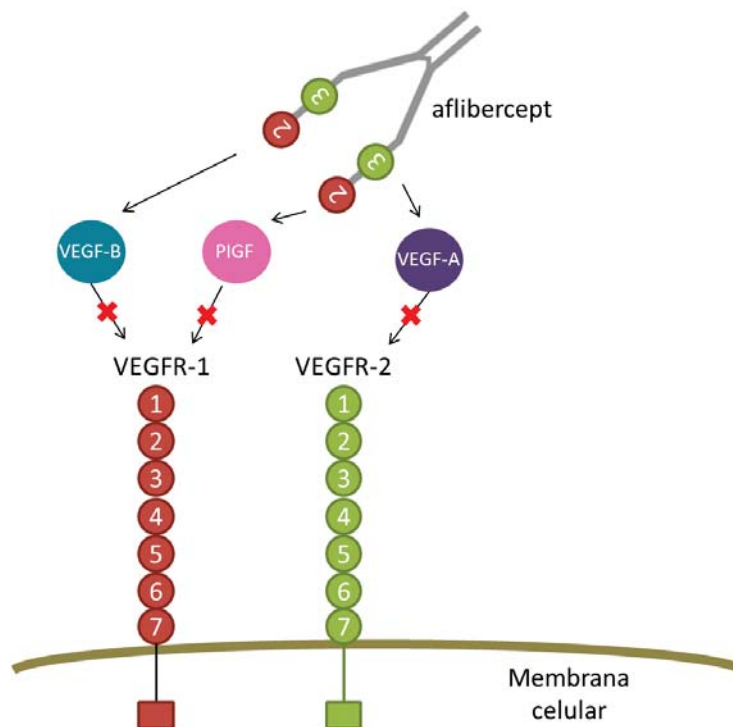


Figura I.7. Mecanismo de acción de AFL.

4.1.2. Forma farmacéutica, composición y excipientes

AFL es el principio activo de dos medicamentos Eylea® (Bayer AG, Alemania) y Zaltrap® (Sanofi-aventis Deutschland GmbH, Alemania).

Eylea® es una solución transparente, de incolora a amarillo pálido. Cada vial tiene una concentración de 40 mg/ml solución inyectable en jeringa precargada y los excipientes son: polisorbato 20, dihidrógenofosfato de sodio monohidrato (para ajuste del pH), hidrogenofosfato de disodio heptahidrato (para ajuste del pH), cloruro de sodio, sacarosa y agua para preparaciones inyectables [65].

Zaltrap® es una solución transparente, de incolora a color amarillo pálido. Cada vial tiene una concentración de 25 mg/ml de solución para perfusión, conteniendo 10 mg en la presentación de 4 ml o 200 mg en la de 8 ml. Los excipientes son: sacarosa, cloruro de sodio, citrato de sodio dihidrato, ácido cítrico monohidrato, polisorbato 20, fosfato de sodio dibásico heptahidrato, fosfato de sodio monobásico monohidrato, hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico, y agua para preparaciones inyectables [66].

La diferencia entre ambos medicamentos radica en la enfermedad para la que están comercializados, por lo que su formulación es diferente, en cuanto a la concentración del principio activo y en cuanto a los excipientes. Básicamente, Eylea® está indicado en enfermedades oculares y Zaltrap® en enfermedades oncológicas. Las indicaciones de uso de estos medicamentos se comentan a continuación.

4.1.3. Aplicaciones

Zaltrap®, está aprobado en combinación con quimioterapia con irinotecan/5-fluorouracilo/ácido folínico (FOLFIRI) en adultos con cáncer colorrectal metastásico (CCRM), que es resistente o ha progresado después de un régimen con oxaliplatino.

Eylea® está indicado en adultos para el tratamiento de: (1) la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) neovascular; (2) la alteración visual debida al edema macular secundario a la oclusión de la vena retiniana (oclusión de la rama venosa retiniana (u oclusión de la vena central retiniana); (3) la alteración visual debida al edema macular diabético; y (4) la alteración visual debida a la neovascularización coroidea miópica.

4.2. Bevacizumab

4.2.1. Características y mecanismo de acción

Bevacizumab (BEV) es un mAb del tipo IgG1 recombinante humanizado producido por tecnología del ADN recombinante en células ováricas de hámster chino (CHO) y que presenta regiones humanas (93%) y regiones murinas (7%), siendo estas últimas las regiones determinantes para la unión al VEGF [67]. Tiene aproximadamente 149 kDa de peso molecular.

La estructura de BEV contiene regiones humanas y las CDR de un mAb murino que se une a VEGF-A. Su actividad es la neutralización de todas las funciones llevadas a cabo por el factor de crecimiento epidérmico vascular (VEGF) humano, como es la angiogénesis.

Por tanto, BEV se une de forma selectiva al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), que se localiza en las paredes de los vasos sanguíneos y linfáticos del organismo. Esta proteína se une a los receptores de membrana VEGFR-1 y VEGFR-2. La unión de esta proteína VEGF a los receptores provoca que los vasos sanguíneos

crezcan dentro del tumor, que lo suplen con nutrientes y oxígeno. Cuando bevacizumab se une al VEGF, evita que este se una sus receptores, de manera que previene el crecimiento del tumor al bloquear el crecimiento de los vasos sanguíneos, necesarios para que el tumor crezca y se expanda [69]. En la Figura I.8 se muestra un esquema del mecanismo de acción de BEV.

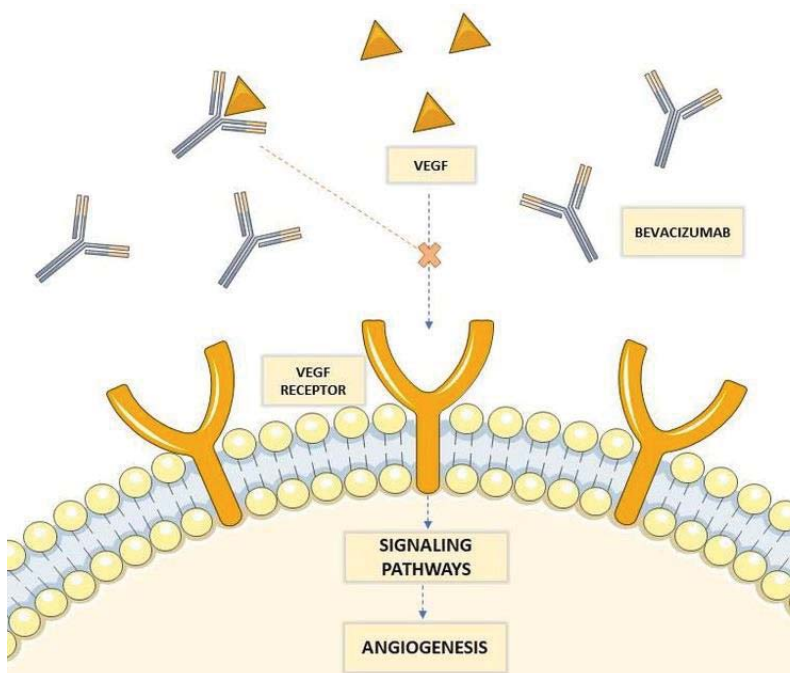


Figura I.8. Mecanismo de acción de BEV. Fuente [68].

4.2.2. Forma farmacéutica, composición y excipientes

BEV es el principio activo de Avastín® comercializado por Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Alemania [69]. Avastín® tiene dos biosimilares comercializados actualmente: Mvasi® [70] y Zirabev® [71].

Avastín® es un medicamento que presenta como una disolución concentrada para perfusión. Es un líquido de incoloro a marrón pálido, y de transparente a ligeramente opalescente. Cada vial tiene una concentración de 25 mg/ml de BEV y contiene 100 mg en la presentación de 4 ml. Los excipientes que contiene son: trehalosa dihidrato, fosfato sódico, polisorbato 20 y agua para preparaciones inyectables [69].

4.2.3. Aplicaciones

Avastín[®], en el año 2004, fue aprobado por la FDA ('Food and Drug Administration', EE.UU.) para el tratamiento del cáncer de colorectal metastático como terapia en combinación con quimioterapia [72]. Actualmente, está aprobado para el tratamiento de cáncer de mama metastático avanzado, cáncer de células no escamosas de pulmón, cáncer avanzado de ovario epitelial, trompa de Falopio o peritoneal primario, y carcinoma de células renales avanzado o metastático [69].

Avastín[®] se usa fuera de indicación autorizada para el tratamiento intravítreo de enfermedades neovasculares oculares, como la degeneración macular asociada a la edad, y otras patologías relacionadas. Este medicamento tiene una diana similar a ranibizumab (Lucentis[®]) y AFL (Eylea[®]) que son los medicamentos indicados para el tratamiento de estas patologías; la diferencia radica que es más barato el tratamiento con Avastín[®], de ahí que se use fuera de autorización. El primer trabajo en relación con el uso intravítreo de Avastín[®] fue publicado en 2005 [73] y desde entonces, varios informes han apoyado el uso intravítreo del mismo, aunque es esencial continuar investigando su seguridad [74].

4.3. Cetuximab

4.3.1. Características y mecanismo de acción

Cetuximab (CTX) es un mAb quimérico del tipo IgG1 producido mediante tecnología de ADN recombinante. CTX es el primer mAb aprobado para uso clínico que actúa bloqueando lo que se conoce como receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Este factor está implicado en el control de la supervivencia celular, la progresión del ciclo celular, la angiogénesis, la migración celular y la invasión celular/metástasis.

La diana terapéutica es el EGFR (proteína transmembrana de 170 kDa). La unión a EGFR por sus ligandos naturales, provoca la dimerización del receptor, dando lugar a una cascada de señales de transducción que afectan a la síntesis de ADN, el crecimiento celular y a mecanismos de apoptosis. Una variación en estos procesos produce alteraciones en la vida de la célula. La unión de CTX al EGFR se traduce en la pérdida de función del receptor, de manera que funciones implicadas en el crecimiento y la metástasis tumoral, la proliferación celular, la supervivencia celular, la reparación del ADN, la angiogénesis tumoral, y la motilidad y la invasión celulares, se verán

bloqueadas [75]. En la Figura I.9 se muestra un esquema del mecanismo de acción de CTX.

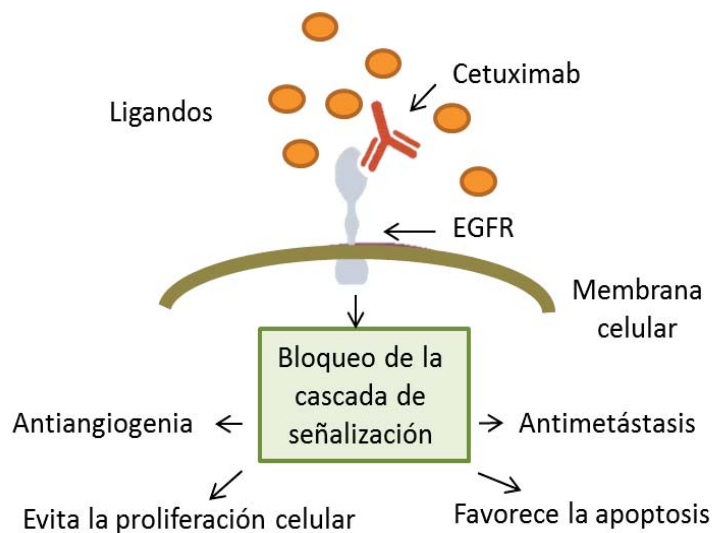


Figura I.9. Mecanismo de acción de CTX.

4.3.2. Forma farmacéutica, composición y excipientes

CTX es el principio activo del medicamento Erbitux®, comercializado por Merck KGaA, Alemania [76]. Se presenta como una disolución incolora para perfusión. Cada vial de medicamento tiene una concentración de 5 mg/ml y se comercializa en dos presentaciones: una que contiene 100 mg de CTX en 20 ml y otra que contiene 500 mg de CTX en 100 ml.

Los excipientes que contiene son: cloruro de sodio, glicina, polisorbato 80, ácido cítrico monohidrato, hidróxido de sodio, agua para preparaciones inyectables [76].

4.3.3. Aplicaciones

Erbitux® está indicado para el tratamiento:

- De pacientes con cáncer colorrectal metastásico con expresión del EGFR y con gen RAS de tipo nativo. Se usa en combinación con quimioterapia basada en irinotecán con FOLFOX; o en monoterapia en aquellos pacientes en los que haya fracasado el tratamiento con oxaliplatino e irinotecán y que no toleren irinotecán.

- ➔ De pacientes con cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, en combinación con radioterapia para la enfermedad localmente avanzada o en combinación con quimioterapia basada en platino, para la enfermedad recurrente y/o metastásica.

4.4. Infliximab

4.4.1. Características y mecanismo de acción

Infliximab (INF) es un mAb del tipo quimérico, en el que las regiones murinas suponen un 25% de la estructura y la región humana supone un 75%. Tiene estructura de una IgG1 y posee una elevada especificidad y afinidad por el factor de necrosis tumoral α (TNF- α). El TNF- α es el principal mediador en procesos inflamatorios y autoinmunes, así como en el transcurso de distintas agresiones celulares como por ejemplo las infecciones [77].

INF actúa principalmente bloqueando los efectos y reduciendo la producción de TNF- α (principal mediador en procesos inflamatorios y autoinmunes). Se une al TNF- α tanto en su forma soluble como unido a los receptores de membrana, logrando interrumpir la cascada secuencial de activación de las vías inflamatorias. INF también actúa uniéndose a los linfocitos T y macrófagos. Cada molécula de IFX es capaz de unirse a dos moléculas de TNF- α , y hasta tres moléculas de IFX pueden unirse a cada homotrímero de TNF- α , así bloquean todos los receptores de unión del TNF- α .

4.4.2. Forma farmacéutica, composición y excipientes

INF es el principio activo del medicamento Remicade[®], comercializado por Janssen Biologics, Holanda [78]. Remicade[®] tiene cuatro biosimilares actualmente en el mercado: Inflectra[®] [79], Flixabi[®] [80], Remsima[®] [81] y Zessly[®] [82].

Cada vial de Remicade[®] contiene 100 mg de INF liofilizado para ser reconstituido en una disolución acuosa de 10 mg/mL, a partir de la cual preparar la disolución para perfusión. Los excipientes que contiene son: sacarosa, polisorbato 80, fosfato sódico monobásico y fosfato sódico dibásico [78].

4.4.3. Aplicaciones

INF se asocia a un gran número de patologías relacionadas con procesos inflamatorios y autoinmunes como la enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, etc. Concretamente, Remicade® está indicado en el tratamiento de:

- Artritis reumatoide y otras enfermedades reumatológicas. En combinación con metotrexato, está indicado en la reducción de los signos y síntomas, así como en la mejoría de la función física en: pacientes adultos con enfermedad activa.
- Enfermedad de Crohn. Ha demostrado ser efectivo en el tratamiento de pacientes que presentan esta enfermedad. Está indicado para el tratamiento de la enfermedad de Crohn activa, de moderada a grave, en pacientes adultos y en pacientes con la enfermedad de Crohn activa, fistulizante. También se puede aplicar en pacientes entre 6 y 17 años.
- Colitis ulcerosa. Está indicado para el tratamiento de la colitis ulcerosa activa, de moderada a grave, en pacientes adultos que han presentado una respuesta inadecuada al tratamiento convencional. También está indicado en el tratamiento pediátrico de pacientes entre 6 y 17 años.
- Enfermedades dermatológicas como la psoriasis o la artritis psoriásica. Está indicado en el tratamiento de la psoriasis en placas, de moderada a grave, en pacientes adultos.
- Espondilitis anquilosante. Está indicado para el tratamiento de la espondilitis anquilosante activa grave, en pacientes adultos que hayan respondido de forma inadecuada al tratamiento convencional.

Aparte de las indicaciones que explicita la EMA en la ficha técnica del medicamento, INF ha sido utilizado también en el tratamiento de: sarcoidosis sistémica complicada y la enfermedad de Still [83,84], en el síndrome de Behçet [85,86], en lupus eritematoso sistémico, enfermedades infecciosas y en enfermedades neurológicas

4.5. Rituximab

4.5.1. Características y mecanismo de acción

Rituximab (RTX) es un mAb de tipo quimérico con estructura de una IgG1. Se une a la proteína transmembrana CD20. Esta proteína forma un tetrámero que da lugar a un canal de iones calcio que participa en la activación de linfocitos B. El CD20 está sobre expresado en linfocitos B malignos. RTX se une mediante su región variables al CD20, dicha unión presenta una afinidad y especificidad elevadas [87].

Las cuatro vías de eliminación del CD20 mediante la unión con el RTX son las siguientes: (1) La unión del fragmento Fc de RTX a las células cancerosas genera la reorganización de los antígenos CD20 en bolsas lipídicas que provocan la activación de la ruta clásica del complemento, por lo que se activa la CDC, lisis de las células tumorales y se favorece un incremento de la actividad fagocítica [87]; (2) La unión de RTX permite la interacción con las células matadoras (NK cells) via unión por los receptores Fc, los cuales desencadenan el proceso ADCC; (3) La interacción de la Fc de RTX y receptores de membrana que se expresan en la superficie de la célula efectora Fcγ de macrófagos, produce la activación del proceso ADCC; y (4) La unión de RTX al CD20 de los linfocitos B mediante la muerte celular por vía de apoptosis no clásica.

En la Figura I.10 se representa el mecanismo de acción de RTX.

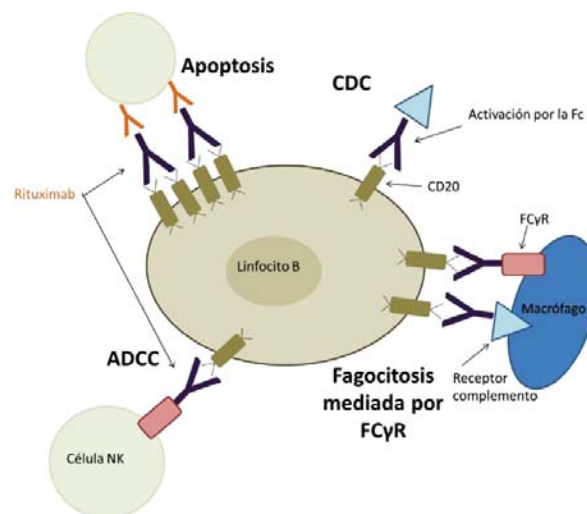


Figura I.10. Mecanismo de acción de RTX.

4.5.2. Forma farmacéutica, composición y excipientes

RTX es el principio activo de Mabthera[®], comercializado por Roche Registration GmbH, Alemania [88]. Mabthera[®] tiene en el mercado seis biosimilares aprobados por la EMA: Truxima[®] [89], Blitzima[®] [90], Ritemvia[®] [91], Rituzena[®] [92], Rixathon[®] [93] y Riximyo[®] [94].

Mabthera[®] contiene 100 mg de RTX para solución para perfusión con una concentración de 10 mg/ml. Los excipientes que contiene son: Citrato sódico, polisorbato 80, cloruro sódico, hidróxido sódico, ácido clorhídrico, agua para preparaciones inyectables. [88].

4.5.3. Aplicaciones

Mabthera[®] está aprobado e indicado para los siguientes usos:

- ➔ Linfoma no-Hodgkin. En combinación con quimioterapia, en el tratamiento de pacientes con linfoma no-Hodgkin folicular estadio III-IV que no hayan sido tratados previamente; en el tratamiento de mantenimiento en pacientes con linfoma folicular que hayan respondido al tratamiento de inducción; en el tratamiento de pacientes con linfoma no-Hodgkin folicular estadio III-IV que son quimiorresistentes o están en su segunda o posterior recidiva tras la quimioterapia; y en combinación con quimioterapia CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisolona) en el tratamiento de pacientes con linfoma no-Hodgkin difuso de células B grandes CD20 positivas.
- ➔ Leucemia linfática crónica. Está indicado en combinación con quimioterapia en el tratamiento de pacientes con leucemia linfática crónica, que no hayan sido tratados previamente o que estén en recidiva o refractarios a un tratamiento previo.
- ➔ Artritis reumatoide. En combinación con metotrexato, está indicado en pacientes adultos para el tratamiento de artritis reumatoide activa grave en pacientes que hayan presentado una respuesta inadecuada o intolerancia a otros fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad, incluyendo uno o más tratamientos con inhibidores del factor de necrosis tumoral (TNF).
- ➔ Granulomatosis con poliangeítis y poliangeítis microscópica. En combinación con glucocorticoides, está indicado para el tratamiento de pacientes adultos con granulomatosis con poliangeítis y con poliangeítis microscópica, activa y grave.

- ➔ Pénfigo vulgar. Está indicado para el tratamiento de pacientes con pénfigo vulgar de moderado a grave.

4.6. Trastuzumab

4.6.1. Características y mecanismo de acción

Trastuzumab (TRA) es un mAb humanizado con estructura de una IgG1. Actúa contra el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2), el cual está presente en grandes cantidades en la superficie de algunas células cancerosas que estimulan el crecimiento celular en el cáncer de mama, ovario, gástrico y de glándulas salivares; este factor de crecimiento se conoce como un marcador canceroso [95].

TRA activa el sistema inmunitario del organismo y bloquea la vía de señalización de HER2 para destruir así de forma selectiva las células cancerosas [96]. No se conoce con total seguridad su mecanismo, lo que sí se conoce es que TRA se une con una alta afinidad y especificidad al HER2, inhibiendo así la vía de señalización del HER2. El bloqueo de la señalización HER2 disminuye la expresión de factores de crecimiento, inhibe la proliferación de celular tumoral e interrumpe el ciclo celular.

4.6.2. Forma farmacéutica, composición y excipientes

TRA es el principio activo del medicamento Herceptin[®], comercializado por Roche Registration GmbH, Alemania [95]. Herceptin[®] tiene en el mercado cuatro biosimilares aprobados por la EMA: Kanjinti[®] [97], Ogivri[®] [98], Ontruzant[®] [99] y Trazimera[®] [100].

Herceptin[®] contiene 150 mg de TRA liofilizado, a partir del cual se prepara una disolución concentrada de 21 mg/ml de TRA, que se emplea para preparar las disoluciones para perfusión. Los excipientes que contiene son: hialuronidasa recombinante humana, l-histidina, cloruro de l-histidina monohidrato, α -trehalosa dihidrato, l-metionina, polisorbato 20, agua para preparaciones inyectables [95].

4.6.3. Aplicaciones

Herceptin[®] está indicado en tratamiento de diversos tipos de cánceres:

- ➔ Cáncer de mama metastásico.

- Está indicado 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.
- En combinación con un inhibidor de la aromatasa para el tratamiento de pacientes posmenopáusicas con cáncer de mama metastásico y receptor hormonal positivo, que no hayan sido previamente tratadas con trastuzumab.
- ➔ Cáncer de mama precoz.
 - Después de cirugía, quimioterapia y radioterapia.
 - Después de quimioterapia adyuvante con doxorubicina y ciclofosfamida, en combinación con paclitaxel o docetaxel.
 - En combinación con quimioterapia adyuvante consistente en docetaxel y carboplatino.
 - En combinación con quimioterapia neoadyuvante seguido de tratamiento en adyuvancia con Herceptin® para enfermedad localmente avanzada (incluyendo enfermedad inflamatoria) o tumores > 2 cm de diámetro.
- ➔ Cáncer gástrico metastásico.

En combinación con capecitabina o 5-fluoracilo y cisplatino, está indicado para el tratamiento de pacientes adultos con adenocarcinoma gástrico o unión gastroesofágica metastásico, HER2-positivo, que no hayan recibido un tratamiento previo para metástasis.

5. HERRAMIENTAS ANALÍTICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE mAb Y PROTEÍNAS DE FUSIÓN

Las herramientas analíticas para la caracterización mAb y proteínas de fusión Fc se pueden dividir en dos grandes grupos: las herramientas para estudiar la funcionalidad y las herramientas para la caracterización físico-química. Entre las más usadas para el análisis de la funcionalidad en mAb se pueden destacar la técnica ELISA ('Enzyme-

Linked Immuno Sorbent Assay') y los ensayos de crecimiento de líneas celulares. Para la caracterización físico-química existe una amplia batería de herramientas analíticas que permiten estudiar los diferentes aspectos que caracterizan a los mAb y a las proteínas de fusión Fc, como son la interacción entre proteínas, el estudio de la estructura, la identificación química, la separación de compuestos y la cuantificación. Entre ellas se puede destacar diferentes técnicas como la Resonancia por Plasmones Superficiales ("Surface Plasmon Resonance", SPR), el "Wester Blotting", la Citometría de Flujo, la Clasificación Fluorescencia-Activada de la Célula ('Fluorescence activated cell sorting', FACS, que es una forma particular de aplicación de la citometría de flujo), la Resonancia Magnética Nuclear (RMN), la espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC), la Dispersión Dinámica de la Luz ('Dynamic Light Scattering', DLS), la Espectroscopia de Fluorescencia Intrínseca de Triptófanos ("Intrinsic Tryptofan Fluorescence Spectroscopy, IT-FS) la Espectrometría de Masas (Mass Spectrometry, MS) y técnicas separativas como la electroforesis y la cromatografía [101].

A continuación se detallan las herramientas cromatográficas, así como la detección por espectrometría de masas, más usuales para la caracterización de mAb y proteínas de fusión Fc, ya que esta Tesis Doctoral se ha basado en el uso de ambas técnicas acopladas.

Además, se incluye un apartado para describir el empleo de herramientas y estrategias quimiométricas, las cuales son de gran utilidad en estudios de caracterización estructural de proteínas complejas, como las analizadas en esta Memoria.

5.1. Cromatografía de líquidos

Según la definición de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines y la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, 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* [102]. La cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a diversos detectores (absorción UV/Visible, fluorescencia, o espectrometría de masas) es una técnica bien establecida y conocida para la caracterización físico-química de proteínas en general y de mAb terapéuticos y de proteínas de fusión Fc en particular [103].

Los diferentes modos de uso de la cromatografía líquida que se aplican a la caracterización y estudio de mAb terapéuticos y derivados, se pueden dividir de forma general en modos no desnaturalizantes y desnaturalizantes. Los primeros, también llamados modos nativos, se caracterizan por el uso de fases móviles que no desnaturalizan a la proteína, de manera que la separación tiene lugar manteniendo la conformación original de la misma [104]. Por el contrario, los modos desnaturalizantes utilizan fases móviles agresivas para la estructura de proteína (pH elevados, fuerzas iónicas que no mantiene el punto isoeléctrico de la proteína, etc.) por lo que mediante el proceso cromatográfico se desnaturaliza la proteína [105,106].

A continuación se describen con mayor detalle los modos cromatográficos que forman parte de cada uno de estos dos grupos.

5.1.1. Modos cromatográficos no desnaturalizantes

Entre los modos no desnaturalizantes podemos destacar la Cromatografía de Exclusión Molecular ("Size Exclusion Chromatography", SEC), la Cromatografía de Intercambio Iónico ("Ionic Exchange Chromatography" IXC) y la Cromatografía de Interacción Hidrofóbica ("Hydrophobic Interaction Chromatography", HIC). En cada uno de estos modos, la separación cromatográfica se basa en un principio físico-químico diferente, es decir, se basa en diferentes propiedades de las proteínas, por lo que con cada una de estos modos se puede obtener un tipo de información diferente pero complementaria entre sí acerca de la proteína analizada.

5.1.1.1. Cromatografía de exclusión molecular

La SEC se basa en la separación de moléculas en función de su volumen hidrodinámico y para ello se utiliza una columna cilíndrica con flujo laminar. Por lo tanto, este tipo de cromatografía separa, en principio, moléculas en función de su peso molecular (ya que se supone que, a mayor peso molecular, mayor volumen hidrodinámico).

La separación de proteínas en SEC se basa en la separación de las macromoléculas en una columna cromatográfica, frecuentemente de sílice empaquetada, que actúa como un tamiz molecular en el que las partículas más pequeñas se quedan retenidas porque son capaces de penetrar más profundamente entre las partículas de sílice, mientras que las de mayor tamaño estérico serán menos retenidas por impedimento estérico y eluirán

antes. De esta manera en SEC, las moléculas de mayor tamaño molecular eluirán antes que las de menor tamaño molecular. La separación ocurre sin que exista ninguna interacción entre la fase estacionaria y el analito, y se debe solo mediante la permeabilidad de la proteína entre los poros de sílice. No obstante, también existen fuerzas secundarias que influyen en la resolución. Estas fuerzas secundarias se producen por la interacción de los grupos silanol libres en la fase estacionaria. Para minimizar estos efectos es necesario la optimización de las condiciones cromatográficas para obtener una adecuada separación [107].

La SEC es una potente herramienta analítica para la separación de proteínas terapéuticas como son los mAb y las proteínas de fusión [108] y se usa tanto en el proceso de purificación de la proteína terapéutica como en el control analítico del fármaco una vez desarrollado. La cromatografía de exclusión molecular de altas prestaciones ((SE)HPLC) es la técnica usada por excelencia para la caracterización y cuantificación de la distribución de la masa molar de mAb y derivados [109,110], tanto en la caracterización de agregados como en la de fragmentos de la proteína.

Para la estimación de la masa molecular de los analitos en estudio es necesario hacer una "calibración de la columna". Esta calibración consiste en el análisis de un patrón comercial que contiene una mezcla proteínas de las que se conoce exactamente la masa molecular de cada una de ellas, de manera que se puede establecer una relación funcional (no lineal) entre los tiempos de retención que se obtienen al analizar con una determinada columna esta mezcla de proteínas, y las correspondientes masas moleculares. Mediante la ecuación de la función establecida se puede estimar la masa molecular de una proteína desconocida [107].

Se considera este modo cromatográfico como no desnaturizante, ya que la fase móvil debe de estar compuesta por disoluciones tampón a pH que no desnaturalicen la proteína, de manera que es analizada en su conformación nativa.

La técnica (SE)HPLC usualmente conlleva detección mediante absorción UV/Vis. Recientemente, y empleando equipos de UHPLC, se ha podido acoplar a un espectrómetro de masas. Este acoplamiento ha sido posible gracias al empleo de fases móviles compuestas por sales volátiles –en lugar de no volátiles- que permiten la correcta ionización de la muestra para la detección mediante espectrometría de masas [109,111,112].

Es muy usual el empleo de esta técnica ((SE)HPLC o (SE)LC-MS) en estudios de estabilidad ya que, como se ha mencionado anteriormente, es la técnica por excelencia para la detección de agregados solubles de proteínas terapéuticas en disolución, pues la presencia de estos agregados en un medicamento o preparación farmacéutica puede tener grandes repercusiones en cuanto la seguridad y eficacia [113].

5.1.1.2. Cromatografía de intercambio iónico

La IXC 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 eléctricas fijas que retienen contraiones móviles, los cuales se intercambian por iones de la fase móvil. De esta forma, la separación de proteínas se lleva a cabo por competencia entre entidades con distinta carga superficial y los grupos con carga opuesta sobre una matriz de intercambio iónico (fase estacionaria). La separación de las proteínas se basa por tanto en su punto isoeléctrico.

Existen dos variedades de cromatografía de intercambio iónico: la Cromatografía de Intercambio Aniónico (“Anionic Exchange Chromatography”, AXC) y Cromatografía de Intercambio Cationico (“Cationic Exchange Chromatography”, CXC). La más usada en el análisis de mAb es la CXC, ya que estas proteínas presentan más cargas positivas (aminoácidos con cadenas laterales básicas) en su superficie que negativas, es decir, son proteínas con punto isoeléctrico básicos.

Mediante esta cromatografía se puede obtener información de la distribución de carga superficial de una proteína terapéutica [114], de modo que va a permitir la caracterización de la heterogeneidad de su carga y obtener el perfil de variantes de carga de la misma.

Además, mediante CXC se pueden determinar modificaciones postraduccionales. Algunas de estas modificaciones producen un cambio en la carga neta de la proteína, y en función de la carga que le confieren, se pueden dividir en modificaciones ácidas (introducen cargas negativas en la superficie de la proteína) y modificaciones básicas (introducen cargas positivas en la superficie de la proteína). Esto lleva a que se puedan distinguir en el cromatograma tres tipos de zonas: la zona de variantes de carga ácidas, la zona correspondiente al pico de la especie neutra (mayoritaria) y la zona de variantes de carga básicas. En CXC las variantes ácidas eluirán antes que el pico de la variante

neutra, y por último las variantes básicas. Lógicamente, en el modo de AXC, el orden de elución es justo al contrario [115].

Entre las PMT detectables mediante IXC se encuentran las que inducen carga negativa, como la deamidación, la oxidación de la metionina, la glicación y la presencia de ácido siálico en los glicanos; y las que inducen carga positiva, como son la formación de ácido piroglutámico y la eliminación de las lisinas C-terminales [116].

Para que se produzca la separación cromatográfica es necesario aplicar un gradiente creciente en la fase móvil de concentración salina, de pH o ambos juntos. Inicialmente, en este tipo de cromatografía se usaba únicamente gradientes salinos, pero este tipo de práctica conlleva grandes tiempos de análisis, y por ello actualmente se emplea un gradiente solo de pH o combinado con uno salino [117,118].

Al igual que ocurre en (SE)HPLC, en la técnica (IX)HPLC suele realizarse la detección mediante un detector de UV/visible. El uso de sales no volátiles en las fases móviles dificulta el acoplamiento a la detección mediante espectrometría de masas. Recientemente se ha propuesto, el uso de sales volátiles en las fases móviles que ha permitido el acoplamiento a este tipo de detector para el análisis de algunos mAb terapéuticos comerciales [119,120,121]. No obstante, la complejidad de este tipo de cromatografía, unido a la complejidad inherente de muchos mAbs, y sobre todo, de las proteínas de fusión Fc, hace que no siempre sea viable este acoplamiento, como se discute en el Capítulo IV de esta Memoria de Tesis Doctoral.

5.1.1.3. Cromatografía de interacción hidrofóbica

La HIC separa proteínas en función de las diferencias de hidrofobicidad en su superficie mediante una interacción reversible entre las proteínas y la superficie hidrofóbica de la resina. Dicha interacción está influenciada significativamente por la presencia de ciertas sales en la fase móvil. Una alta concentración de sal mejora la interacción mientras que la disminución de la concentración de sal debilita la interacción entre la proteína y la resina. La separación se produce debido a que a medida que la fuerza iónica es reducida, la interacción entre la proteína y la resina se reduce y la proteína con menos hidrofobicidad eluye primero. La proteína más hidrófoba eluye al final, lo que requiere una mayor disminución en la concentración de la sal para revertir la interacción.

Este tipo de cromatografía es usada tanto para fines analíticos y en la purificación de proteínas, al igual que los modos cromatográficos anteriores. Como las muestras deben

estar en una alta concentración de sal para promover la interacción hidrofóbica, esta cromatografía es muy útil para los pasos intermedios directamente después de una separación por intercambio iónico en procesos de purificación de proteínas terapéuticas.

La cromatografía de fase inversa (que es comentada seguidamente, en el apartado 5.1.2.1) también separa proteínas en función de la hidrofobicidad. Si comparamos, las resinas para HIC son menos hidrofóbicas que las resinas para cromatografía de fase inversa, por lo que la interacción con la proteína será menor. Debido a las grandes interacciones que se da entre las resinas de fase inversa y la proteína, es necesario el uso de fases móviles orgánicas para la elución como el acetonitrilo o el metanol. Estas fases móviles orgánicas desnaturalizan la proteína por lo que la ventaja que presenta la HIC es que se usas fases móviles que mantienen a la proteína en estado nativo [122].

La HIC ha sido usada en el análisis de mAb para la detección de la isomerización de la asparagina y las oxidaciones del triptófano y la metionina [123,124].

Al igual que ocurre con SEC y con IXC, existe incompatibilidad de las fases móviles (uso de sales no volátiles) para el acoplamiento a la espectrometría de masas, sin embargo recientemente se ha desarrollado el uso de fases móviles con sales volátiles que han minimizado este efecto hasta hacer factible dicho acoplamiento [125,126], aunque debe ser comprobado individualmente para cada proteína terapéutica.

5.1.2. Modos cromatográficos desnaturalizantes

Entre los modos cromatográficos desnaturalizantes podemos destacar la Cromatografía de Fase Inversa (“Reverse Phase Chromatography”, RPC) y la Cromatografía de Interacción Hidrofílica (“Hydrophilic Interaction Chromatography”, HILIC). Estos modos presentan la gran ventaja de su fácil acoplamiento a la detección mediante espectrometría de masas, ya que usan como fases móviles disolventes orgánicos compatibles con el detector. Por otro lado, tienen la desventaja de que son fases móviles agresivas para la proteína, lo que provoca una desnaturalización de la misma.

5.1.2.1. Cromatografía de fase inversa

La RPC se basa en la interacción hidrofóbica reversible entre la fase estacionaria y la proteína. Es una de las cromatografías más usada en el análisis de proteínas, aunque

también se aplica en procesos de purificación y 'desalting' (eliminación de sales del medio).

En este tipo de cromatografía es muy frecuente el uso de gradientes de composición de fase móvil. Las proteínas son anfífilas y, al contrario que las moléculas pequeñas, interaccionan con la fase estacionaria solo por pequeñas partes de la molécula, de manera que las partes hidrofílicas interaccionan con la fase móvil. Al inicio del gradiente, la fase móvil suele ser de naturaleza acuosa, pero a medida que el gradiente avanza, la molécula quedará totalmente desorbida de la fase estacionaria, provocando así su elución [127].

Usualmente se usan fases estacionarias apolares como son las fases estacionarias particuladas de C18 o C8. Como fases móviles se suele usar metanol o acetonitrilo. En numerosos casos se usa una pequeña proporción de un modificador, como puede ser el ácido trifluoroacético (TFA) o el ácido fórmico (FA), para mejorar el perfil de los picos cromatográficos y para la mejora de la ionización de las moléculas, en el caso de acoplamiento para detección con espectrometría de masas. Las fases móviles presentan la desventaja de que no son totalmente compatibles con la proteína y provocan su desnaturalización.

La (RP)HPLC es generalmente considerada como la técnica más eficiente y la más sensible de las cromatográficas para el análisis de mAb y derivados [128,129]. Ofrece una gran versatilidad en aplicaciones, permite analizar las proteínas de manera intacta, o los fragmentos de un mAb después de una digestión enzimática. Sin embargo, este modo de cromatografía frecuentemente está asociado con bajos % de recuperación, debido a la absorción de las proteínas en la fase estacionaria y debido a la baja capacidad de difusión que tienen en la fase móvil [130]. Para resolver estos problemas es necesario el uso de fases móviles compuestas por mezclas complejas de disolventes orgánicos [131,132,133] combinado con la aplicación de altas temperaturas (80-90°C) [134,135], para incrementar la difusión de las proteínas en la fase móvil.

Generalmente la detección en (RP)HPLC se realiza mediante espectrofotometría de absorción UV/Vis, pero la mayor ventaja de este modo cromatográfico es su acoplamiento a espectrometría de masas, especialmente a la espectrometría de masas de alta resolución. La compatibilidad de las fases móviles con la ionización de las proteínas, ha permitido el amplio desarrollo de este acoplamiento, llegando a ser la técnica por excelencia para la detección de isoformas de una proteína terapéutica [132,136]. En esta Memoria se ha empleado este modo cromatográfico acoplado a

espectrometría de masas de alta resolución para el análisis intacto de mAb (Capítulo II) y para el estudio de los mAb mediante diversas estrategias (Capítulo III).

5.1.2.2. *Cromatografía de interacción hidrofílica*

La HILIC es considerada una variante de la cromatografía en fase normal. Se emplea principalmente para analizar compuestos polares, como los azúcares presentes en las proteínas glicosiladas: los mAbs y algunas proteínas de fusión Fc. Los mecanismos de separación HILIC son una mezcla compleja de partición, que da como resultado una retención optimizada de los analitos polares. En esencia, una fase estacionaria polar, utilizada en combinación con una fase móvil con alto contenido de disolvente orgánico (>80% acetonitrilo) hace que se retengan analitos que son demasiado polares para quedar retenidos en columnas de fase inversa.

HILIC es un modo potente y efectivo para resolver casos difíciles, entre los que cabe destacar:

- ➔ Separación de analitos muy polares: esto es difícil sobre todo en fase inversas, ya que su retención débil limita el alcance de los parámetros de optimización del método y la selectividad.
- ➔ Detección por espectrometría de masas: algunas disoluciones para los analitos polares no son compatibles con la espectrometría de masas, mientras que las composiciones de elución por HILIC son ideales.

Generalmente la separación de analitos polares iónicos se suele hacer mediante cromatografía de intercambio iónico, pero ésta usa en la fase móvil disoluciones reguladoras del pH formadas por compuestos no volátiles que son incompatibles con la espectrometría de masas, como ha sido ya comentado. Además, cuando se aplica cromatografía de fase inversa altamente acuosa, se produce una baja retención y baja desolvatación en la fuente de ionización electrospray, por lo que también supone un problema en la detección con masas.

La aplicación más usada de este tipo de cromatografía, HILIC, es en el **análisis de glicanos** una vez liberados de la parte proteica del mAb [137]. El análisis de glicanos involucra la liberación del oligosacárido del esqueleto proteico mediante el corte enzimático con una enzima N-glicosidasa (PNGaseF) [138,139]. Normalmente los glicanos se marcan con un fluoróforo como puede ser la 2-aminobenzamida (2-AB), o el ácido aminobenzoico (2-AA), tras lo cual son analizados mediante (HILI)HPLC con

detección fluorescente. Este tipo de métodos tienen el hándicap que necesitan largos tiempos de marcaje de los glicanos, aunque hoy día se han desarrollado nuevos kits de marcaje que reducen mucho este tiempo. Normalmente, y tras la detección fluorescente, el cromatógrafo se acopla de espectrometría de masas, ya que como se ha mencionado anteriormente, las fases móviles son idóneas para que se efectúe este tipo de detección [137,140]. Esta estrategia ha sido empleada en el Capítulo IV de esta Memoria para el estudio de los glicanos de los mAbs.

5.2. Espectrometría de masas

La MS se ha convertido en la técnica más potente para estudiar la complejidad de las proteínas. En particular, la invención de la Ionización Mediante Láser Asistida por Matriz ("Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization", MALDI) y la Ionización por Electro spray ("Electrospray Ionization", ESI), ha permitido determinar las masas moleculares de las proteínas y e incluso conformaciones postrasduccionales de las mismas. Hoy en día es una técnica indispensable para la caracterización de estructural de mAb y derivados.

Para la detección mediante MS, una de las etapas cruciales es la etapa de ionización de la muestra. Hay varios tipos de **métodos de ionización** que se aplican a las proteínas terapéuticas: el ESI y su variante de ESI asistido con calor ("Heat Electro spray Ionization"), el MALDI, y los métodos de ionización ambiental [141]. Los métodos de ionización ESI y MALDI son detallados en los siguientes apartados (5.2.3. y 5.2.4.) de esta Memoria de Tesis Doctoral, ya que ambos se han empleado en las investigaciones realizadas.

Existen numerosos métodos de ionización ambiental, como son la 'Desorption by electro spray ionization' (DESI) y el 'Direct Analysis in Real Time' (DART) y otros de muy reciente desarrollo como el 'Matrix-Assisted Laser Desorption Electro spray Ionization (MALDESI) el 'Extractive Electro spray Ionization' (EESI) , el 'Atmospheric Solids Analysis Probe' (ASAP), el 'Jet Desorption Ionization' (JeDI), el 'Desorption Sonic Spray Ionization' (DeSSI), el 'Field-Induced Droplet Ionization' (FIDI), el 'Desorption Atmospheric Pressure Photoionization' (DAPPI), el 'Plasma-Assisted Desorption Ionization' (PADI), el 'Dielectric Barrier Discharge Ionization' (DBDI), el 'Liquid Microjunction Surface Sampling Probe Method' (LMJ/SSP), el 'Atmospheric Pressure Thermal Desorption Ionization' (APTDI), el 'Surface Sampling Probe' (SSP), el 'Fused-Droplet Electro spray Ionization' el (FD/ESI), el 'Helium Atmospheric Pressure Glow

Discharge Ionization' (HAPGDI), el 'Neutral Desorption Extractive Electrospray Ionization' (ND-EESI), el 'LAESI', 'Low-Temperature Plasma (LTP) Ionization', y el 'Laser Spray Ionization' (LSI). Estos últimos son de muy reciente desarrollo y no todos son aplicables a la ionización de proteínas [141].

La ionización ambiental más usada es la ionización DESI, que consiste en generar gotitas cargadas eléctricamente e iones producidos a partir de un electroespray, los cuales son dirigidos por un chorro de gas de alta velocidad a la muestra de interés, impactan sobre la superficie de la muestra, que se disuelve en esas gotitas cargadas eléctricamente. Debido al impacto, se generan iones de los componentes de la muestra, llamados gotitas secundarias, que son expulsadas de la superficie y recogidas en el tubo iónico de transferencia en la entrada a presión atmosférica de un espectrómetro de masas comercial, donde se analizan [142]. Es de aplicabilidad en proteínas, pero no son muchos los casos en los que ha sido usado este tipo de ionización [143].

Una vez realizada la ionización de la muestra, es necesario hacer uso de **analizadores** que posibiliten la separación de los iones en función de su masa, de manera que permitan su identificación. Un analizador debería ser capaz de distinguir entre diferencias muy pequeñas de masa. Además, los analizadores deberían permitir el paso del suficiente número de iones para dar lugar a corrientes de iones fácilmente medibles. Sin embargo, estas dos propiedades no son totalmente compatibles y siempre se debe llegar a un compromiso en el diseño. La capacidad de un espectrómetro de masas de discriminar masas similares se expresa en términos de su resolución, que viene dada por la expresión $R=m/\Delta m$, donde m es la masa nominal de la proteína en estudio y Δm es la mínima diferencia de masa que debe tener un ion para ser separado de otro ion de masa m y ser detectados en el espectro de forma claramente diferenciada. En el análisis de proteínas es necesario el uso de analizadores de alta resolución para poder detectar cambios estructurales, ya que la masa molecular que poseen es elevada.

Los analizadores de masas de alta resolución ("High Resolution Mass Spectrometry", HRMS) que se emplean usualmente en el análisis de proteínas son: el analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF), los analizadores de sector magnético (Ion Ciclotron), y los basados en trampa iónica como puede ser el analizador Orbitrap [144].

5.2.1. Enfoques analíticos en el análisis de mAb y proteínas de fusión F mediante espectrometría de masas

Existen tres enfoques analíticos en el análisis mediante espectrometría de masas de proteínas terapéuticas, que se conocen por sus términos en inglés como 'top-down', 'middle-down' y 'bottom-up'.

El enfoque 'top-down', también llamado análisis de proteínas intactas, no requiere tratamiento de la muestra, por lo que el tiempo para el análisis se ve bastante reducido. Sin embargo, la aplicación de la espectrometría de masas para elucidar la secuencia usando solo el análisis de la proteína intacta es muy limitado, cuando se compara con alguno de los otros dos enfoques. Aunque la información que se obtiene es más limitada, este tipo de enfoque ha encontrado utilidad en la detección de PTM e isoformas en mAb y proteínas de fusión [144,145].

Tradicionalmente, la caracterización o secuenciación de proteínas se ha llevado a cabo a través de proteólisis, mediante la acción de ciertas enzimas o mediante degradación química. Este enfoque es conocido como 'bottom-up' y consiste en el tratamiento enzimático de una proteína para romperla y obtener un gran número de péptidos. La proteína se estudia mediante la secuenciación de los péptidos uno a uno. Normalmente se producen péptidos de una longitud de aproximadamente 7- 20 aminoácidos, por lo que la muestra resultante es bastante compleja y, consecuentemente, el espectro de masas resultante también lo es. Se requieren tiempos altos de tratamiento de muestras para llevar a cabo las reacciones proteolíticas. Normalmente, antes de la detección de las masas de los péptidos es necesaria una separación cromatográfica. Este enfoque tiene malos resultados cuando la proteína no se encuentra bien purificada, ya que el digerido que se obtiene será aún más complicado y el porcentaje de cobertura de la secuencia una vez hecho el tratamiento de datos, será deficiente y no se podrán detectar importantes PTM e isoformas [146,147]. Generalmente la detección de masas se lleva a cabo utilizando un espectrómetro de masas de alta resolución en tándem (MS/MS).

Se pueden usar varias enzimas para la digestión enzimática en el enfoque bottom-up, como la tripsina (la más usada), la lys-C, la asp-N y la glu-C. La tripsina rompe la proteína por el residuo carboxilo de las argininas y lisinas, excepto cuando van seguidas de prolina. El uso de tripsina implica varias etapas de tratamiento de muestra: desnaturalización de la proteína (con urea, guanidina o surfactantes compatibles con la espectrometría de masas), reducción de los puentes disulfuro (con ditioneitol, DTT o tris(2-carboxietil)fosfina, TCEP), alquilación y tratamiento con la enzima que digiere la

proteína finalmente, neutralización de la enzima mediante tratamiento ácido. Normalmente la tripsina hay que dejarla reaccionar toda la noche [106].

El enfoque 'middle-down' es un tipo de enfoque emergente pero actualmente muy usado. Es una combinación del enfoque 'top-down' y el 'bottom-up', en el cual el objetivo es llegar a unas condiciones óptimas de análisis. Este enfoque implica el estudio de fragmentos de proteínas después de proteólisis o etapas de degradación pero en este caso los fragmentos son mayores que en el enfoque 'bottom-up'. Los péptidos resultantes después del tratamiento proteolítico suelen tener una longitud ente 20 y 100 aminoácidos, como consecuencia el número de péptidos en una muestra producida mediante el enfoque 'middle-down' será relativamente menos que el número producido con el tratamiento de 'bottom-up'. Esto significa que la complejidad de la muestra es mucho menor, por lo que se aumenta la probabilidad de detectar más péptidos y así se tiene un porcentaje de cobertura de la secuencia mayor. Un porcentaje de cobertura mayor implica mayor detección de PTM y mayores isoformas detectadas si se compara con el enfoque 'top-down' [148].

En la Figura I.11 se muestra un esquema resumen de los tres enfoques anteriormente mencionados.

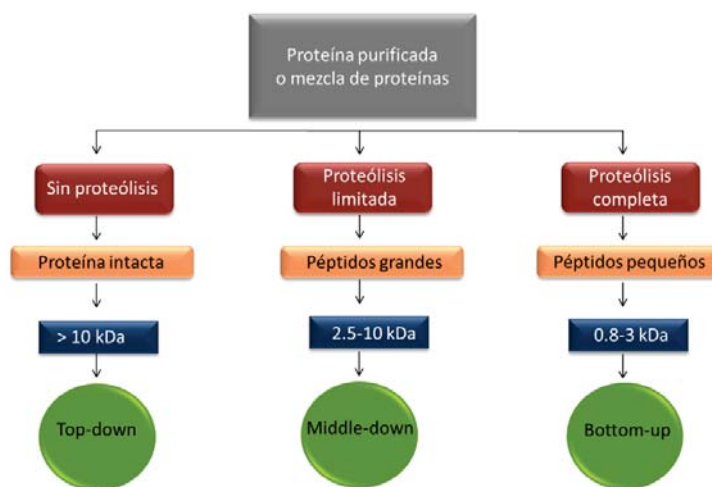


Figura I.11. Esquema de los enfoques analíticos en el análisis de proteínas mediante espectrometría de masas.

5.2.2. Tratamiento de datos de espectrometría de masas procedentes del análisis de mAb y proteínas de fusión Fc

El análisis de los espectros de masas procedentes de una proteína da lugar a conjuntos de datos de enorme complejidad. Tanto el análisis de proteínas intactas, como el de fragmentos, requieren del uso de softwares específicos que permitan clarificar y entender el espectro de masas obtenido. Debido a que la mayoría de las proteínas no existen como una sola entidad, cada especie da lugar a un estado de carga diferente, se originan complicados espectros de masas.

En el análisis de proteínas intactas, la mayoría de las especies proteicas no están resueltas cromatográficamente, lo que implica un solapamiento entre estados de carga, cada una con su distribución isotópica. Además, se pueden formar aductos con los iones Na^+ y K^+ . Cada entidad de proteína tiene estados de carga diferente, que llegan a valores de carga mayores de 60. Todo esto da lugar a que a cada punto del cromatograma le corresponde un espectro de masas muy complejo que no puede ser interpretado a simple vista. Para solucionar estos problemas y poder calcular la masa de cada uno de los componentes de la muestra, es necesario el uso de programas de deconvolución de proteínas, que se basan en la aplicación de algoritmos matemáticos que emplean diferentes principios para deconvolucionar los picos (agrupando por cargas y masas), de manera que darán como respuesta una masa por cada isoforma de la proteína. Generalmente, cada casa comercial posee paquetes informáticos que aplican estos algoritmos, como por ejemplo BiopharmaFinder[®] o MaxEnt[®] [144]. En la Figura I.12 se muestra un espectro de masa procedente de un mAb intacto analizado mediante cromatografía líquida de ultra altas prestaciones en fase inversa acoplada a un espectrómetro de masas Orbitrap, específicamente un sistema (RP)UHPLC-(HESI/Orbitrap)MS.

En el análisis de fragmentos de proteínas también es necesario el uso de complejos algoritmos que permitan recomponer toda la información que el espectro de masas contiene, para así poder "reconstruir" la proteína con un alto porcentaje de cobertura ('coverage') de su estructura y poder determinar las posibles PTM e isoformas.

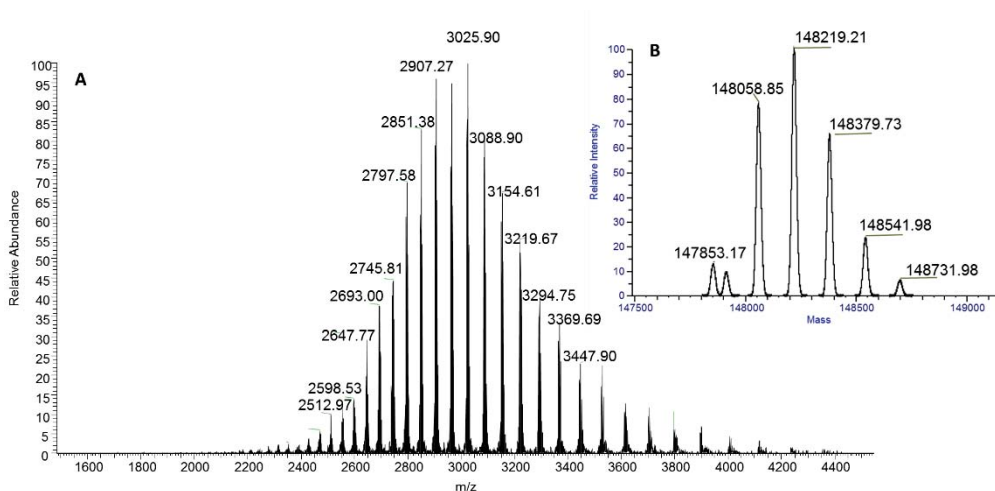


Figura I.12. (A) Espectro de masas de un mAb intacto analizado empelando (RP)UHPLC-(HESI/Orbitrap)MS. (B) Espectro de masas deconvolucionado. Los espectros seleccionados en esta imagen son de elaboración propia.

5.2.3. Ionización mediante láser asistida por matriz acoplada a un detector de masas de tiempo de vuelo

A principios de los años 70 se desarrolló la técnica MALDI acoplada a un detector de masas de tiempo de vuelo (MALDI/TOF/MS). Inicialmente, el láser comenzó a utilizarse en espectrometría de masas para la desorción de iones, el problema que causaba era que daba como resultado espectros poco intensos. Más adelante, se descubrió que mezclándolos con una matriz de naturaleza orgánica, la luz del láser era absorbida de forma más eficiente y los espectros que se obtenían tenían una mayor intensidad. La técnica MALDI/TOF/MS permite detectar moléculas en un amplio rango de masas moleculares y permite ionizar péptidos y proteínas, sin ruptura durante el proceso. Esta técnica ha encontrado hoy en día una amplia aplicación en el análisis de proteínas, así como en microbiología donde se realiza la detección e identificación de bacterias a partir de proteínas específicas [149].

La fuente de ionización en MALDI utiliza un láser ultravioleta de longitud de onda de 337 nm, que produce la desorción y la ionización de la muestra con la ayuda de una matriz orgánica. Para ello, la muestra se mezcla con la matriz orgánica fotosensible en exceso sobre una placa metálica, y se deja secar al aire libre unos minutos. De esta manera, la muestra y la matriz cristalizan juntas cuando se evapora el disolvente. A continuación,

la placa se introduce en el MALDI y se somete a pulsos cortos de láser en alto vacío, lo que provoca que la absorción de energía por parte de la matriz sea convertida en energía de excitación y en transferencia de H^+ a la muestra (ionización) dando lugar, normalmente, a especies monocargadas. El área irradiada, de unas pocas micras, se calienta dando lugar a la desorción de los iones de fase sólida a fase gaseosa. El papel fundamental de la matriz es absorber y, después, transmitir la energía del láser a la muestra, facilitando su ionización. La matriz más utilizada es el ácido α -ciano-4-hidroxi-*trans*-cinámico (HCCA) [149].

El analizador de masas más usado que se acopla a MALDI es el TOF. Tras la ionización, los iones generados se aceleran mediante la aplicación de un campo eléctrico y pasan por un analizador. El analizador tipo TOF separa los iones procedentes de la muestra en relación con su relación masa/carga (m/z). Esta relación determina el tiempo que tarda un ion en alcanzar el detector (tiempo de vuelo). Como es de esperar, los iones más pequeños "vuelan" más rápido y alcanzan antes el detector, mientras que los de mayor masa tardan más. La mayor parte de los iones que se forman tienen la carga de un protón (H^+). De esta manera, la relación masa/ carga en realidad equivale directamente a la masa molecular de los iones generados.

La Figura I.13 muestra un esquema de la técnica MALDI/TOFMS.

Existe un modo de espectrometría de masas en tándem con un analizador TOF denominado PSD ('Post source decay'). Durante el "vuelo" a través del tubo, se da un proceso de descomposición metaestable denominado PSD, útil para según qué aplicaciones. Es necesario separar estos fragmentos, en un analizador de tipo lineal esto no es posible ya que los iones formados por PSD tienen la misma velocidad que el ion original y viajan juntos hasta el detector; para separarlos se emplean analizadores de tipo reflector que trabajan con voltajes variables para finalmente obtener un único espectro de fragmentación PSD [150].

La ventaja que tiene la técnica MALDI/TOFMS es que permite obtener la masa molecular de una proteína sin tener que hacer deconvolución de los espectros de masas, ya que los iones se monocargan, y el espectro de masas indica directamente la masa molecular del ion del compuesto. Es decir, los espectros de masas generados no son complejos y no se requiere del uso de complejos programas informáticos de deconvolución de los mismos.

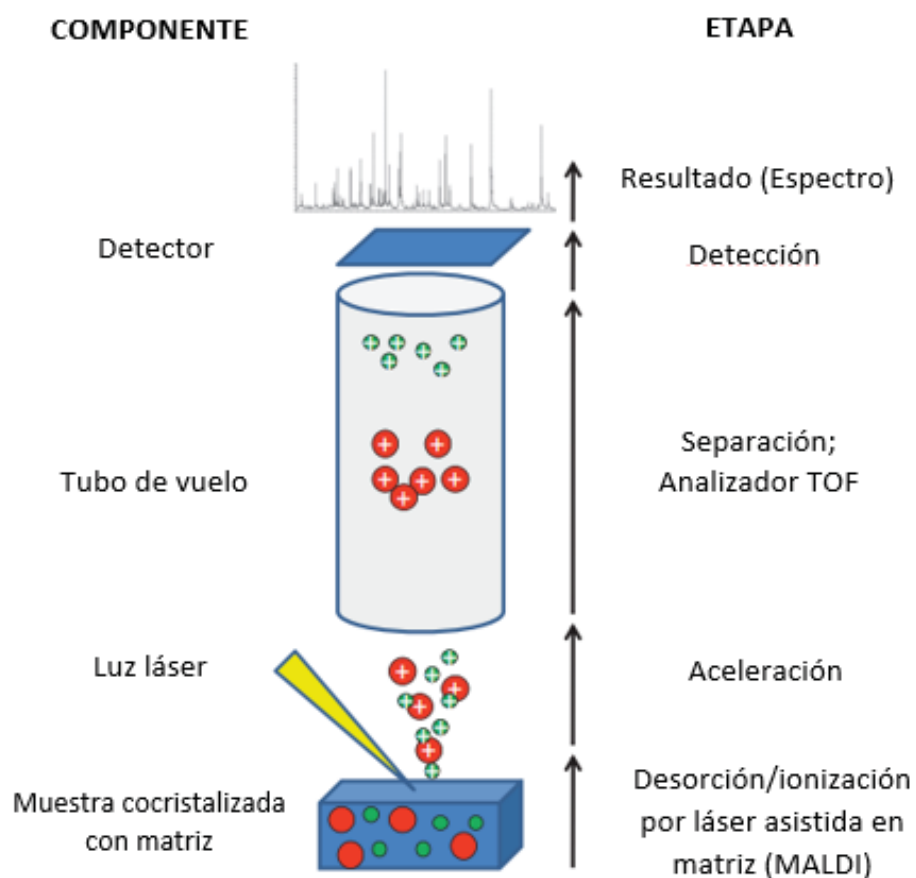


Figura I.13. Espectrometría de masas MALDI/TOF. Fuente [151].

La espectrometría de masas MALDI/TOF ha sido ampliamente usada para la identificación de proteínas, entre ellas mAb terapéuticos, generalmente después de un proceso de digestión enzimática de la proteína en un enfoque bottom-up [152,153]. También ha sido usada esta técnica para la detección de glicanos una vez liberados de la estructura proteica del mAb [154].

5.2.4. Ionización electrospray acoplada a un detector de masas de alta resolución Orbitrap

La ionización ESI es uno de los métodos de ionización de masas más usados en la actualidad, y juntamente con la ionización MALDI, son los métodos conocidos como

métodos de ionización suave. La ionización ESI se usa generalmente para sistemas de espectrometría de masas acoplados a técnicas de cromatografía líquida.

La ionización por electroespray se produce haciendo pasar la muestra en disolución a través de un capilar al que se aplica un alto potencial eléctrico (2.5-6.0 Kv). A la salida del capilar la solución se dispersa en forma de spray formado por pequeñas gotas cargadas, las cuales se evaporan rápidamente por un proceso de desorción del campo eléctrico o de evaporación del disolvente, liberando moléculas (péptidos o proteínas) protonadas en fase gaseosa. Al contrario que ocurre con la ionización MALDI, en ESI las moléculas se multicargan en su superficie, dando lugar a diferentes especies cargadas para una misma molécula. En el caso de proteínas, los extremos N-terminales y los residuos de histidina, arginina y lisina son los candidatos a protonarse [155]. La Figura I.14 muestra un esquema de la ionización ESI.

Existe una variante de la ionización ESI que es la ionización HESI. El fundamento de la ionización es el mismo, pero además de los altos voltajes, es posible la aplicación de elevadas temperaturas a la fuente de ionización, lo que favorece la solvatación y la ionización de la muestra.

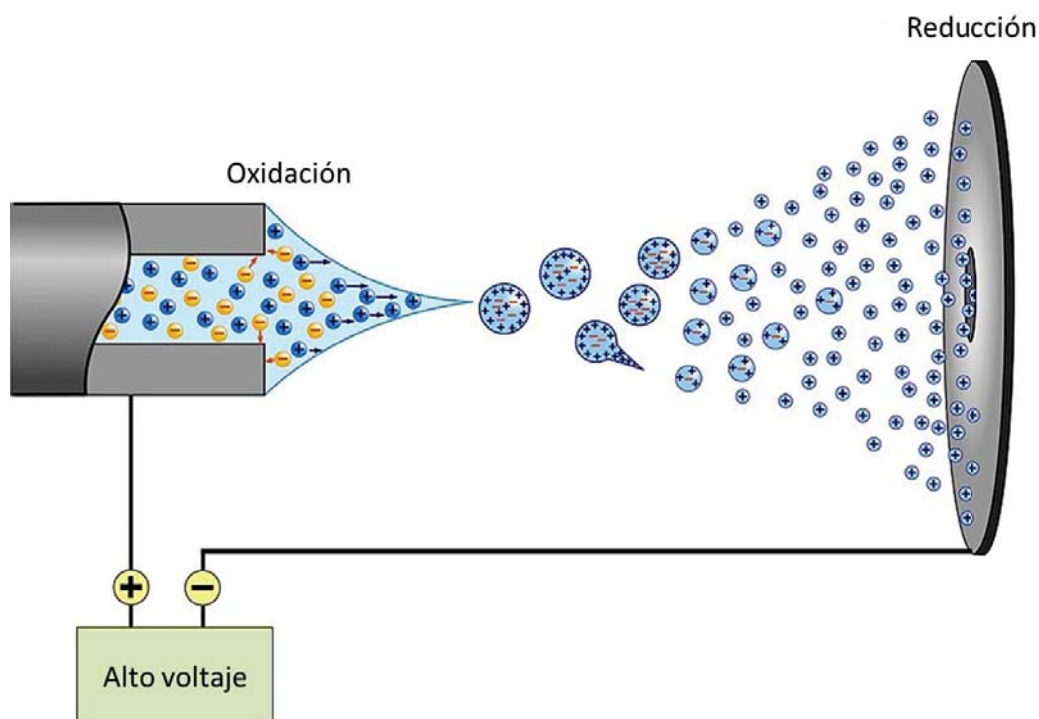


Figura I.14. Esquema de fuente de ionización ESI. Adaptación fuente [156].

El analizador MS(Orbitrap), diseñado recientemente por Alexander Makarov, pertenece al grupo de analizadores de trampa iónica que no incluye campos magnéticos o campos eléctricos producidos por radio frecuencias [157]. Está basado en un nuevo principio físico: separación de los iones en un campo eléctrico oscilante. Consiste en dos electrodos, uno exterior con forma de barril y un electrodo interior coaxial, ambos forman un campo electrostático. Los iones son inyectados tangencialmente en un campo eléctrico entre los electrodos y quedan atrapados entre ellos porque su atracción electrostática hacia el electrodo interior es contrarrestada por la fuerza centrífuga. De esta manera los iones dan vueltas armónicamente alrededor del electrodo central, también se mueven de adelante hacia atrás del eje central. Así, los iones con una específica relación masa-carga se mueven en anillos que oscilan alrededor del electrodo central, la frecuencia de estas oscilaciones armónicas es independiente de la velocidad del ion y es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la relación masa-carga ($\omega = (k (m/z))^{1/2}$). Una vez que los iones han entrado en el analizador, se detiene la rampa de potencial y se convierte en estática; de esta manera la detección puede comenzar. Cada paquete contiene multitud de iones a diferentes velocidades, los iones se mueven con diferentes frecuencias longitudinales pero con la misma frecuencia axial. Los iones son detectados en la trampa llamada C-trap, al reducir rápidamente los voltajes y al aplicar voltajes en la C-trap, viajando en paquetes hacia ella [158,159]. Un esquema del detector MS(Orbitrap) es mostrado en la Figura I.15.

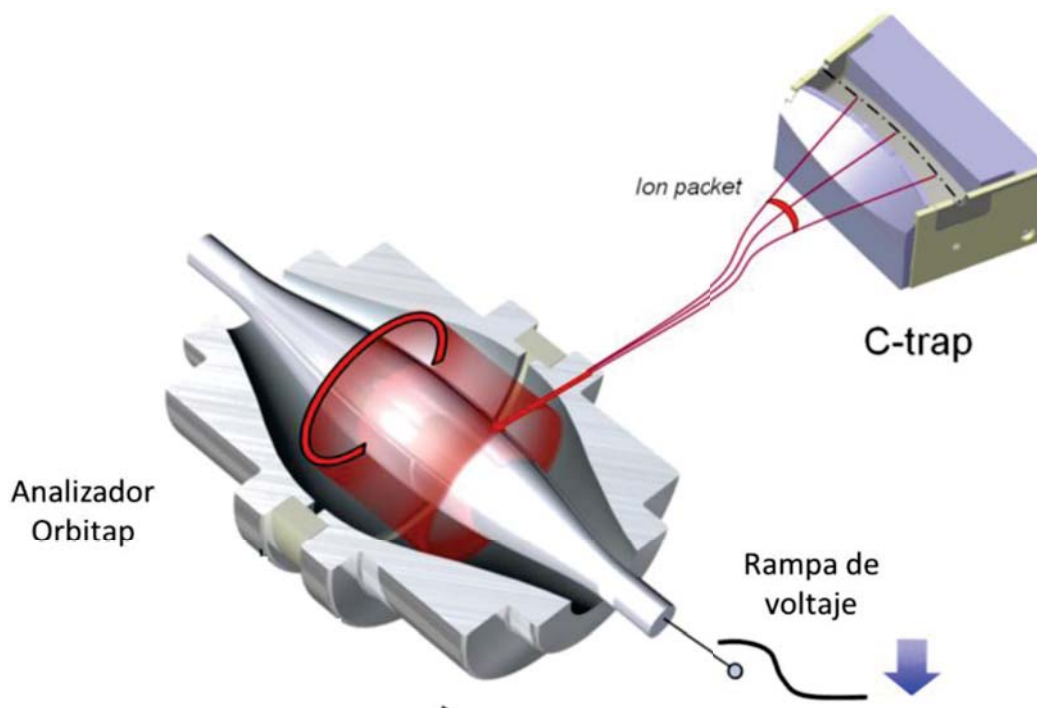


Figura I.15. Esquema del detector MS(Orbitrap). Adaptación fuente [160].

Este tipo de analizador permite seleccionar la resolución de trabajo (de 1,000,000 FWHM a m/z 200). Es un detector de masas de alta resolución y puede operar en detección de masas en tándem. Esta comercializado en exclusiva por la casa comercial Thermo Fisher Scientific (EE.UU.).

Este analizador puede estar acoplado a diferentes fuentes de ionización, pero en el análisis de proteínas la más usual es la ionización con HESI. Es usado para multitud de aplicaciones en el análisis de proteínas y más concretamente en mAb, de hecho la casa comercial tiene un modelo específico de MS(Orbitrap) para el análisis de proteínas en el que intervalo de detección de masas es mayor. Se ha usado en numerosas publicaciones en el análisis de mAb terapéuticos con el acoplamiento a UHPLC, en cualquiera de los enfoques del análisis de proteínas [161,162,163], también se ha usado para la detección de glicanos [164].

5.3. Quimiometría

Cuando se tratan datos complejos es necesario la aplicación de técnicas matemáticas que permitan sacar conclusiones de ellos, para ello se hace uso de la quimiometría que

se define como *la ciencia que relaciona las medidas realizadas sobre un sistema o proceso químico con el estado del sistema mediante la aplicación de métodos matemáticos o estadísticos* [165,166]. Estas técnicas permiten extraer la información útil de datos complejos, de manera que sin el uso de ellas no sería posible obtener conclusiones de estos datos. Existe un término que se conoce como bioinformática, que se basa en la aplicación de tecnologías computacionales y estadísticas al análisis de datos biológicos, es la disciplina que aplica quimiometría a datos de análisis de proteínas [167,168,169].

Las técnicas quimiométricas aplicadas al establecimiento de modelos de reconocimiento de pautas se pueden dividir en dos subclases:

- ➔ **Técnicas no supervisadas**, en las que el modelo se construye sin información previa de las muestras. Es posible distinguir dos tipos: técnicas de análisis exploratorio de datos como pueden ser el análisis multivariante de la varianza ('Multivariate Analysis of Variance', MANOVA), el análisis de componentes principales ('Principal Component Analysis', PCA) y las técnicas de análisis de agrupamientos como el análisis jerárquico de agrupamientos ('Hierarchical Cluster Analysis', HCA).
- ➔ **Técnicas supervisadas**, que tienen como elemento común que el modelo se establece considerando información previa de la muestra, que se tiene en cuenta para la construcción del modelo, y que luego se utilizarán para predecir ese mismo tipo de información sobre muestras desconocidas. Estas técnicas se pueden dividir en dos tipos:
 - Métodos cualitativos: son métodos de clasificación en los que se predice un atributo, entre estos métodos se encuentran los métodos de análisis de la similitud, el análisis discriminante como pueden ser el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ('Partial Least Squares-Discriminant Analysis', PLS-DA) o los métodos de modelado de clases, en los que se define un recinto concreto para cada una de las clases como es la técnica de modelado flexible independiente por analogía de clases ('Soft Independent Modelling of Class Analogies', SIMCA).
 - Métodos cuantitativos: son los denominados métodos de regresión que permiten predecir el valor de una determinada propiedad de la proteína relacionada con su estructura y/o actividad, como puede ser la regresión en componentes principales ('Principal Component Regression', PCR), la

regresión por mínimos cuadrados parciales ('Partial Least Squares Regression', PLS-R) y el sistema de aprendizaje automático soportado por vectores ('Support Vector Machines Regression', SVMR).

La aplicación de las técnicas quimiométricas aplicadas al reconocimiento de pautas es un territorio que aún no ha sido aplicado extensamente en el ámbito del análisis de mAb y sus derivados [170]. El análisis aplicando técnicas quimiometría resulta muy útil en la comparación de espectros de masas complejos, como son los obtenidos a partir del análisis de un digerido de péptidos, también llamados "huellas dactilares peptídicas" ('peptide fingerprinting') de una proteína. Varios son los trabajos en lo que se aplica quimiometría al análisis de proteínas [171,172,173].

Seguidamente se van a describir solo las técnicas quimiométricas que han sido usadas en el tratamiento de datos de esta Tesis Doctoral.

1) Análisis de la similitud. Consiste en la comparación de dos vectores de datos que contienen la información deseada, elemento por elemento, para así obtener un parámetro del que se puede obtener información cuantitativa de cuánto se asemejan o difieren estos dos vectores. Existen diferentes índices de similitud para la comparación de vectores [174], y solo para el caso particular de vectores binarios existen más de 70 índices [175,176]. La mayoría de estos índices toman valores comprendidos entre 0 y 1.

Los índices de similitud más usados son el coseno (COS), el coeficiente de determinación (R^2) e índices basados en la distancia como el índice de Bray-Curtis, los cuales se detallan a continuación:

- **Coeficiente de determinación (R^2).** Es un índice de similitud derivado del análisis de la varianza. Cuando dos conjuntos de datos son comparados, R^2 cuantifica la fracción de la variabilidad de los datos que es explicada en el modelo particular. En este caso, si los elementos del vector se ajustan a un modelo lineal implica que ambos vectores siguen la misma dirección espacial y por lo tanto son similares.

A pesar de ser uno de los índices más usados, presenta la desventaja de que es insensible en diferenciar vectores que tengan diferente módulo, por lo tanto es insensible a la longitud del vector. En el caso de comparación de espectros tanto de masas como de UV/Vis, esta limitación puede obviarse si no se pretende comparar intensidades de picos. Para modelos lineales, el R^2 coincide con el

cuadrado del índice de la correlación de Pearson (R). El R^2 entre cualquier vector (V) y un vector de referencia (V_0) viene definido mediante la siguiente ecuación:

$$R^2(V, V_0) = \left(\frac{\sum_j (v_j - \bar{v}) \times (v_{0,j} - \bar{v}_0)}{\sqrt{\sum_j (v_j - \bar{v})^2 \times \sum_j (v_{0,j} - \bar{v}_0)^2}} \right)^2 \quad (1)$$

dónde v_j Y $v_{0,j}$ son los elementos de los vectores V y V_0 respectivamente. R^2 puede tomar valores comprendidos entre 0 y 1, implicando que el valor 0 significa una total diferencia y el valor 1 una total similitud.

Este índice de similitud es el que tiene implementado la casa comercial Agilent Technologies (EE.UU.) en su software ChemStation para determinación de la pureza espectral en datos procedentes de espectros de UV/Vis. Lo llaman 'similarity', lo calculan multiplicando el coeficiente de determinación por un factor de 1000 [177]. En el manual de la nueva versión de OpenLAB, también comercializada por Agilent Technologies, se ha podido comprobar que siguen usando el mismo índice de similitud al que denominan ahora 'match factor'. Como anécdota a destacar, en los diferentes manuales aparece erróneamente escrita la fórmula del 'match factor', ya que le falta incluir todo el término en una raíz cuadrada [178].

- ➔ Coseno (COS). El coseno del ángulo formado entre dos vectores describe la similitud entre ellos dos. La función COS, teóricamente está restringida a que adquiera valores entre +1 y -1, sin embargo, si los elementos del vector son solo valores positivos el valor COS solo adquiere valores entre 0 (vectores totalmente diferentes) y 1 (vectores totalmente iguales). El COS se define como:

$$\text{COS}(V, V_0) = \frac{\sum_j v_j \times v_{0,j}}{\sqrt{\sum_j v_j^2 \times \sum_j v_{0,j}^2}} \quad (2)$$

dónde v_j Y $v_{0,j}$ son los elementos de los vectores V y V_0 respectivamente.

El coeficiente COS es muy poco sensible cuando dos vectores son muy parecidos entre sí en ángulo, o lo que es igual, a similitudes muy altas. Este efecto ocurre por la propia definición de la función COS (a valores de ángulo próximos a 0, la pendiente de la función es cercana a cero). Este coeficiente, al igual que el coeficiente de determinación, tiene la limitación de que es insensible en distinguir vectores con el mismo ángulo y diferente módulo (no difiere entre longitudes de vectores).

➔ Índice Bray-Curtis (BC). Este índice ha sido ampliamente usado en biología y ecología, ya que fue propuesto para medir la disimilitud entre comunidades de plantas [179]. Adquiere valores ente 0 y 1. Se define mediante la siguiente ecuación:

$$BC(V, V_0) = 1 - \frac{\sum_j |v_j - v_{0,j}|}{\sum_j (v_j + v_{0,j})} \quad (3)$$

dónde v_j y $v_{0,j}$ son los elementos de los vectores V y V_0 respectivamente. Este índice cuantifica la diferencia (o la distancia) absoluta estandarizada entre dos vectores.

2) Análisis de componentes principales (PCA). Es una técnica multivariante exploratoria que analiza conjuntos de datos representando las observaciones descritas por varias variables dependientes, las cuales, generalmente, está intercorrelacionadas entre sí. PCA extrae la información relevante y no evidente de un conjunto de datos y expresa esta información en un nuevo conjunto de variables ortogonales. Como resultado de este análisis resulta un gráfico que muestra las posibles agrupaciones de los datos [180,181]. PCA se aplica a conjuntos de datos para hacer un análisis exploratorio de los datos, cuando no se tiene información previa de ellos.

Un PCA puede ser considerado como una rotación de las variables originales a un nuevo sistema que contiene ejes ortogonales. Estos nuevos ejes ortogonales, llamados "componentes principales" (PC), coinciden con la dirección de máxima variabilidad de las observaciones iniciales. La primera PC es escogida para minimizar la distancia total entre los datos y su proyección en la PC y se calcula a partir de la matriz de covarianza. Las siguientes PC son elegidas de manera similar, pero con la condición de que tienen que ser ortogonales a la primera (no pueden estar correlacionadas), puede haber tantas PC como variables originales, pero las primeras PC son las que explicaran la mayor variabilidad del sistema original. La selección de las PC se hace maximizando su correlación entre los datos y su proyección. Este análisis proyecta los datos originales en estas nuevas PC, estas nuevas proyecciones se les denominan 'scores'. Cada variable original tiene un "peso" en la generación de dichos 'scores', esto es lo que se conoce como 'loadings' o también como ponderales.

La ecuación general del modelo es la siguiente:

$$X = T \times P^T + e \quad (4)$$

dónde X es la matriz original de datos, T es la matriz de 'scores', P^T es la matriz traspuesta de 'loadings' y " e " es la matriz de error (o residuales)

3) Análisis multivariante de la varianza (MANOVA). Evalúa simultáneamente las diferencias entre las medias de dos o más conjuntos de datos multivariantes. Es una generalización del análisis de la varianza (ANOVA) cuando varias respuestas son investigadas con respecto a las variables de entrada (o también llamados factores). MANOVA evalúa la importancia de varios factores al comparar las medias de las variables de respuesta en los diferentes niveles de los factores (o variables de entrada). Este análisis compara las medias para varias variables de entrada con la variabilidad que existe dentro de varias variables de salida, y evalúa si es mayor o menor que ésta. Se asume hipótesis nula cuando la medias no difieren significativamente (valor $p > 0.05$) y se asume hipótesis alternativa cuando las medias difieren significativamente (valor $p \leq 0.05$). Existe una variabilidad entre grupos y una variabilidad dentro de grupos, la primera de ellas es la variación en las medias de cada una de las diferentes variables de entrada y la segunda es la variación de las medias entre las diferentes variables de entrada por cada factor. Para la comparación de las medias se usan varios métodos basados en la *t de Student*, entre los que cabe destacar: i) el método de Bonferroni (se usa para tamaños de muestras diferentes) y ii) basados en la distribución del rango "estudentizado", entre los que cabe destacar el método de Tukey (se usa para tamaño de muestras iguales). El método Tukey es más conservador que el de Bonferroni.

MANOVA presenta numerosas ventajas con respecto a ANOVA:

- Aumento de la potencia. Se puede utilizar la estructura de covarianza de los datos entre las variables de respuesta para probar la igualdad de medias al mismo tiempo. Si las variables de respuesta están correlacionadas, entonces esta información adicional puede ayudar a detectar diferencias muy pequeñas, las cuales no sería posible detectar mediante la ejecución de análisis ANOVA individuales.
- Detecta patrones de respuestas multivariadas. El factor puede afectar la relación entre las respuestas en lugar de afectar una respuesta individual. Los análisis de ANOVA no detectarán estos patrones multivariados.
- Controla la tasa de error por familia. La probabilidad de rechazar de manera incorrecta la hipótesis nula aumenta con cada ANOVA sucesivo. La ejecución de un solo MANOVA para probar todas las variables de respuesta al mismo tiempo mantiene la tasa de error por familia igual a su nivel alfa.

Introducción

Los análisis MANOVA requieren datos de poblaciones que sigan una distribución aproximadamente normal con varianzas iguales entre los niveles de factores. Sin embargo, los procedimientos de MANOVA funcionan bastante bien incluso cuando se viola el supuesto de normalidad, a menos que una o más de las distribuciones sean muy asimétricas o que las varianzas sean bastante diferentes.

Normalmente se aplica MANOVA en dos situaciones experimentales: i) tener información en una prueba estadística general sobre varias variables dependientes correlacionadas en lugar de realizar múltiples pruebas individuales, y ii) explorar como varias variables independientes influyen en algunos patrones de respuesta de las variables dependientes [182,183]. No puede ser aplicado cuando el número de muestras es mucho más pequeño que el número de variables ya que la matriz de varianzas-covarianzas no puede ser invertida.

REFERENCIAS

- [1] G. Walsh. Pharmaceuticals, biologics and biopharmaceuticals. En G. Walsh. Biopharmaceuticals, Biochemistry and biotechnology second edition, John Wiley & Sons, London (UK) (2003).
- [2] M.L. Franco Fraguas, E. Savio Quevedo, Medicamentos biotecnológicos. Conceptos básicos y relevancia en el contexto clínico, Tendencias en Medicina (2008) 5–12.
- [3] Informe INESME (Instituto de Estudios Médico-Científicos), Equivalencias terapéuticas de los medicamentos biotecnológicos, Madrid (2009).
- [4] B. Hughes, L.E Hann, The production of biopharmaceuticals. En W.H. Boehncke, H.H. Radeke (Eds) Biologics in general medicine. Springer, Berlin (Germany) (2007).
- [5] Los biosimilares en la UE, Guía informativa para profesionales sanitarios, Agencia Europea del Medicamento (EMA) (2017).
- [6] A. Kuriakose, N. Chirmule, P. Nair, Immunogenicity of biotherapeutics: causes and association with posttranslational modifications, J. Immunol. Res. 1 (2016) 1–18.
- [7] W.H. Boehncke, N.C. Brembilla, Immunogenicity of biologic therapies: causes and consequences, Expert Rev. Clin. Immunol. 14 (2018) 513–523.
- [8] Guideline on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-immunogenicity-assessment-biotechnology-derived-therapeutic-proteins-first-version_en.pdf (Consultado en agosto 2019).
- [9] International Federation of Pharmaceutical Manufacturers & Associations (IFPMA). Medicamentos bioterapéuticos. <https://www.ifpma.org/wpcontent/uploads/2016/01/IFPMABiosimilarSpanishWEB.pdf> (Consultado en agosto 2019).
- [10] W.S. Putnam, S. Prabhu, Y. Zheng, M. Subramanyam, Y.M.C. Wang, Pharmacokinetic, pharmacodynamic and immunogenicity comparability assessment strategies for monoclonal antibodies, Trends Biotechnol. 28 (2010) 509–516.
- [11] I. Suárez González, Tesis doctoral: Metodología ELISA para estudiar la estabilidad de medicamentos biotecnológicos. Universidad de Granada (2017).
- [12] V. Thomaz-Soccol, A.P. Anadey, R. R. Resende, Current developments in biotechnology and bioengineering, human and animal health applications. En A.M.M. Basso, G.S. Prado, P.B. Pelegriani, M.F. Grossi-de-Sa, Biopharmaceuticals and biosimilars, Elsevier, Amsterdam (The Netherlands) (2017).
- [13] S.D. Patil, D.G. Rhodes, D.J. Burgess, DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review, The AAPS Journal 7 (2005) 61–77.
- [14] T.J. Anchordoquy. Formulation Considerations for DNA-Based Therapeutics, in D.R. Lu., S. Øie, Cellular drug delivery. Humana Press, Totowa, NJ (2004).
- [15] G. Walsh, Biopharmaceutical benchmarks 2010, Nature Biotechnology 28 (2010) 917–924.
- [16] A.L. Nelson, E. Dhimolea, J.M. Reichert, Development trends for human monoclonal antibody therapeutics, Nature Reviews Drug Discovery 9 (2010) 767–774.
- [17] S. Rabindran, V. Yusibov, Novel expression systems for vaccine production, in E. Wen, R. Ellis, N.S. Pujar (Eds.), Vaccine development and manufacturing, Wiley and Sons, Hoboken, NJ (2014).
- [18] S. Ruiz, Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Evaluación de medicamentos biotecnológicos en la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), BWP

- (Grupo de Biológicos) y CHMP (Comité de Medicamentos de Uso Humano). 9a edición del curso de Biotecnología Aplicada a la Salud Humana (2006).
- [19] 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. DOUE, L136/1–33 (2004).
 - [20] EMA 3AB1A, Production and quality control of medicinal products derived by recombinant DNA technology, European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Human Medicines Evaluation Unit, London (UK) (1995).
 - [21] ICH Q6B, Specification: Test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva (Switzerland) (1999).
 - [22] ICH Q5D, Derivatization and characterisation of cell substances used for production of biotechnological/biological products, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva (Switzerland) (1997).
 - [23] ICH Q5B, Quality of biotechnological products: analysis of the expression construct in cells used for the production of r-DNA derived protein products, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva (Switzerland) (1995).
 - [24] ICH Q5E, Comparability of biotechnological/biological products subject to changes in their manufacturing process, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva (Switzerland) (2004).
 - [25] ICH Q5C, Quality of biotechnological products: stability testing of biotechnological/biological products, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva (Switzerland) (1995).
 - [26] ICH Q5A, Quality of biotechnological products: viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva (Switzerland) (1997).
 - [27] EMA CPMP/BWP/268/95 3AB8A, Note for guidance on virus validation studies: the design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses, European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Human Medicines Evaluation Unit, London (UK) (1996).
 - [28] EMA 3AB4a, Production and quality control of monoclonal antibodies, European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Human Medicines Evaluation Unit, London (UK) (1995).
 - [29] EMA CHMP/BWP/64/04, On the need to revise the guideline on production and quality control of monoclonal antibodies, European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Human Medicines Evaluation Unit, London (UK) (2004).
 - [30] EMA 3AB3A, production and quality control of cytokine products derived by biotechnological processes, European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Human Medicines Evaluation Unit, London (UK) (1990).
 - [31] EMA 3AB7A, Guideline on quality of biological active substances produced by transgene expression in animals, European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Human Medicines Evaluation Unit, London (UK) (2012).
 - [32] CHMP/49348/05, Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues,

- European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Human Medicines Evaluation Unit, London (UK) (2006).
- [33] CHMP/437/04, Guideline on similar biological medicinal products, European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Human Medicines Evaluation Unit, London (UK) (2005).
- [34] Jornada de formación en biotecnología 2018, <https://www.diariofarma.com/2018/09/17/los-medicamentos-biotecnologicos-ya-representan-el-20-de-los-disponibles> (Consultado en agosto 2019).
- [35] J. Soliveri, Nuevas tendencias en la investigación de medicamentos biotecnológicos, Universidad de Alcalá (2017).
- [36] Farmaindustria. Presidenta de Farmaindustria. XIV Encuentro de la industria farmacéutica española UIMP "Los nuevos medicamentos biológicos: revolución terapéutica y económica", Santander (2014).
- [37] J. Hernández Jiménez, Tesis Doctoral: Estudios de estabilidad de anticuerpos monoclonales terapéuticos; evaluación de la formación de agregados mediante cromatografía líquida analítica de exclusión por tamaños y sus efectos biológicos mediante ELISA y ensayos en cultivos celulares. Universidad de Granada (2019).
- [38] R.L. Stanfield, I.A. Wilson, Antibody molecular structure. En Z. An. (Eds) Therapeutic monoclonal antibodies, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ (2009).
- [39] Genoma España, Anticuerpos monoclonales terapéuticos, Genoma España y la Fundación General de la Universidad Autónoma de Madrid (2008).
- [40] V. González-Núñez, Modificaciones postraduccionales de las proteínas, Universidad de Salamanca, <http://diarium.usal.es/vgnunez/files/2012/11/9.-Modificaciones-Postraduccionales-de-las-Proteinas.pdf> (Consultado agosto 2019).
- [41] X. Zhong, J.F. Wright, Biological insights into therapeutic protein modifications throughout trafficking and their biopharmaceutical applications, *Int. J. Cell Biol.* 1 (2013) 1–18.
- [42] F. Higel, A. Seidl, F. Sörgel, W. Friess, N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 100 (2016) 94–100.
- [43] D.J. Harvey, A.H. Merry, L. Royle, M.P. Campbell, R.A. Dwek, P.M. Rudd, Proposal for a standard system for drawing structural diagrams of N- and Olinked carbohydrates and related compounds, *Proteomics* 9 (2009) 3796–3801.
- [44] N. Sethuraman, T.A. Stadheim, Challenges in therapeutic glycoprotein production, *Curr. Opin. Biotechnol.* 17 (2006) 341–346.
- [45] S. Sha, C. Agarabi, K. Brorson, D. Lee, S. Yoon, N-Glycosylation design and control of therapeutic monoclonal antibodies, *Trends Biotechnol.* 34 (2016) 835–846.
- [46] L. Liu, Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins, *J. Pharm. Scr.* 104 (2015) 1866–1884.
- [47] A. Planinc, J. Bones, B. Dejaegher, P. Van Antwerpen, Glycan characterization of biopharmaceuticals: Updates and perspectives, *Anal. Chim. Acta* 921 (2016) 13–27.
- [48] F. Higel, A. Seidl, F. Sörgel, W. Friess, N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 100 (2016) 94–100.
- [49] K. Zheng, C. Bantog, R. Bayer, The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability, *mAbs* 3 (2011) 568–576.

- [50] S. Matsumiya, Y. Yamaguchi, J. Saito, M. Nagano, H. Sasakawa, S. Otaki, M. Satoh, K. Shitara, K. Kato, Structural comparison of fucosylated and nonfucosylated Fc fragments of human immunoglobulin G1, *J. Mol. Biol.* 368 (2007) 767–779.
- [51] R. Upton, L. Bell, C. Guy, P. Caldwell, S. Estdale, P.E. Barran, D. Firth, Orthogonal assessment of biotherapeutic glycosylation: A case study correlating N-glycan core afucosylation of herceptin with mechanism of action, *Anal. Chem.* 88 (2016) 1259–1265.
- [52] Y. Kaneko, F. Nimmerjahn, J.V. Ravetch, Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation, *Science* 313 (2006) 670–673.
- [53] A. Epp, J. Hobusch, Y.C. Bartsch, J. Petry, G.M. Lilienthal, C.A.M. Koeleman, S. Eschweiler, C. Möbs, A. Hall, S.C. Morris, D. Braumann, C. Engellenner, J. Bitterling, J. Rahmöller, A. Leliavski, R. Thurmann, M. Collin, K.W. Moremen, R.T. Strait, V. Blanchard, A. Petersen, T. Gemoll, J.K. Habermann, F. Petersen, A. Nandy, H. Kahlert, M. Hertl, M. Wuhrer, W. Pfützner, U. Jappe, F.D. Finkelman, M. Ehlers, Sialylation of IgG antibodies inhibits IgG-mediated allergic reactions, *J. Allergy Clin. Immunol.* 141 (2018) 399–402.
- [54] T.S. Raju, R.E. Jordan, Galactosylation variations in marketed therapeutic antibodies, *mAbs* 4 (2012) 385–391.
- [55] M. Thomann, K. Reckermann, D. Reusch, J. Prasser, M.L. Tejada, Fc-galactosylation modulates antibody-dependent cellular cytotoxicity of therapeutic antibodies, *Mol Immunol.* 73 (2016) 69–75.
- [56] C.M. Karsten, M.K. Pandey, J. Figge, R. Kilchenstein, P.R. Taylor, M. Rosas, J.U. McDonald, S.J. Orr, M. Berger, D. Petzold, V. Blanchard, A. Winkler, C. Hess, D.M. Reid, I. V. Majoul, R.T. Strait, N.L. Harris, G. Köhl, E. Wex, R. Ludwig, D. Zillikens, F. Nimmerjahn, F.D. Finkelman, G.D. Brown, M. Ehlers, J. Köhl, Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1, *Nat. Med.* 18 (2012) 1401–1406.
- [57] T.A. Bowden, K. Baruah, C.H. Coles, D.J. Harvey, X. Yu, B. Song, D.I. Stuart, A.R. Aricescu, C.N. Scanlan, E.Y. Jones, M. Crispin, Chemical and structural analysis of an antibody folding intermediate trapped during glycan biosynthesis, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 17554–17563.
- [58] A.M. Goetze, Y.D. Liu, Z. Zhang, B. Shah, E. Lee, P.V. Bondarenko, G.C. Flynn, High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies increase serum clearance in humans, *Glycobiology* 21 (2011) 94–959.
- [59] Y.D. Liu, G.C. Flynn, Biologicals effect of high mannose glycan pairing on IgG antibody clearance, *Biologicals* 44 (2016) 163–169.
- [60] T. Rath, K. Baker, J.A. Dumont, R.T. Peters, H. Jiang, S. Qiao, W.I. Lencer, G.F. Pierce, R.S. Blumberg, Fc-fusion proteins and FcRn: structural insights for longer-lasting and more effective therapeutics, *Crit. Rev. Biotechnol.* 8551 (2015) 1549–7801.
- [61] G. Walsh, R. Jefferis, Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins, *Nat. Biotechnol.* 24 (2006) 1241–1252.
- [62] A. Rajpal, P. Strop, Y. A. Yeung, J. Chaparro-Riggers, J. Pon, Introduction: Antibody structure and function. En S.M. Chamow, T. Ryll, H.b. Lowan, D. Forson, Therapeutic Fc-fusion protein, Willley, Weinheim (Germany) (2014).
- [63] G. Arrufat, Congreso nacional de la sociedad Española de farmacia hospitalaria 8-10 noviembre 2018, <https://www.sefh.es/eventos/63congreso/ponencias/gemma-arrufat.pdf> (Consultado agosto 2019).
- [64] Zaltrap, Aflibercept, <https://botplusweb.portalfarma.com/documentos/2013/10/24/61227.pdf> (Consultado agosto 2019).

- [65] EMEA/H/C/002392, European Public Assessment Report (EPAR) Summary for Eylea, Annex I: Summary of Product Characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK) (2019).
- [66] EMEA/H/C/002532, European Public Assessment Report (EPAR) Summary for Zaltrap, Annex I: Summary of Product Characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK) (2017).
- [67] 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.* 35 (2004) 391–400.
- [68] Contemporary management and novel therapies in ovarian cancer-literature review - Scientific Disponible en: https://www.researchgate.net/figure/Scheme-1-The-mechanism-of-action-of-bevacizumab-Modified-from_fig1_327987914. (Consultado agosto 2019).
- [69] EMA/302947/2017, European public assessment report (EPAR) summary for Avastin, Annex I: Summary of product characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK) (2017).
- [70] EMEA/H/C/004728, European public assessment report (EPAR) summary for Mvasi, Annex I: Summary of product characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK) (2019).
- [71] EMEA/H/C/004697, European public assessment report (EPAR) summary for Zirabev, Annex I: Summary of product characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK) (2019).
- [72] M. Marty, X. Pivot, The potential of anti-vascular endothelial growth factor therapy in metastatic breast cancer: Clinical experience with anti-angiogenic agents, focusing on bevacizumab, *Eur. J. Cancer.* 44 (2008) 912–920.
- [73] R. L. Avery, D.J. Pieramici, M. D. Rabena, A. A. Castellarin, M. A. Nasir, M. J. Giust, Intravitreal Bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration, *Ophthalmology* 113 (2006) 363–372.
- [74] D.F. Martin, M. G. Maguire, S. L. Fine, G. Ying, G. J. Jaffe, J. E. Grunwald, C. Toth, Maryann R, F.L. Ferris, Ranibizumab and Bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: Two-year results, *Ophthalmology* 119 (2012) 1388–1398.
- [75] Scientific discussion of Erbitux, 2004. https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-discussion/erbitux-epar-scientific-discussion_en.pdf (Consultado agosto 2019).
- [76] EMA/13275/2014, European public assessment report (EPAR) summary for Erbitux, Annex I: Summary of product characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK) (2014).
- [77] R.A. Aiyer, B.B. Aggarwal, Tumor necrosis factors, *Cytolytic Lymphocytes Complement Eff. Immune Syst.* 2 (2018) 105–134.
- [78] EMEA/H/C/000240, European public assessment report (EPAR) summary for Remicade, Annex I: Summary of product characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK) (2019).
- [79] EMEA/H/C/002778, European public assessment report (EPAR) summary for Inflectra Erbitux, Annex I: Summary of product characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK) (2019).
- [80] EMEA/H/C/004020, European public assessment report (EPAR) summary for Flixabi, Annex I: Summary of product characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK) (2019).

- [81] EMEA/H/C/002576, European public assessment report (EPAR) summary for Remsima, Annex I: Summary of product characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK) 2019.
- [82] EMEA/H/C/004647, European public assessment report (EPAR) summary for Zessly, Annex I: Summary of product characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK) 2019.
- [83] K.E. Hostettler, U. Studler, M. Tamm, M.H. Brutsche, Long-term treatment with infliximab in patients with sarcoidosis, *Respiration* 83 (2012) 218–224.
- [84] A.D.M. Vorselaars, H.A. Crommelin, V.H.M. Deneer, B. Meek, A.M.E. Claessen, R.G.M. Keijsers, C.H.M. Van Moorsel, J.C. Grutters, Effectiveness of infliximab in refractory FDG PET-positive sarcoidosis, *Eur. Respir. J.* 46 (2015) 175–185.
- [85] A. Nakamura, T. Miyamura, E. Suematsu, Successful discontinuation of infliximab in a refractory case of Vasculo-Behçet disease, *Case Rep. Rheumatol.* 2016 (2016) 1–5.
- [86] A.A. Okada, H. Goto, S. Ohno, M. Mochizuki, Multicenter study of infliximab for refractory uveoretinitis in Behçet disease, *Arch. Ophthalmol.* 130 (2012) 592–598.
- [87] 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 (2017) 2232–2273.
- [88] EMEA/H/C/000165, European public assessment report (EPAR) summary for Mabthera, Annex I: Summary of product characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK) (2019).
- [89] EMEA/H/C/004112, European public assessment report (EPAR) summary for Truxima, Annex I: Summary of product characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK) (2019).
- [90] EMEA/H/C/004723, European public assessment report (EPAR) summary for Blitzma, Annex I: Summary of product characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK) (2019).
- [91] EMEA/H/C/004725, European public assessment report (EPAR) summary for Ritemvia, Annex I: Summary of product characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK) (2019).
- [92] EMEA/H/C/004724, European public assessment report (EPAR) summary for Rituzena, Annex I: Summary of product characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK) (2019).
- [93] EMEA/H/C/003903, European public assessment report (EPAR) summary for Rixathon, Annex I: Summary of product characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK) (2017).
- [94] EMEA/H/C/004729, European public assessment report (EPAR) summary for Riximyo, Annex I: Summary of product characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK) (2019).
- [95] EMEA/H/C/000278, European public assessment report (EPAR) summary for Herceptin, Annex I: Summary of product characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK) (2019).
- [96] P.S. Hall, D.A. Cameron, Current perspective - Trastuzumab, *Eur. J. Cancer.* 45 (2009) 12–18.
- [97] EMEA/H/C/004361, European public assessment report (EPAR) summary for Kanjinti, Annex I: Summary of Product Characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK) (2019).

- [98] EMEA/H/C/004916, European public assessment report (EPAR) summary for Ogivri, Annex I: Summary of Product Characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK) (2019).
- [99] EMEA/H/C/004323, European public assessment report (EPAR) summary for Ontruzant, Annex I: Summary of Product Characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK) 2019.
- [100] EMEA/H/C/004463, European public assessment report (EPAR) summary for Trazimera, Annex I: Summary of product characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK) (2019).
- [101] H. Kaur, S.R. Bhagwat, T.K. Sharma, A. Kumar, Analytical techniques for characterization of biological molecules - Proteins and aptamers/oligonucleotides, *Bioanalysis*. 11 (2019) 103–117.
- [102] L. S. Ettre, Nomenclatura para cromatografía, Unión internacional de química pura y aplicada, División de Química Analítica, Comisión para cromatografía y otras separaciones analíticas, Comisión para nomenclatura analítica, New Haven, CT (1995).
- [103] K. Mayolo-Deloisa, Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas, *Rev Mex Ing Quim* 11 (2012) 415–429.
- [104] A. Goyon, V. D'Atri, B. Bobaly, E. Wagner-Rousset, A. Beck, S. Fekete, D. Guillarme, Protocols for the analytical characterization of therapeutic monoclonal antibodies. I – Non-denaturing chromatographic techniques, *J. Chromatogr. B*. 1058 (2017) 73–84.
- [105] V. D'Atri, A. Goyon, B. Bobaly, A. Beck, S. Fekete, D. Guillarme, Protocols for the analytical characterization of therapeutic monoclonal antibodies. III – Denaturing chromatographic techniques hyphenated to mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*. 1096 (2018) 95–106.
- [106] B. Bobaly, V. D'Atri, A. Goyon, O. Colas, A. Beck, S. Fekete, D. Guillarme, Protocols for the analytical characterization of therapeutic monoclonal antibodies. II – Enzymatic and chemical sample preparation, *J. Chromatogr. B* 1060 (2017) 325–335.
- [107] A. Chakrabarti Separation of monoclonal antibodies by analytical size exclusion chromatography. En T. Boldickel, *Antibody Engineering*, Intechopen, London (UK) (2018).
- [108] P. Hong, S. Koza, Size-exclusion chromatography for the analysis of proteins biotherapeutics and their aggregates, *J. Liq. Chromatogr. R. T.* 35 (2012) 2923–2950.
- [109] M. Habberger, M. Leiss, A.K. Heidenreich, O. Pester, G. Hafenmair, M. Hook, L. Bonnington, H. Wegele, M. Haindl, D. Reusch, P. Bulau, Rapid characterization of biotherapeutic proteins by size-exclusion chromatography coupled to native mass spectrometry, *mAbs* 8 (2016) 331–339.
- [110] A. Oliva, M. Llabrés, Validation of a Size-Exclusion Chromatography Method for Bevacizumab Quantitation in Pharmaceutical Preparations: Application in a Biosimilar Study, *Separations*. 6 (2019) 430.
- [111] 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 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *BioDrugs* 33 (2019) 193–205.
- [112] 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 (2018) 125–144.
- [113] 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

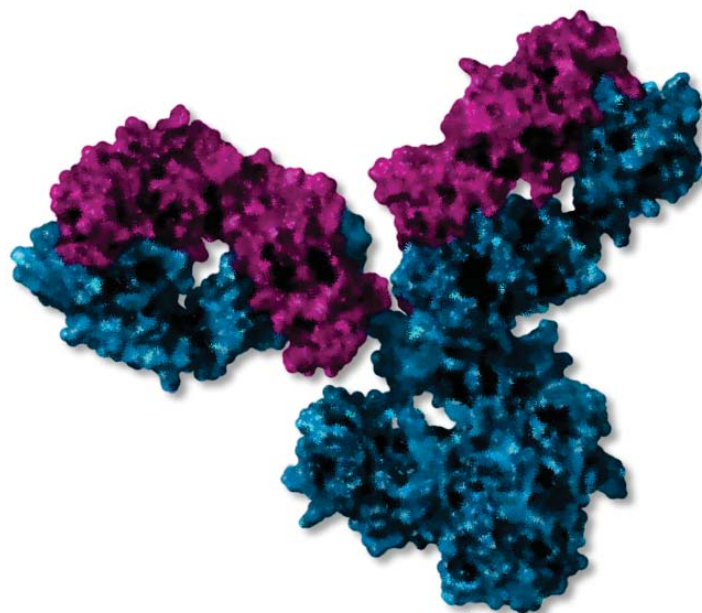
- to stress and long-term stability tests by analyzing size exclusion liquid chromatographic profiles, *Int. J. Biol. Macromol.* 118 (2018) 511–524.
- [114] Y. Wang, M.W. Washabaugh, Q. Zhao, Characterization of heterogeneity in monoclonal antibody products. En *Z. An. Therapeutic monoclonal antibodies*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ (2009).
- [115] E. Wagner-rousset, S. Fekete, L. Morel-Chevillet, O. Colas, N. Corvaia, S. Cianféroni, D. Guillaume, A. Beck, Development of a fast workflow to screen the charge variants of therapeutic antibodies, *J. Chromatogr. A.* 1498 (2017) 147–154.
- [116] O.O. Dada, N. Jaya, J. Valliere-Douglass, O. Salas-Solano, Characterization of acidic and basic variants of IgG1 therapeutic monoclonal antibodies based on non-denaturing IEF fractionation, *Electrophoresis.* 36 (2015) 2695–2702.
- [117] E. Farsang, A. Murisier, K. Horváth, A. Beck, R. Kormány, D. Guillaume, S. Fekete, Tuning selectivity in cation-exchange chromatography applied for monoclonal antibody separations. Part 1: Alternative mobile phases and fine tuning of the separation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 168 (2019) 138–147.
- [118] A. Murisier, E. Farsang, K. Horváth, M. Lauber, A. Beck, D. Guillaume, S. Fekete, Tuning selectivity in cation-exchange chromatography applied for monoclonal antibody separations, part 2: Evaluation of recent stationary phases, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 172 (2019) 320–328.
- [119] Y. Leblanc, C. Ramon, N. Bihoreau, G. Chevreux, Charge variants characterization of a monoclonal antibody by ion exchange chromatography coupled on-line to native mass spectrometry: Case study after a long-term storage at +5 °C, *J. Chromatogr. B* 1048 (2017) 130–139.
- [120] F. Füssl, A. Trappe, K. Cook, K. Scheffler, O. Fitzgerald, J. Bones, Comprehensive characterisation of the heterogeneity of adalimumab via charge variant analysis hyphenated on-line to native high resolution Orbitrap mass spectrometry, *mAbs* 11 (2019) 116–128.
- [121] F. Füssl, K. Cook, K. Scheffler, A. Farrell, S. Mittermayr, J. Bones, Charge variant analysis of monoclonal antibodies using direct coupled pH gradient cation exchange chromatography to high-resolution native mass spectrometry, *Anal. Chem.* 90 (2018) 4669–4676.
- [122] C. Boone, J. Adamec. Top-down proteomics. En P. Ciborowki, J. Silberring .*Proteomic profiling and analytical chemistry*, Elsevier, Amsterdam (The Netherlands) (2016).
- [123] D. Boyd, T. Kaschak, B. Yan, HIC resolution of an IgG1 with an oxidized Trp in a complementarity determining region, *J. Chromatogr. B* 879 (2011) 955–960.
- [124] J. Valliere-Douglass, A. Wallace, A. Balland, Separation of populations of antibody variants by fine tuning of hydrophobic-interaction chromatography operating conditions, *J. Chromatogr. A.* 1214 (2008) 81–89.
- [125] S. Wang, A.P. Liu, Y. Yan, T.J. Daly, N. Li, Characterization of product-related low molecular weight impurities in therapeutic monoclonal antibodies using hydrophilic interaction chromatography coupled with mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 154 (2018) 468–475.
- [126] D.R. Stoll, D.C. Harmes, G.O. Staples, O.G. Potter, C.T. Dammann, D. Guillaume, A. Beck, Development of comprehensive online two-dimensional liquid chromatography/ mass spectrometry using hydrophilic interaction and reversed-phase separations for rapid and deep profiling of therapeutic antibodies, *Anal. Chem.* 90 (2018) 5923–5929.
- [127] J. Moebius, R. Swart, A. Sickmann. Chromatography-based separation of proteins, peptides, and amino acids. En *S.C. Gad. Handbook of pharmaceutical biotechnology*, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ (2007).

- [128] K. Sandra, I. Vandenheede, P. Sandra, Modern chromatographic and mass spectrometric techniques for protein biopharmaceutical characterization, *J. Chromatogr. A* 335 (2014) 81–103.
- [129] S. Fekete, S. Rudaz, J. Fekete, D. Guillaume, Analysis of recombinant monoclonal antibodies by RPLC: toward a generic method development approach, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 70 (2012) 158–168.
- [130] S. Fekete, S. Rudaz, J.L. Veuthey, D. Guillaume, Impact of mobile phase temperature on recovery and stability of monoclonal antibodies using recent reversed-phase stationary phases, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 3113–3123.
- [131] N. Navas, A. Herrera, A. Martínez Ortega, A. Salmerón García, J. Cabeza, L. Cuadros Rodríguez, Quantification of an intact monoclonal antibody, rituximab, by (RP)HPLC/DAD in compliance with ICH guidelines, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 9351–9363.
- [132] T.M. Dillon, P.V. Bondarenko, M. Speed Ricci, Development of an analytical reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry method for characterization of recombinant antibodies, *J. Chromatogr. A* 1053 (2004) 299–305.
- [133] T.M. Dillon, P.V. Bondarenko, D.S. Rehder, G.D. Pipes, G.R. Kleemann, M.S. Ricci, Optimization of a reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry method for characterizing recombinant antibody heterogeneity and stability, *J. Chromatogr. A* 1120 (2006) 112–120.
- [134] S. Fekete, S. Rudaz, J. Fekete, D. Guillaume, Analysis of recombinant monoclonal antibodies by RPLC: toward a generic method development approach, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 70 (2012) 158–168.
- [135] S. Fekete, D.S. Jensen, J. Zukowski, D. Guillaume, Evaluation of a new wide-pore superficially porous material with carbon core and nano diamond-polymer shell for the separation of proteins, *J. Chromatogr. A* 1414 (2015) 51–59.
- [136] A. Martínez Ortega, A. Herrera, A. Salmerón García, J. Cabeza, L. Cuadros Rodríguez, 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.
- [137] D. Reusch, M.L. Tejada, Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes, *Glycobiology* 25 (2015) 1325–1334.
- [138] X. Yang, S.M. Kim, R. Ruzanski, Y. Chen, S. Moses, W.L. Ling, X. Li, S.C. Wang, H. Li, A. Ambrogelly, D. Richardson, M. Shameem, Ultrafast and high-throughput N-glycan analysis for monoclonal antibodies, *mAbs* 8 (2016) 706–717.
- [139] C. Huhn, M.H.J. Selman, L.R. Ruhaak, A.M. Deelder, M. Wuhrer, IgG glycosylation analysis, *Proteomics* 9 (2009) 882–913.
- [140] M. Hilliard, W.R. Alley, C.A. McManus, Y.Q. Yu, S. Hallinan, J. Gebler, P.M. Rudd, Glycan characterization of the NIST RM monoclonal antibody using a total analytical solution: From sample preparation to data analysis, *mAbs* 9 (2017) 1349–1359.
- [141] I. Cotte-Rodriguez, Z. Miao, Y. Zang, H. Chen. Introduction to protein mass spectrometry. En G. Chen. Characterization of protein therapeutics using mass spectrometry, Springer, Nueva York, NY (2013).
- [142] A.B. Pomilio, E.A. Bernatené, A. A. Vitale, Espectrometría de masas en condiciones ambientales con ionización por desorción con electrospray, *Acta Bioquim. Clin. Latinoam.* 45 (2011) 47–79.
- [143] C.N. Ferguson, S.A. Benchaar, Z. Miao, J.A. Loo, H. Chen, Direct ionization of large proteins and protein complexes by desorption electrospray ionization-mass spectrometry, *Anal. Chem.* 83 (2011) 6468–6473.

- [144] P. Bults, B. Spanov, O. Olaleye, N.C. van de Merbel, R. Bischoff, Intact protein bioanalysis by liquid chromatography – High-resolution mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 1110–1111 (2019) 155–167.
- [145] H. Zhou, Z. Ning, A. E. Starr, M. Abu-Farha, D. Figeys, Advancements in top-down proteomics, *Anal. Chem.* 84 (2012) 720–734.
- [146] H. Zhang, W. Cui, M.L. Gross, Mass spectrometry for the biophysical characterization of therapeutic monoclonal antibodies, *FEBS Lett.* 588 (2014) 308–317.
- [147] Z. Zhang, Y. Qu, N.J. Dovichi, Capillary zone electrophoresis-mass spectrometry for bottom-up proteomics, *Trends Anal. Chem.* 108 (2018) 23–37.
- [148] P.B. Pandeswari, V. Sabareesh, Middle-down approach: a choice to sequence and characterize proteins/proteomes by mass spectrometry, *RSC Adv.* 9 (2019) 313–344.
- [149] Y. Zboromyska, Aplicaciones del MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología, *Cont. Lab. Clín.* 20 (2015) 87–98.
- [150] A. Tsarbopoulos, U. Bahr, B.N. Pramanik, M. Karas, Glycoprotein analysis by delayed extraction and post-source decay MALDI-TOF-MS, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* 169–170 (1997) 251–261.
- [151] Wikipedia, De Antony Croxatto, Guy Prod'hom & Gilbert Greub - Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=53789706> (Consultado agosto 2019).
- [152] J. Webster, D. Oxley. Protein Identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry. En E. Zanders. Chemical genomics and proteomics. *Methods in molecular biology (methods and protocols)*, Humana Press, London (UK) (2012).
- [153] M.T. Mazur, R.S. Seipert, D. Mahon, Q. Zhou, T. Liu, A platform for characterizing therapeutic monoclonal antibody breakdown products by 2D chromatography and top-down mass spectrometry, *AAPS J.* 14 (2012) 530–541.
- [154] J. Hajduk, M. Wolf, R. Steinhoff, D. Karst, J. Souquet, H. Broly, M. Morbidelli, R. Zenobi, Monitoring of antibody glycosylation pattern based on microarray MALDI-TOF mass spectrometry, *J. Biotechnol.* 302 (2019) 77–84.
- [155] C.S. Ho, C.W.K. Lam, M.H.M. Chan, R.C.K. Cheung, L.K. Law, L.C.W. Lit, K.F. Ng, M.W.M. Suen, H.L. Tai, Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications, *Clin. Biochem. Rev.* 24 (2003) 3–12.
- [156] Wikipedia, By Andreas Dahlin - ESI positive mode, CC BY 2.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=72802277> (Consultado agosto 2019).
- [157] A. Makarov, Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1156–1162.
- [158] Q. Hu, R.J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, R.G. Cooks, The Orbitrap: A new mass spectrometer, *J. Mass Spectrom.* 40 (2005) 430–443.
- [159] S. Eliuk, A. Makarov, Evolution of Orbitrap mass spectrometry instrumentation, *Annu. Rev. Anal. Chem.* 8 (2015) 61–80.
- [160] Wikipedia, By Thermo Fisher Scientific (Bremen) - Artwork by Thermo Fisher Scientific, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=19523499> (Consultado agosto 2019).
- [161] M. El Amrani, A.A.M. Donners, C.E. Hack, A.D.R. Huitema, E.M. van Maarseveen, Six-step workflow for the quantification of therapeutic monoclonal antibodies in biological matrices with liquid chromatography mass spectrometry – A tutorial, *Anal. Chim. Acta* 1080 (2019) 22–34.

- [162] K. Scheffler, R. Viner, E. Damoc, High resolution top-down experimental strategies on the Orbitrap platform, *J. Proteomics* 175 (2018) 42–55.
- [163] A. Trappe, F. Füssl, S. Carillo, I. Zaborowska, P. Meleady, J. Bones, Rapid charge variant analysis of monoclonal antibodies to support lead candidate biopharmaceutical development, *J. Chromatogr. B* 1095 (2018) 166–176.
- [164] Q. Hu, R.J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, R.G. Cooks, The Orbitrap: a new mass spectrometer, *J. Mass Spectrom.* 40 (2005) 430–443.
- [165] D.B. Hibbert, P. Minkinen, N.M. Faber, B.M. Wise, IUPAC project: A glossary of concepts and terms in chemometrics, *Anal. Chim. Acta* 642 (2009) 3–5.
- [166] D.B. Hibbert, Vocabulary of concepts and terms in chemometrics (IUPAC Recommendations. *Pure. Appl. Chem.* 88 (2016) 407–443.
- [167] S. Y. Ryu. Bioinformatics tools to identify and quantify proteins using mass spectrometry data. En R. Donev, *Advances in protein chemistry and structural biology*, Elsevier, London (UK) (2014).
- [168] M. Tu, S. Cheng, W. Lu, M. Du, Advancement and prospects of bioinformatics analysis for studying bioactive peptides from food-derived protein: Sequence, structure, and functions, *Trends Anal. Chem.* 105 (2018) 7–17.
- [169] M. M Gromiha, R.Nagarajan, S. Selvaraj. Protein structural bioinformatics: an overview. En S. Ranganathan, M. Gribskov, C. Schonbach, *Encyclopedia of bioinformatics and computational biology*, Elsevier, London (UK) (2019).
- [170] B.M. Teska, C. Li, B.C. Winn, K.K. Arthur, Y. Jiang, J.P. Gabrielson, Comparison of quantitative spectral similarity analysis methods for protein higher-order structure confirmation, *Anal. Biochem.* 434 (2013) 153–165.
- [171] J. Liu, A.W. Bell, J.J.M. Bergeron, C.M. Yanofsky, B. Carrillo, C.E.H. Beaudrie, R.E. Kearney, Methods for peptide identification by spectral comparison, *Proteome Sci.* 5 (3) (2007) 1–12.
- [172] J. Novak, T. Skopal, D. Hoksza, J. Lokoc, Non-metric similarity search of tandem mass spectra including posttranslational modifications, *J. Discret. Algorithms* 13 (2012) 19–31.
- [173] H.L. Zhai, B.Q. Li, Y.L. Tian, P.Z. Li, X.Y. Zhang, An application of wavelet moments to the similarity analysis of three-dimensional fingerprint spectra obtained by high performance liquid chromatography coupled with diode array detector, *Food Chem.* 145 (2014) 625–631.
- [174] R.G. Brereton, *Chemometrics for Pattern Recognition*, John Wiley & Sons, Chichester (UK) (2009) 79–80.
- [175] C. Seung-Seok, C. Sung-Hyuk, C.C. Tappert, A Survey of binary similarity and distance measures, *J. Syst. Cybern. Inf.* 8 (2010) 43–48.
- [176] S. Cha, C. Tappert, Enhancing binary feature vector similarity measures, *JPRR* 1 (2006) 63–77.
- [177] M. Stahl, *Peak purity analysis in HPLC and CE using diode-array technology*, Agilent Technologies (2003).
- [178] *Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition*, Agilent Technologies (2013).
- [179] J.R. Bray, J.T. Curtis, An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin, *Ecol. Monogr.* 27 (1957) 325–349.
- [180] H. Abdi, L.J. Williams, Principal component analysis, *Contr. Stat.* 2 (2010) 433–470.
- [181] R. Bro, A.K. Smilde, Principal component analysis, *Anal. Methods* 6 (2014) 2812–2831

- [182] D.I. Warton, H.M. Hudson, A MANOVA statistic is just as powerful as distance based, for multivariate abundances, *Ecology* 85 (2004) 858–874.
- [183] L. Stahle, S. Wold, Multivariate analysis of variance (MANOVA), *Chemom. Intel. Lab. Syst.* (1990) 127–141.



CAPÍTULO 1

**Method for the comparison of complex
matrix assisted laser desorption ionization-
time of flight mass spectra.
Stability of therapeutical monoclonal antibodies**

1.1. Introducción al capítulo 1

En este capítulo se recogen los resultados obtenidos del desarrollo y aplicación de un método con diferentes enfoques para la comparación de espectros de masas procedentes de huellas dactilares peptídicas de mAb terapéuticos, utilizadas como fuente de información para la evaluación de la estabilidad en el tiempo de estos. Se hace uso de diferentes técnicas quimiométricas para el desarrollo del trabajo que conlleva este capítulo.

El trabajo realizado se presenta en un artículo científico publicado, cuyas referencias son:

- R. Pérez-Robles, N. Navas, S. Medina-Rodríguez, L. Cuadros-Rodríguez, Method for the comparison of complex matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectra. Stability of therapeutical monoclonal antibodies, *Chemometr. Intell. Lab.* 170 (2017) 58–67.

El desarrollo de metodología que ayude a estudiar la estabilidad de medicamentos biotecnológicos, más concretamente en mAb, es uno de los principales objetivos de esta Tesis Doctoral. INF y RTX son mAb ampliamente usados en hospitales para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y de algunos tipos de cáncer, todas ellas enfermedades de gran prevalencia. Son medicamentos extremadamente caros que una vez abiertos, el fabricante indica una estabilidad de no más de 24 horas. Por esta razón se desechan importantes cantidades en hospitales, ya que no es infrecuente que tras el tratamiento de un paciente sobre medicamento. Se desconoce si se producen cambios en la estructura del mAb y por consiguiente la posible pérdida de actividad biológica después de su apertura y durante su almacenamiento.

Existen varios enfoques para el estudio de la estructura de un mAb mediante espectrometría de masas, los enfoques 'top-down', 'middle-down' y 'bottom up', los cuales se encuentran descritos en más detalle en la introducción de esta Tesis Doctoral (apartado 5.2). El enfoque 'bottom up' es el enfoque mediante el que se puede detectar más modificaciones postraduccionales, de manera que es el análisis más completo pero también el que genera datos más complejos. Una estrategia del enfoque 'bottom up' es la determinación de las huellas dactilares peptídicas (PMF). Estos PMF son espectros de masas complejos ya que poseen una cantidad elevada de señales procedentes de cada péptido de un mAb digerido. La comparación y el tratamiento de PMF complejos puede ser una tarea difícil de llevar a cabo. Debido a la

complejidad que presentan, detectar visualmente cambios entre ellos es muy difícil y puede llevar a errores. Para ello es necesario hacer uso de técnicas analíticas quimiométricas que pongan de manifiesto estas posibles diferencias y similitudes. En este grupo de investigación se ha desarrollado con anterioridad un trabajo que permite la comparación de espectros de masas desde un enfoque no quimiométrico, empleando algoritmos de base *big data* [1].

En este trabajo es propuesto un método analítico matemático que se aplica a la comparación de espectros complejos como son los PMF. Estos PMF son obtenidos mediante espectrometría de masas MALDI/TOF procedentes del estudio de estabilidad en el tiempo de los mAb INF y RTX. Se ha desarrollado una función matemática escrita sobre Matlab, llamada "Protiago", la cual transforma datos de PMF en vectores de datos binarios adecuados para poder compararlos mediante técnicas quimiométricas. Se aplica análisis de similitud, calculando índices como el coeficiente de determinación, el coseno del ángulo, el índice Bray-Curtis y un nuevo índice desarrollado en este trabajo llamado "Índice de proximidad" (en inglés, 'Nearness index'). Este nuevo índice se fundamenta en el cálculo de la similitud basada en la distancia y se valida mediante la comparación con otros índices conocidos. Se emplean dos métodos exploratorios de datos, que son análisis de componentes principales (PCA) y análisis multivariante de la varianza (MANOVA), para detectar relaciones y agrupamientos entre los PMF.

1.2. Recursos

El trabajo experimental referente a este capítulo no se ha realizado en el marco de esta Tesis Doctoral, pero los datos experimentales procedentes de los PMF fueron realizados por personal del grupo de investigación. El trabajo que se ha realizado en el marco de esta Tesis se ha centrado en el estudio y análisis de los datos experimentales para llevar a cabo el tratamiento de los mismos con el objetivo de determinar estabilidad de los mAb. Por esta razón no se van a incluir en este apartado los disolventes y reactivos, las muestras y la instrumentación analítica empleada.

[1] P.J. Villacorta, A. Salmerón-García, 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 (2015) 1717-1730.

Todos los detalles de cómo fue realizado el trabajo experimental está indicado en el artículo que se reproduce en este mismo capítulo.

1.2.1. Tratamiento de datos

Para el desarrollo y aplicación de la función matemática "Protiago" se hizo uso del programa Matlab, versión R2013b (The Mathworks Inc. Natick, MA, EE.UU.). Se usó para el pre-procesado de los datos y en el cálculo de los índices de similitud que se describen con mayor detalle en el artículo que se reproduce en este mismo capítulo.

Para la aplicación del análisis de componentes principales se usó el programa PLS-Tolbox (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA, EE.UU.) bajo el entorno de Matlab.

Para el análisis multivariante de la varianza se usó el programa Statgraphics, versión Centurión XVI (Statgraphics.Net, Madrid, España).

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Method for the comparison of complex matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectra. Stability of therapeutical monoclonal antibodies

Raquel Pérez-Robles^{a*}, Natalia Navas^a, Santiago Medina-Rodríguez^b,
Luis Cuadros-Rodríguez^a.

^a Department of Analytical Chemistry / Biohealth Research Institute (ibs.GRANADA),
University of Granada, E-18071 Granada, Spain.

^b Department of Signal Theory, Telematics and Communications, CITIG-UGR,
University of Granada, E-18071 Granada, Spain.

Chemometrics and Intelligent Laboratory System 170 (2017)58-67

Accepted: 4 /09/ 2017

Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 170 (2017) 58-67



Contents lists available at ScienceDirect

Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemometrics



Method for the comparison of complex matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectra. Stability of therapeutical monoclonal antibodies



Raquel Pérez-Robles^{a,*}, Natalia Navas^a, Santiago Medina-Rodríguez^b, Luis Cuadros-Rodríguez^a

^a Department of Analytical Chemistry, Biohealth Research Institute (ibs.GRANADA), University of Granada, E-18071 Granada, Spain

^b Department of Signal Theory, Telematics and Communications, CITIG-UGR, University of Granada, E-18071 Granada, Spain

Abstract

This paper describes a straightforward and easy-to-implement method for comparing mass spectra using multivariate chemometric techniques in order to detect differences and obtain representative similarity metrics. For this purpose, we have programmed our own MATLAB function called Protiago. Protiago successfully transforms complex vectors (i.e. intensities and m/z values from mass spectra) with different lengths in binary vectors with the same number of elements. In addition, Protiago is able to read and properly process a set of spectra vectors in order to carry out a proper similarity analysis using four similarity metrics (i.e. the coefficient of determination, the cosine of the angle, the Bray-Curtis index and the nearness index). The latter is a new similarity index proposed by the authors and applied for the first time in this study. It calculates a standardized Euclidean distance between two vectors in the space in order to obtain a numerical value, ranged between 0 and 1, of the proximity of both vectors. To supplement the similarity analysis information, two multivariate exploratory methods were applied, i.e. principal component analysis (PCA) and multivariate analysis of variance (MANOVA). As an example of the proposed method, the comparison of peptide mass fingerprints obtained using MALDI/TOF mass spectrometry from two therapeutic monoclonal antibodies, infliximab (INF) and rituximab (RTX), was carried out. By using this method it was possible to detect changes in the primary structure of the two proteins in order to study their chemical stability for 7 days under two storage conditions (refrigerated at 4°C, and frozen at 20°C).

Keywords

Mass spectra similarity indexes; Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI/TOF-MS); Multivariate analysis of the variance (MANOVA); Principal components analysis (PCA); Therapeutic monoclonal antibody; Peptide mass fingerprint.

Introduction

The use of therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) in clinical practice is well established nowadays. They are widely used in hospitals for the treatment of highly prevalent diseases such as cancer and auto-immune diseases. These biotechnological drugs have importantly contributed to the pharmaceutical world in the recent decades and promise to have more relevance in the future, therefore their study and characterisation represent an important task [1].

mAbs are large glycoproteins (≈ 150 kDa) composed of four peptide chains, two light (L) and two heavy (H) ones, stabilized by inter-chain disulphide bonds. Both H-chains and L-chains contain variable (V_L, V_C) and constant regions (C_L, C_C). The variable regions, which are the antigen-binding site of the antibody, display different specificities and differ in the amino acid sequence, whilst the constant regions do not. The H-chains have a flexible hinge region which contains several proline residues. In addition, mAbs have glycans linked to the H-chains via an N-linked glycosidic bond [2]. Figure 1 shows the general structure of a mAbs.

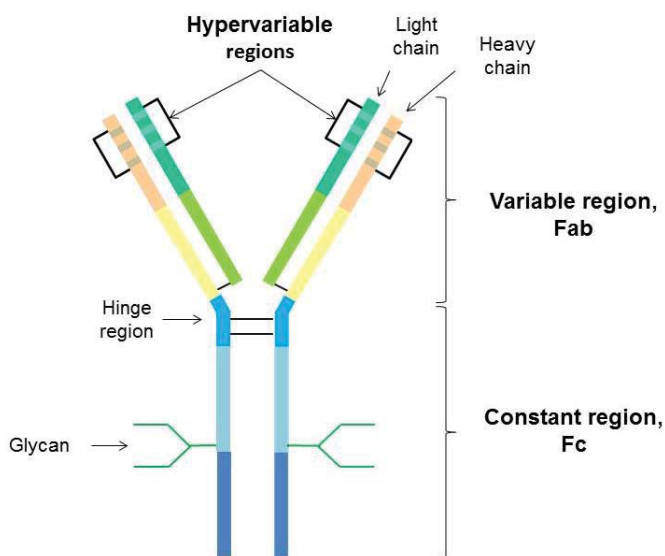


Figure 1. Diagram of the chemical structure of a monoclonal antibody (mAb).

RTX (empirical formula: $C_{6416}H_{9874}N_{1688}O_{1987}S_{44}$; average molecular mass: 143859.7 Da [3]) is a chimeric murine/human IgG1 mAb that binds to CD20, a transmembrane protein,

located on pre-B and mature B-lymphocytes. It is intended for use in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma, rheumatoid polyarthritis, chronic lymphoid leukemia and granulomatosis with polyangiitis and microscopic polyangiitis [4]. INF (empirical formula: $C_{6428}H_{9912}N_{1694}O_{1987}S_{46}$; average molecular mass: 144190.3 Da [5]) is also a chimeric murine/human IgG1 mAb, which binds to the tumour necrosis factor (TNF-alpha). INF is an anti-inflammatory medicine, and it is usually used when other medicines or treatments have failed in adults with the following diseases: rheumatoid arthritis, Crohn's disease, ulcerative colitis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis and psoriasis [6].

Due to their protein nature, these biopharmaceutics are complex and unstable; slight changes in the environment may produce significant changes in their structure. For those that are approved, the stability is unknown after the expiry date specified by the manufacturer (in most cases, this does not exceed 24h). This fact means that large amounts of these expensive drugs are daily discarded in hospitals with the subsequent economic loss. There is a need for additional stability data covering the practical uses of mAbs based, for example, on physicochemical characterizations over time.

Different experimental strategies could be applied in order to carry out a proper physicochemical characterization: (i) a top-down approach, which is referred to intact mAb analysis; (ii) a bottom-up approach, which is based on a prior enzymatic digestion of the mAb and a subsequent analysis of the digested peptides; and (iii) a middle approach, in which a partial digestion of the mAb is made [7,8]. The physicochemical characterisation is achieved using a wide range of analytical techniques, including reversed-phase liquid chromatography (RPLC), size-exclusion chromatography (SEC), ion-exchange chromatography (IEX), sodium-dodecyl sulphate polyacrylamide-gel electrophoresis (SDS-PAGE), capillary isoelectric focusing (CIEF), capillary zone electrophoresis (CZE), circular dichroism spectrometry (CD), Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), and fluorescence spectrophotometry (FL) [9]. In addition, mass spectrometry (MS) represents the most important analytical technique regarding mAb structural investigation [10]. Nevertheless, very few papers which focus on long-term stability studies of marketed therapeutic mAbs based on MS measures have been published [11].

The MS spectrum obtained from the resulting bottom-up approach digested fraction depends on the particular peptide sequence of each protein and it may be used for protein identification, characterization or comparison [7]. For this reason, such a spectrum is also labelled as a peptide mass fingerprint (PMF). Two mass spectrometric ionisation methods

are habitually applied in order to acquire reliable PMFs: electrospray ionisation (ESI) and matrix-assisted laser desorption and ionization (MALDI). MALDI has some important advantages, such as its ability to generate singly charged ions and its relative robustness in the presence of salts and buffers [11], however it shows an intrinsic lack of reproducibility which should be kept under control.

In order to perform suitable stability studies, it is necessary to collect a spectra set at different times from the same protein sample and compare them to detect possible changes. However, the direct visual comparison is difficult due to both the complexity of PMF and the low MALDI spectra reproducibility; therefore the use of mathematical-statistical methods is required. Surprisingly, there are very few papers which propose specific tools in for carrying out such comparisons. For instance, Holton *et al.* use a log transformation, Pearson correlation and principal component analysis (PCA) for the comparison of mass spectrometric peptide profiles [12], Máté *et al.* apply a topological and geometric approach to measure protein similarity [13], Bazsó *et al.* [14] and Teska *et al.* [15] use different similarity indexes for the comparison of mass spectra, Fourier transform infrared spectra and near ultraviolet circular dichroism spectra. We have also recently developed a cluster-based comparison tool for PMF obtained from MALDI time of flight (TOF) mass spectrometry [11].

A valid and straightforward way for monitoring the possible changes of PMF is the use of similarity metrics, so the larger the value is, the more similar they are. There are many such metrics that can be applied. The similarity analysis is based on comparing one by one the figures from two data vectors with the same number of elements. This means that the acquired spectra have to be previously transformed into data vectors; nevertheless this is a routine option into the most of the current analytical instrument software. The data vectors are then assembled to build a matrix data containing all the spectra. In this way, the similarity between each pair of rows (samples) in the data matrix can be measured. The similarity metrics usually assess the distance or the degree of mathematical correlation between the elements from the data vectors which are being compared. Several multipurpose similarity metrics have been proposed for comparing vectors [16]; only for the particular case of binary vectors (all the elements are 0 or 1), it is possible to find more than 70 similarity metrics [17,18]. However, the similarity indexes most frequently used for quantitative measurement data sets are the cosine, the correlation coefficient and indexes based on the distance; the values of most of them vary from 0 to 1.

In this paper, a robust mathematical comparison method is proposed to be applied in complex mass spectrometric data, particularly in PMF obtained by MALDI/TOF-MS. Each single PMF was extracted in a data vector which denotes intensities vs m/z. Next, the development of an ad hoc MATLAB function which firstly transforms the intensities of the PMF in binary data was carried out; the value "1" indicates the presence of a fragment to a certain m/z value, and the "0" the absence of it. In a second step, an averaged no-binary vector is obtained for each sample from the replicates of the previous PMF binary vectors. The similarity analysis was then applied on the averaged vectors by developing, a new multipurpose distance similarity metrics which has been called the 'nearness similarity index'. Subsequently, the new developed index was validated by comparing with other well-known similarity metrics. In addition, two multivariate exploratory methods were applied to the binary vectors, i.e. PCA and multivariate analysis of variance (MANOVA), in order to detect patterns in the PMFs. As an application example, the method has been applied on the long-term stability study of two marketed therapeutics, mAbs, widely used in hospital practice, i.e. rituximab (RTX) and infliximab (INF), in order to contribute robust data to evaluate re-utilization of the daily surplus.

Materials and methods

Reagents and chemicals

The chemicals used were of analytical grade or high purity grade. The water used was purified with a Milli-RO Plus Milli-Q station from Merck Millipore (Darmstadt, Germany). Acetonitrile was from Poch S.A (Gliwice, Poland). Ammonium bicarbonate, dithiothreitol, iodoacetamide and α -cyano-4-hydroxycinnamic acid were supplied by Sigma-Aldrich (Barcelona, Spain). Trypsine Gold (mass spectrometry grade) was from Promega Corporation (Madrid, Spain). The isotonic solution of NaCl (0.9%) was supplied by B. Braun Medical (Madrid, Spain). Trifluoroacetic acid (TFA) was from Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

mAbs

Mabthera® (Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Germany) and Remicade® (Janssen Biotech, Horsham, U.S.A.) are the marketed medicines for RTX and INF respectively. Mabthera® is a solution made up of 100 mg of RTX, sodium citrate dehydrate, sodium chloride, sodium hydroxide and hydrochloric acid, and polysorbate 80. Remicade® is a powder constituted by 100 mg of INF with sucrose, polysorbate 80, monobasic sodium phosphate and dibasic sodium phosphate. Working solutions of RTX (1.0 mg mL⁻¹) and INF (0.5, 2.0 and 10.0 mg mL⁻¹) were prepared from the original medicines by dilution in 0.9% sodium chloride solution, according to the manufacturer's instructions.

Stability study: experimental and raw spectra handling

The working solutions of each mAb were separated in aliquots of 500 µL and stored protected from daylight, under two temperature conditions, i.e. refrigerated at 4°C, and frozen at -20°C, until further use.

During the first week, on exactly the days 0 (reference specimen), 1, 3, 4 and 7, aliquots of each mAb from each storage condition, were taken and after room tempered, the aliquots were analysed. The experimental conditions applied for the enzymatic digestion and the subsequent MALDI/TOF/MS analysis (Voyager DE-PRO (Applied Biosystems) MALDI/TOF equipped with a standard nitrogen laser (337 nm) in positive reflectron mode) were carried out according to the procedure described in reference [11]. For each analysed aliquot, five replicated mass spectra were acquired. The final spectra set was then constituted by 45 mass spectra from each mAb.

A soft pre-processing was applied to each mass spectrum by using the deisotoping algorithm Voyager™ 5 Software (Applied Biosystems) in order to get a signal intensity filtration, a baseline correction and a smoothing. The applied pre-processing conditions are again the ones stated in reference [11].

The spectral intensity data for each m/z value were extracted from the pre-processed spectra and the numerical values were collected in a data vector which indicates the PMF of the protein in each storage condition. The number of elements differs from one spectrum to another, depending on the number of recorded mass peaks (m/z value) in each measurement run.

Similarity metrics

In this study, four quantitative similarity metrics have been considered. The similarity analysis is based on the study of the correlation (coefficient of determination), direction (cosine of the angle) and distance between the vectors (Bray-Curtis distance and nearness index). There follows, a brief description of each.

Coefficient of determination (R^2)

The coefficient of the determination is a similarity metric derived from the analysis of the variance. When two data sets are compared, R^2 quantifies the fraction of the overall data variability which is explained by a particular model. In this case, if the vector elements fit a linear model this implies that both vectors follow the same spatial direction and thus they are similar. This coefficient is insensitive to the lengths of the vectors, *i.e.*, the number of vector elements. Despite being one of the most similarity index used in bibliography, it presents the disadvantage that does not show the direction of the vectors correlation.

For linear models, R^2 matches numerically the square of the Pearson correlation coefficient. Thus, the R^2 value between any vector and the reference vector, symbolized by V and V_0 respectively, is described by equation 1.

$$R^2(V, V_0) = \left(\frac{\sum_j (v_j - \bar{v}) \times (v_{0,j} - \bar{v}_0)}{\sqrt{\sum_j (v_j - \bar{v})^2 \times \sum_j (v_{0,j} - \bar{v}_0)^2}} \right)^2 \quad (1)$$

Where v_j and $v_{0,j}$ are the element of V and V_0 vectors. R^2 take values from 0 to 1. The value 0 implies that both vectors are totally different, and the value 1 means equality.

Cosine (COS)

The cosine of the angle defined by two vectors is used to describe the similarity between them. This is a commonly mentioned similarity metric for the comparison of spectra [19,20,21]. The cosine from V and V_0 vectors is calculated by equation 2.

$$\text{COS}(V, V_0) = \frac{\sum_j v_j \times v_{0,j}}{\sqrt{\sum_j v_j^2 \times \sum_j v_{0,j}^2}} \quad (2)$$

The cosine trigonometrical function is theoretically restricted to acquire values between – 1 and +1. However, if only positive figures take place in both vectors, as is the case of the mass spectra vector, the cosine varies just between 0 (totally different vectors) and 1 (identical vectors).

Bray-Curtis similarity index (BC)

In 1957 Bray and Curtis [22] proposed an index to quantify the compositional dissimilarity between plant communities. This index has been widely used in biology and ecology, but to our knowledge, has not so far been used in proteomics. The Bray-Curtis similarity index is determined by means of equation 3.

$$BC(V, V_0) = 1 - \frac{\sum_j |v_j - v_{0,j}|}{\sum_j (v_j + v_{0,j})} \quad (3)$$

Mathematically, the second term of equation 3, called the Bray-Curtis distance, quantifies the standardized absolute difference (or distance) between both the V and V₀ vectors. The BC similarity index ranges from 0 to 1.

Nearness index (NEAR)

A new index has been developed and proposed in this study, called the 'nearness index' (NEAR), in order to compute the similarity between two vectors. It is expressed by equation 4.

$$NEAR (V, V_0) = 1 - \frac{\sqrt{\sum_j (v_j - v_{0,j})^2}}{\sqrt{\sum_j (v_j + v_{0,j})^2}} \quad (4)$$

This index is based on the proximity of two vectors in space so that the closer they are, the greater the similarity is. The nearness index is calculated from the standardized Euclidean distance. The nearness index reports as values between 0 and 1; the value 0 indicates maximum difference, and 1 implies maximum similarity.

Spectral similarity analysis

The similarity analysis has been applied on the PMFs of the mAbs. For this, the vector has been compared in pairs, element to element, and four similarity metrics have been computed (those cited above). The correct application of the similarity analysis requires the elements from the spectra to be compared in pairs. Accordingly, two vector settings have to be fulfilled: (i) all the spectra should be composed of the same number of elements, that is, the same number of spectral intensities; and (ii) the elements of all the vectors should be ordered on the basis of the same m/z values, thus if a spectrum does not show a mass peak to a certain m/z value, the vector should have to a zero value in this position. In order to solve this constraint we programmed an own MATLAB function, named 'Protiago'. A brief description of the 'Protiago' characteristics follows.

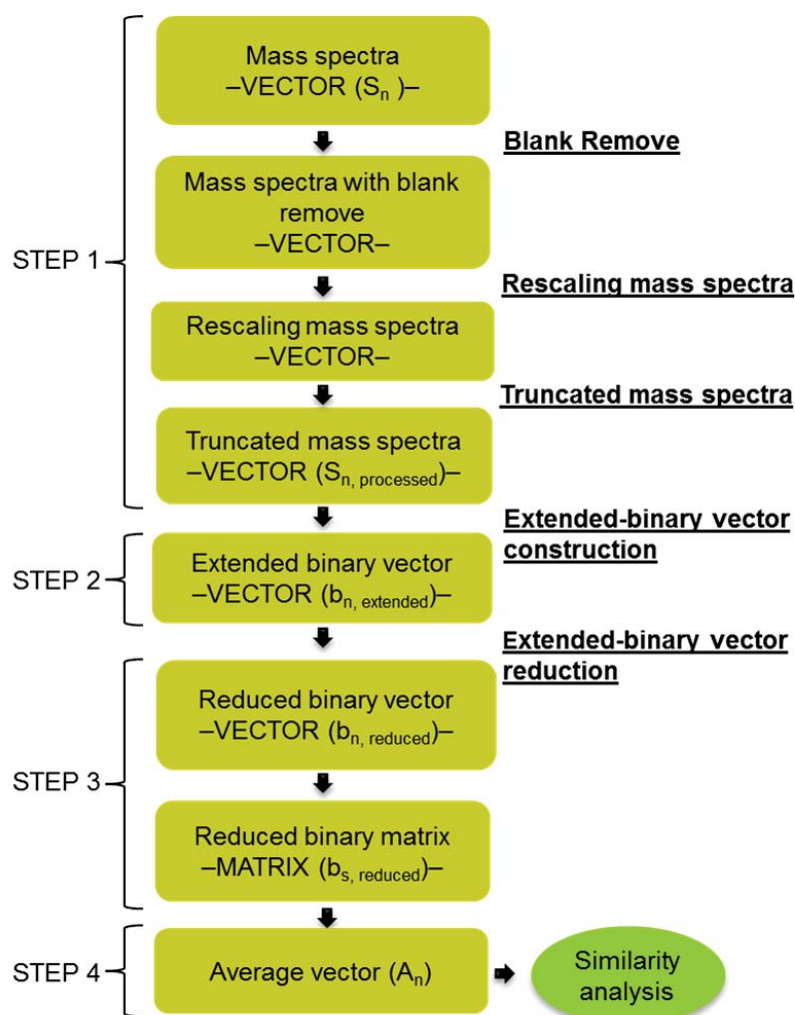


Figure 2. Flow chart showing an overview of the processes involved in the spectral data treatment.

The Protiago function is able to read and properly process a set of spectra in order to allow correct comparisons between them using different similarity metrics.

Let's suppose a data set $S = \{S_0, S_1, \dots, S_{N-1}\}$ consisting of N spectra, where each spectrum S_n is a data matrix of size $M_n \times 2$ containing m/z values in the first column and intensity values in the second column. Note that the number of variables (or rows) M_n of each spectrum S_n may be different. Henceforth, we denote the first column of matrix S_n (containing m/z values) as m_n , and the second column of S_n (containing spectral intensity values) as V_n . Both are column vectors of size $M_n \times 1$. From this data set S , the function performs the following processing steps (see Fig. 2):

STEP 1: For each individual spectrum S_n of the data set S , with $n = 0 \dots N-1$, the following processing is performed:

1A) First, a blank removal is performed. For it, the m/z values and intensities corresponding to trypsin are deleted of the vectors m_n and V_n , respectively. These m/z values are shown in Table 1.

Table 1: Masses (m/z , in Da) correspond to trypsin.

515.33	559.29	679.51	864.49	1234.67	1493.75	2225.12
524.16	568.13	701.49	870.54	1265.63	1707.78	2233.00
534.18	570.70	823.11	892.50	1300.58	1716.85	2383.95
537.31	590.11	825.10	1037.55	1365.64	1940.93	2717.05
546.15	634.07	842.50	1045.56	1383.69	1765.73	
548.19	650.05	845.10	1126.56	1434.77	2082.98	
550.16	656.05	856.52	1179.60	1475.78	2211.10	

1B) The lowest and highest m/z values of column vector m_n (*i.e.*, the first and last element of this vector, respectively) are stored in the n th row of a matrix of dimension $N \times 2$, denoted as $m_{n,intervals}$.

1C) Next, the raw spectral intensity values of column vector V_n are scaled on a range of 0 to 100 by applying the following expressions:

$$v''_{n,j} = 100 \times \frac{V_{n,j} - V_{n,\min}}{V_{n,\max} - V_{n,\min}} \quad (5)$$

where $v'_{n,j}$ is the normalized intensity value (between 0 and 1) of the j th element of vector v_n , and $v_{n,\min}$ and $v_{n,\max}$ are the minimum and maximum elements of v_n , respectively. Thus, after this step, a new column vector v''_n , with intensity values normalized between 0 and 100 is obtained for each spectrum.

1D) From the column vector v''_n obtained in step 1B, the indices of the vector elements whose intensity value exceed a certain threshold (intensity values > 3 in our case) are found, and from these indices, the corresponding m/z values of vector m_n are selected. The value 3 was selected since this threshold allowed for selecting around 200 peaks (peptides) from each PMF (200 peaks are the usual value selected for proteins fingerprint analysis in proteomic approaches) [11]. This step is carried out to remove the noise.

1E) Finally, the set of m/z values selected in step 1D are rounded to the first decimal place in order to avoid accuracy problems in subsequent steps, and then they are used to build a new column vector of size $L_n \times 1$ denoted as m''_n . Note that this new vector m''_n is a reduced version of the original column vector m_n , with $L_n < M_n$.

STEP 2: After processing each spectrum S_n individually, a new high-resolution column vector containing all the m/z values of all the spectra is built. This extended vector of m/z values is denoted as $m_{S,\text{extended}}$ and it is generated from the minimum and maximum elements of the matrix $m_{S,\text{interval}}$ obtained in step 1A. These two m/z values ($m_{S,\min}$ and $m_{S,\max}$) are rounded to the nearest integer and shifted by a integer factor to provide the ends of the extended vector $m_{S,\text{extended}}$ (i.e., $\text{round}(m_{S,\min})-100$ and $\text{round}(m_{S,\max})+100$, respectively). Finally, this vector is filled with equally spaced m/z values between these two extremes in steps of 0.1. Note that the new extended vector $m_{S,\text{extended}}$ is a column vector of size $P \times 1$, with $P \gg M$. Later, a binary column vector of size $P \times 1$ (containing only 0s and 1s) is built for each spectrum S_n . This vector, denoted as $b_{n,\text{extended}}$, has the same size that the vector $m_{S,\text{extended}}$ and contains values '1' in those positions that match the m/z

values present in the vector m''_n of the analyzed spectrum; the remaining positions take value '0'.

STEP 3: Note that all the vectors $b_{n,extended}$ generated in step 2 have the same size ($P \times 1$), and therefore they are suitable for carrying out pairwise comparisons between any two spectra. However, it is noteworthy that these vectors can become too large in some cases (due to their large number of elements, where most of them are zeros), thereby unnecessarily increasing the computational cost required to perform such comparisons. To minimize this problem, a 'reduced' version of the vector $m_{S,extended}$ (specific for the set of spectra studied) can be generated. Unlike the vector $m_{S,extended}$, this new reduced vector, denoted as $m_{S,reduced}$, contains strictly all the m/z values of all the vectors m''_n of spectra (not one more), and therefore it will have the minimum number of elements (i.e., a size of $R \times 1$, with $R \ll P$). From this vector $m_{S,reduced}$, following the procedure described in the step 2, it is possible to generate a 'reduced' binary vector for each spectrum, denoted as $b_{n,reduced}$, whose size ($R \times 1$) is significantly smaller than the vectors $b_{n,extended}$. Then, a data matrix containing all the vectors $b_{n,reduced}$ of all the spectra is generated, where each row corresponds to a vector $b_{n,reduced}$. This matrix, denoted as $b_{S,reduced}$, has a size of $N \times R$.

STEP 4: Finally different subset of vectors $b_{S,reduced}$ are selected and averaged element by element (five replicates per day checked). One average vector is obtained (A_n) per day checked, resulting in two column vectors of size $R \times 1$. These vectors are then used to obtain the similarity metrics by the comparison of the A_n vectors of each day checked with the A_n vector of the reference day.

Principal component analysis (PCA) and multivariate analysis of variance (MANOVA)

As an alternative to similarity analysis, and in order to visualize clustering in samples, PCA and MANOVA have been applied.

PCA is an exploratory multivariate technique that analyses a data set representing observations described by several dependent variables, which are, in general, inter-correlated. PCA extracts the relevant and non-evident information from the data set and expresses this information as a new orthogonal set of variables. By means of PCA, a graphical output which displays the possible sample cluster can be obtained [23, 24]. PCA is commonly applied on fingerprints and other non-specific analytical data sets for

exploratory data and it is a powerful method capable of providing a clarifying overview of complex multivariate data.

MANOVA evaluates simultaneously mean differences on two or more dependent criterion multivariate data sets, it is a generalization of analysis of variance (ANOVA) for problems with several dependent response variables. MANOVA is mainly applied in two experimental situations: (i) to have information in one overall statistical test on several correlated dependent variables instead of performing multiple individual tests; and (ii) to explore how independent variables influence some patterning of response on the dependent variables [25,26]. In this study, MANOVA is used to explore the differences between PMFs.

Results and discussion

Trends of similarity metrics

In order to know the behaviour of the selected similarity metrics (R^2 , COS, BC and NEAR) and to check the fitness for purpose of each one regarding the true similarity of vectors, a simple simulation study was designed. For this, a 100 elements vector constituted by '1' was generated; this was used as reference vector. From the reference vector, a set of additional vectors was generated so in each one a certain number of '1's was replaced by '0'. The main goal of this study was to find the similarity metrics which showed a linear dependence in relation to the similarity percentage stated by the number of remaining '1' elements in the additional vector in relation to the reference vector. The results are displayed in Figure 3.

The nearness index shows the best linearity. The coefficient of determination is low sensitive except when a high degree of vector similarity is shown. The cosine and the Bray-Curtis index have similar trends. According to our considerations, the nearness index is the best to describe the similarity of PMFs since it indicated linearity over the whole range studied. In Figure 3 can be noted a linear behavior with some index indicated no linearity or little grade of it. Nevertheless, these other three similarity features will be also calculated in order to obtain wider information.

Spectral similarity analysis

The Protiago function was then applied to all the handled PMFs. One average vector is obtained as arithmetic mean of all elements of each column from the different binary vectors from one day (5 replicates), then the similarity metrics were applied. The results obtained for the similarities among the stored samples and the reference sample are now discussed for each mAb.

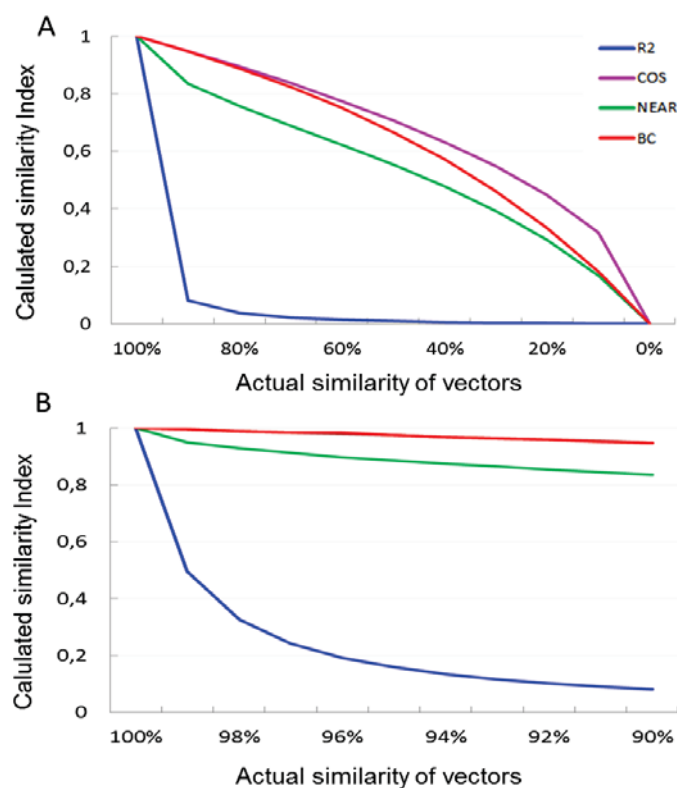


Figure 3. Tendency curves of the similarity metrics from simulated data. A: covering the whole interval 0-100% of actual similarity; B: zooming the interval 90-100% of actual similarity. Blue line: coefficient of determination; green line: nearness index; red line: Bray-Curtis index; pink line: cosine.

Infliximab

The four similarity metrics between the mass spectra recorded each control day (days 1, 3, 4 and 7) for the two storage conditions (4°C, refrigerated; -20°C, frozen) and the mass spectrum obtained the reference day (day 0) have been calculated. Figure 4 shows the similarity metrics results calculated for the INF concentration of 2 mg ml⁻¹ as bar charts.

The progress in the changes of the PMFs can be easily tracked by analyzing the results displayed in Figure 4. As a general trend, the similarity metrics values decrease throughout the time studied, this fact implies changes in the mAb structure. Notice that significant changes take place during the first 24 hours of storage. This is in consonance with previously described results regarding the decrease of the biological activity of this biological drug after 24 hours of opening the vial [27]. The subsequent PMF changes were gradual for the rest of the checked days. To highlight the results for both storage conditions, they were similar; this means that the storage condition is not relevant in this particular case of INF solution at 2 mg·mL⁻¹. Day 3 shows an exceptional behaviour showing similarity values greater than day 1, this fact could be accepted within the context of the complexity of the problem, and also it could be attributed to an experimental error at any step of the analytical process.

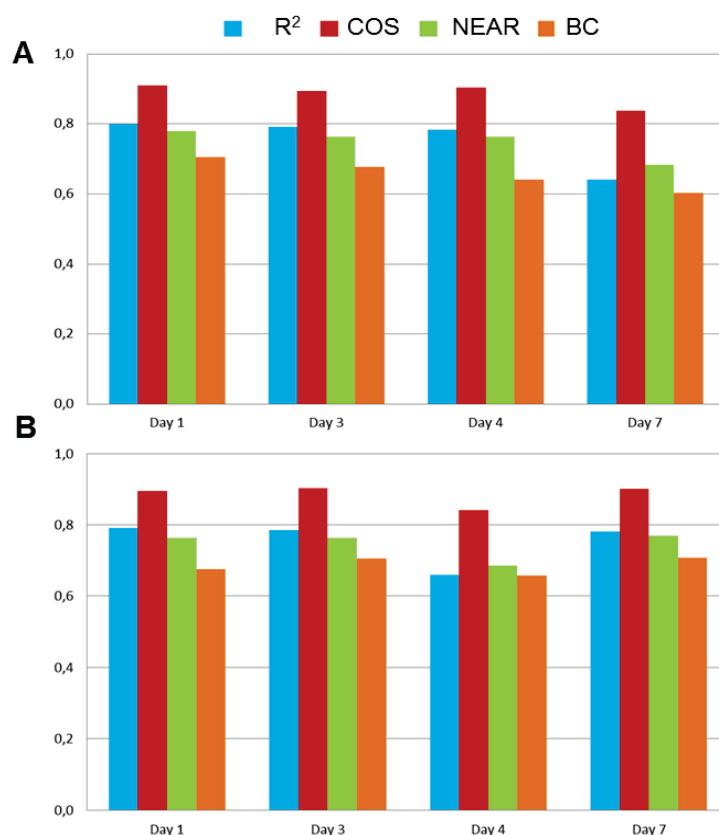


Figure 4. Similarity metrics values between INF samples stored under different conditions in relation to the reference sample (Day 0). A: Frozen samples (-20°C); B: refrigerated samples (4°C).

Rituximab

RTX solutions were treated similarly to INF. The similarity values obtained for the concentration of 1 mg ml⁻¹ are shown in Table 2 and in the bar-chart of Figure 5.

The similarity metrics values remain stable throughout the seven days of the study. The main changes in the mAb structure occurred in the first 24 hours. These dates are in agreement with other studies of RTX stability [11]. The results suggest that the storage conditions do not have any influence on RTX stability.

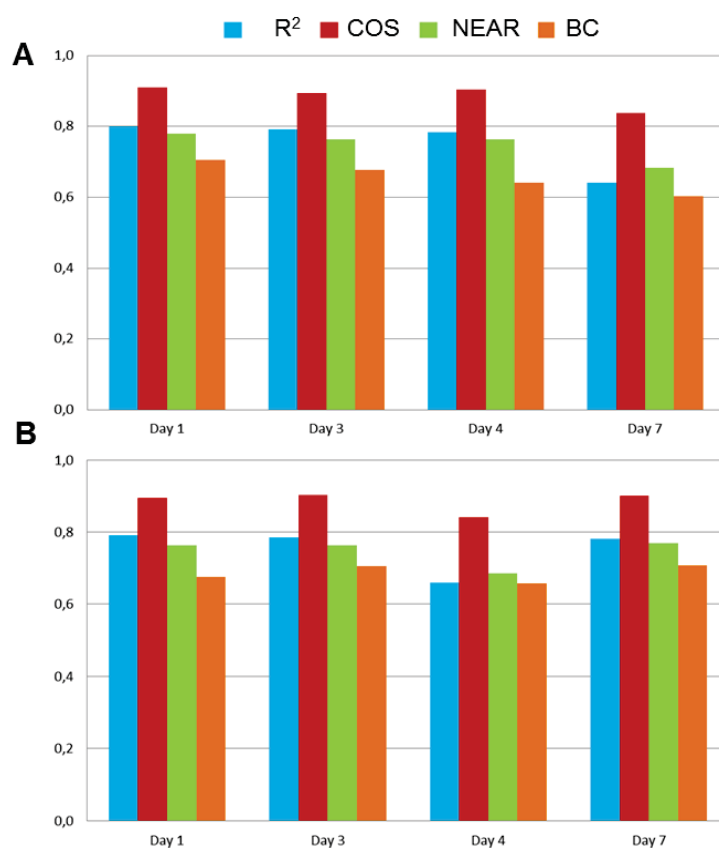


Figure 5. Similarity metrics values between RTX samples stored under different conditions in relation to the reference sample. A: Frozen samples (-20°C); B: refrigerated samples (4°C).

PCA and MANOVA analysis

In order to supplement the information obtained from the similarity analysis of INF and RTX, PCA and MANOVA have been carried out. PCA scores plots for INF and RTX, at the two storage temperature studied (4°C, 20°C) are displayed in Figures 6 and 7 respectively.

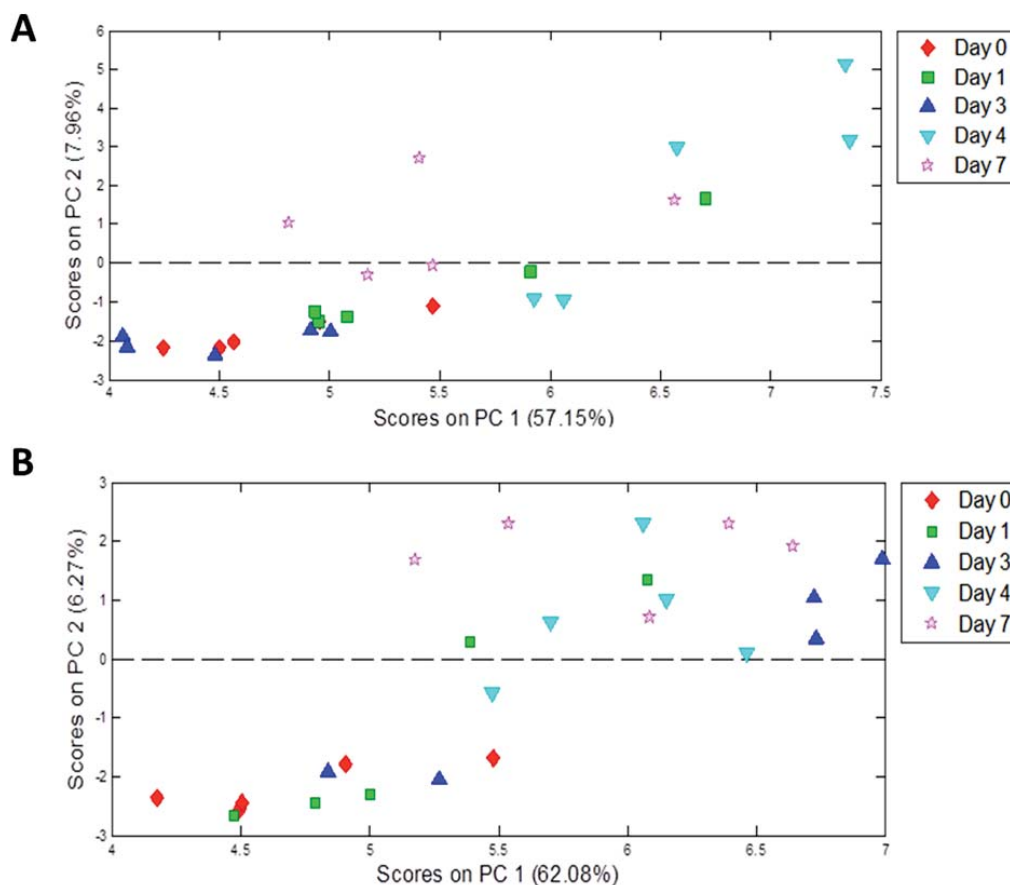


Figure 6: PCA scores plot obtained from PMFs of INF. A: Frozen samples (-20°C); B: refrigerated samples (4°C).

The input components used in the PCA were the reduced binary vectors ($b_{n, \text{reduced}}$) of each checked day (five replicates per day) including the reference day (day 0). Around 60% of the variability was explained considering the two principal components (the variance percentage are show in the axis of the corresponding score PCA plots, Figures 6 and 7). PCA results suggested no pattern in the PMFs for the both the mAbs studied, therefore, a lack of trends in the sample stability could be inferred over the time studied (a week).The

most striking fact was the broad dispersion of the five replicates recorded on the checked days. This has been attributed to the low precision of the overall experimental process that included an enzymatic trypsin digestion and also to the MALDI/TOF technique, where the ionization process of the samples is in many cases the source of great variability. In consequence, this lack of precision results in high standard deviation values that will promote negative consequences in order to obtain significant conclusions from statistical test as MANOVA, as will be discussed next.

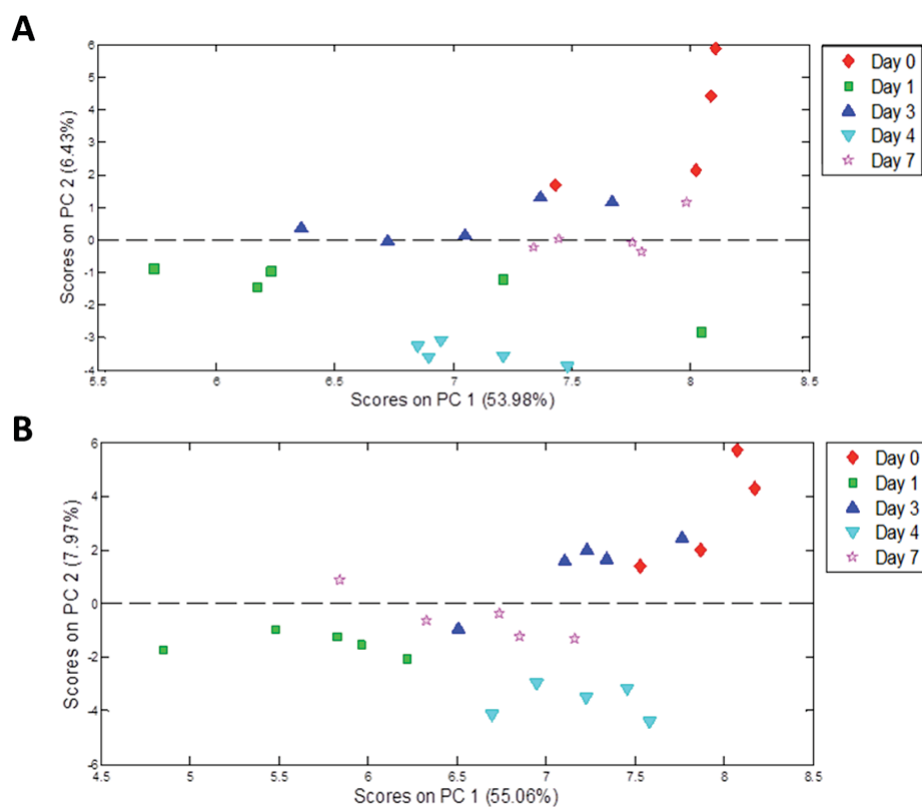


Figure 7. PCA scores plot obtained from PMFs of RTX. A: Frozen samples (-20°C); B: refrigerated samples (4°C).

In the case of INF, in addition to these facts, a significant displacement between the stored samples (days 1, 4 and 7) in regard to the reference sample (day 0) are observed in Figure 6. It is remarkable the anomalous behaviour of the sample from day 3, mainly for samples stored at 4°C, which shows a chaotic distribution in two clusters. This fact has already

been highlighted when the similarity analysis was performed, and it could be attributed to failure in the experimental sample preparation.

For RTX, Figure 7 shows the PCA plot; it can be noted similar behaviour to the INF PCA (Figure 6). Nevertheless, the differences between the PMFs of RTX from day 0 and day 1 are higher than for the PMFs of INF. This would indicate that changes in RTX solutions at 1 mg·mL⁻¹ in the first 24 hours would be greater than in INF solutions at 2 mg·mL⁻¹.

In addition, Table 2 and Table 3 show the results of the MANOVA for the INF and RTX samples respectively. The application of MANOVA requires some parametric assumptions in the original data to be met; in the present study the homogeneity of the variances was corroborated by graphical inspection of the standard deviation intervals of the INF and RTX binary vectors corresponding to each checked day and for each storage condition.

Table 2: MANOVA for INF. Effect of both storage temperature and time.

Source	SS	df	MS	F value	P value
(a) Storage time	0.3150	4	0.0787	1.34	0.25
(b) Storage temperature	0.1474	1	0.1474	2.50	0.11

Multiple range test (Tukey HSD method, 95.0 %)			
	Mean	SD	Homogeneous groups
(a) Storage time, days			
0	0.062		X
1	0.060	0.0025	X
3	0.067		X
4	0.063	0.0039	X
7	0.066		X
(b) Storage temperature			
Refrigerated, 4°C	0.061	0.0016	X
Frozen, -20°C	0.066	0.0024	X

The input components used for MANOVA were the same used in the PCA. Two factors have been studied in the MANOVA: storage time (days 0, 1, 3, 4 and 7) and storage temperature

(refrigerated at 4°C and frozen at -20°C). The 5-dimension multivariate responses used in the MANOVA were the 5 binary vector replicates from each day and storage condition.

Again, the results do not indicate any variable significant effect from both the storage temperature (p-value, 11%) and the storage time (p-value, 25%) for the INF samples. Subsequently the Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) analysis does not show significant differences either in means comparison. On the contrary, MANOVA indicates significant effects for storage time (p-value, 0%) and storage temperature (p-value, 0%) in the RTX samples. The Tukey's HSD test determines differences between the samples from the all the studied days. Nevertheless, due to the high precision standard deviation values, using MANOVA it would be difficult to detect significant differences between storage conditions. Therefore, no conclusion should be taken from this analysis.

Table 3: MANOVA for RTX. Effect of both storage temperature and time.

Source	SS	df	MS	F value	P value
(a) Storage time	14.2695	1	3.5674	37.82	0.00
(b) Storage temperature	1.62498	4	1.6250	17.23	0.00

Multiple range test (Tukey HSD method, 95.0 %)			
	Mean	SD	Homogeneous groups
(a) Storage time, days			
0	0.132		X
1	0.078		X
3	0.096	0.0033	X
4	0.110		X
7	0.113		X
(b) Storage temperature			
Refrigerated, 4°C	0.100		X
Frozen, -20°C	0.112	0.0021	X

Influence of the concentration on mAb stability

In order to determine the influence of the mAb concentration on the stability of the prepared solutions, the values of the nearness index at three different concentrations (0.5,

2 and 10 mg mL⁻¹) and two storage temperatures of (4°C, -20°C) have been compared. The nearness index has been selected as a representative similarity metrics for the reason mentioned in the subsection 3.1. This study has only been used for INF samples because RTX has been proved to be stable at 1 mg mL⁻¹.

Figure 8 shows the results for each concentration tested and for the two storage conditions. During the first 24 hours of storage, at 0.5 mg mL⁻¹, higher similarity changes take place. The similarity of day 7 is similar for the three concentrations. For frozen samples, if the results of day 3 are excluded, the loss of similarity for 2 mg mL⁻¹ and 10 mg mL⁻¹ are similar. For refrigerated samples the similarity reduction is less accentuated at 10 mg mL⁻¹.

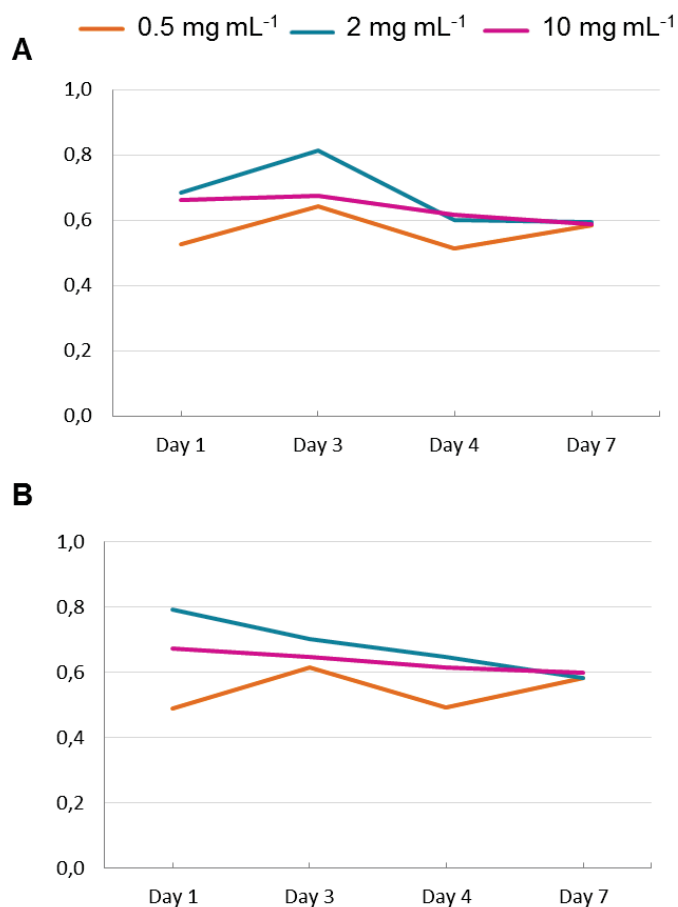


Figure 8. Stability plots for different concentration of INF. A: Frozen samples (-20°C); B: refrigerated samples (4°C).

Conclusions

The method presented in this research allows the comparison mass spectra. The Protiago Function can successfully transform complex vectors with different extensions into binary vectors with the same number of elements. The function transforms large quantity of data in a short time. In this study the function has been used for the comparison of PMFs but it could be used in others studies which require the comparison of complex data.

We have developed a new similarity index called nearness has been development which has proved to be more suitable for the comparison of PMFs than other similarity metrics. This index shows the best linear dependence in relation to the similarity percentage stated by the number of remained '1' elements in the additional vector in relation to the reference vector.

The Protiago function and the similarity analysis have been implemented for studying the stability of two different mAbs: INF and RTX. The stability study has carried been out by calculating four similarity metrics on 7 days of study. The samples of INF and RTX are prepared under the usual hospital conditions and stored under two different temperatures (4°C, -20°C). The results suggest that there were no differences between the two storage conditions. Changes in the primary structure of both mAbs have been taken into account; mainly changes which took place during the first 24 hours of storage. The INF structure gradually degraded from day 1 to day 7, however the RTX structure remained unchanged after the first 24 hours of storage.

In order to complement the similarity analysis PCA and MANOVA have been carried out but few firm conclusions were obtained. The results prove that PCA and MANOVA are statistical tools which are not suited for monitoring mAb structural changes related to a lack of stability from the MALDI/TOF spectra handled from the correspondent trypsin digested.

References

- [1] J.M. Reichert, Antibodies to watch in 2016, *MAbs* 8 (2016) 197–204.
- [2] G. Walsh, *Pharmaceutical Biotechnology – Concepts and Applications*, John Wiley & Sons, Chichester (UK) (2007).
- [3] Drug Bank, www.drugbank.ca/drugs/DB00073 (Accessed 26 July 2016).
- [4] EMA/424820/2016, European public assessment report (EPAR) summary for MabThera, Annex I: Summary of product characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK) 2016.
- [5] Drug Bank, www.drugbank.ca/drugs/DB00065 (Accessed 26 July 2016).
- [6] EMA/ 76495/2012, European public assessment report (EPAR) summary for Remicade, Annex I: Summary of product characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK) 2012.
- [7] A.A. Jingjie-Mo, C. Tymiak-Guodong, Mass spectrometric characterization in protein therapeutics discovery, in: G. Chen, *Characterization of Protein Therapeutics using Mass Spectrometry*, Springer, Berlin (Germany) (2013).
- [8] A. Beck, F. Debaene, H. Diemer, E. Wagner-Rousset, O. Colas, A. Van Dorsselaer, S. Cianféroni, Cutting-edge mass spectrometry characterization of originator, biosimilar and biobetter antibodies, *J. Mass Spectrom.* 50 (2015) 285–297.
- [9] S. Fekete, A. Gassner, S. Rudaz, J. Schappler, Analytical strategies for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies, *Trends Anal. Chem.* 42 (2013) 74–83.
- [10] S. Rosati, N.J. Thompson, A.J.R. Heck, Tackling the increasing complexity of therapeutic monoclonal antibodies with mass spectrometry, *Trends Anal. Chem.* 48 (2013) 72–80.
- [11] P.J. Villacorta, A. Salmerón-García, 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 (2015) 1717–1730.
- [12] T.A. Holton, E.T. Dillon, A. Robinson, K. Wynne, G. Cagney, D.C. Shields, Optimal computational comparison of mass spectrometric peptide profiles of alternative hydrolysates from the same starting material, *LWT – Food Sci. Technol.* 73 (2016) 296–302.
- [13] G. Máté, A. Hofmann, N. Wenzel, D.W. Heermann, A topological similarity measure for proteins, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1838 (2014) 1180–1190.
- [14] F.L. Bazsó, O. Ozohanics, G. Schlosser, K. Ludányi, K. Vékey, L. Drahos, Quantitative comparison of tandem mass spectra obtained on various instruments, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 27 (2016) 1357–1365.
- [15] B.M. Teska, C. Li, B.C. Winn, K.K. Arthur, Y. Jiang, J.P. Gabrielson, Comparison of quantitative spectral similarity analysis methods for protein higher-order structure confirmation, *Anal. Biochem.* 434 (2013) 153–165.
- [16] R.G. Brereton, *Chemometrics for pattern recognition*, John Wiley & Sons, Chichester (UK) (2009).
- [17] C. Seung-Seok, C. Sung-Hyuk, C.C. Tappert, A Survey of binary similarity and distance measures, *J. Syst. Cybern. Informatics* 8 (2010) 43–48.
- [18] S. Cha, C. Tappert, Enhancing binary feature vector similarity measures, *JPRR.* 1 (2006) 63–77.
- [19] J. Liu, A.W. Bell, J.J.M. Bergeron, C.M. Yanofsky, B. Carrillo, C.E.H. Beaudrie, R.E. Kearney, Methods for peptide identification by spectral comparison, *Proteome Sci.* 5(3) (2007) 1–12.

- [20] J. Novák, T. Skopal, D. Hoksza, J. Lokoc, Non-metric similarity search of tandem mass spectra including posttranslational modifications, *J. Discret. Algorithms* 13 (2012) 19–31.
- [21] H.L. Zhai, B.Q. Li, Y.L. Tian, P.Z. Li, X.Y. Zhang, An application of wavelet moments to the similarity analysis of three-dimensional fingerprint spectra obtained by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector, *Food Chem.* 145 (2014) 625–631.
- [22] J.R. Bray, J.T. Curtis, An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin, *Ecol. Monogr.* 27 (1957) 325–349.
- [23] H. Abdi, L.J. Williams, Principal component analysis, *Contr. Stat.* 2 (2010) 433–470.
- [24] R. Bro, A.K. Smilde, Principal component analysis, *Anal. Methods* 6 (2014) 2812–2831
- [25] L. Stahle, S. Wold, Multivariate Analysis of Variance (MANOVA), *Chemometr. Intel. Lab.* (1990) 127–141.
- [26] D.I. Warton, H. M. Hudson, A MANOVA statistic is just as powerful as distance-based, for multivariate abundances, *Ecology* 85 (2004) 858–874.
- [27] 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.

1.3. Conclusiones

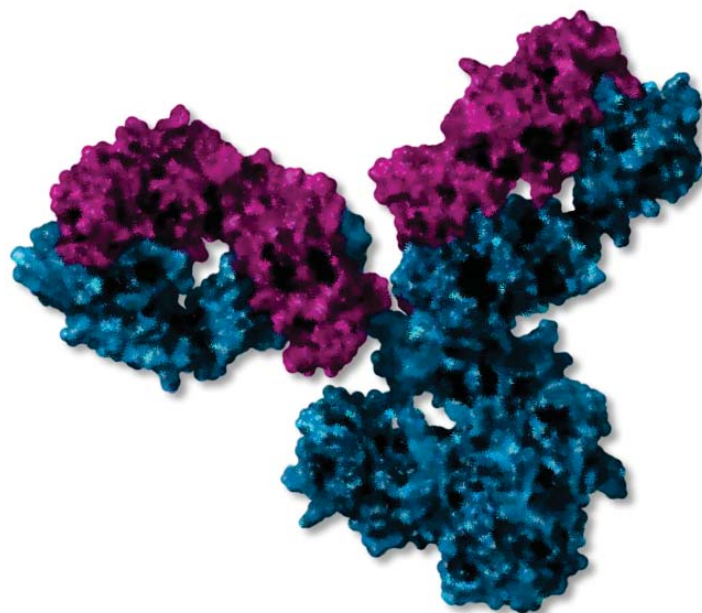
Se ha desarrollado un método que permite la comparación de espectros de masas complejos como es el caso de los PMF de mAb terapéuticos. La función 'Protiago' transforma satisfactoriamente vectores de datos complejos en vectores binarios más simples y con el mismo número de elementos para que puedan ser aplicados en técnicas quimiométricas. Esta función puede ser aplicada a cualquier vector de datos procedente de cualquier otro estudio que necesite ser simplificado o transformado a datos binarios.

Los índices de similitud calculan de una manera adecuada la similitud entre PMF. Se ha demostrado la idoneidad del índice de proximidad desarrollado en este trabajo, llegando a ser el que mejor resultado de linealidad muestra cuando se compara con índices de similitud comúnmente usados. Este índice puede usarse para la comparación de espectros de cualquier naturaleza (infrarrojo, absorción UV-Vis, etc.). Se ha demostrado que el coeficiente de determinación es más sensible a altos grados de similitud, sin embargo a % mayores de similitud, pierde esta capacidad gradualmente y manifiesta ser el que menos sensibilidad posee de los cuatro índices comparados.

En el estudio de estabilidad de los mAb INF y RTX se ha demostrado que no hay diferencias significativas en los PMF procedentes del estudio en la forma de almacenaje de los sobrantes hospitalarios, ya que tanto el almacenamiento refrigerado a 4°C como congelado a -20°C, muestra resultados similares. En cuanto al estudio de estabilidad en el tiempo, se han producido cambios en la estructura primaria de los anticuerpos en las primeras 24 horas de almacenaje. En la estructura de INF, a partir de las 24 horas, se produce un pequeño cambio gradual hasta los 7 días. No se aprecian cambios en la estructura de RTX a partir de las 24 horas de estudio.

Este estudio nos permite concluir que hay cambios en la estructura primaria de los mAb estudiados, sin embargo no se puede decir que hay cambios en la funcionalidad de estos, ya que no necesariamente cambios en la estructura primaria van a producir cambios funcionales. Para asegurarse de ello es necesario hacer estudios de funcionalidad (ELISA o cultivos celulares) que relacionen los cambios en la estructura con pérdidas de actividad de los mAb.

Este tipo de metodología se puede aplicar al estudio de estabilidad de cualquier otro mAb terapéutico, por lo que supone un avance en el conocimiento del estudio de estos anticuerpos a nivel de estructura primaria.



CAPÍTULO 2

Development and validation of a (RP)UHPLC-UV-(HESI/Orbitrap)MS method for the simultaneous quantification and identification of mixtures of intact therapeutical monoclonal antibodies using a monolithic column

2.1. Introducción al capítulo 2

Este capítulo detalla el desarrollo de un método analítico para la separación, cuantificación e identificación de mezclas de mAb terapéuticos. Para ello se hace uso de la cromatografía de líquidos de ultra altas prestaciones acoplada a un sistema de detección por absorción ultravioleta y a espectrometría de masas de alta resolución.

En este capítulo se presenta un artículo científico publicado, cuyas referencias son:

- ➔ R. Pérez-Robles, L. Cuadros-Rodríguez, A. Salmerón-García, N. Navas. Development and validation of a (RP)UHPLC-UV-(HESI/Orbitrap)MS method for the identification and quantification of mixtures of intact therapeutical monoclonal antibodies using a monolithic column, J. Pharm. Biomed. Anal. 159 (2018) 437–448.

Actualmente, las terapias basadas en el empleo de mAbs hacen uso de un único anticuerpo. No obstante, investigaciones recientes han puesto de manifiesto que la terapia combinada con más de un mAb, para ciertos tipos de enfermedades, tiene efectos beneficiosos, ya que mejora los que se obtienen cuando la enfermedad es tratada con sólo uno de ellos. Surge por tanto la necesidad de desarrollar metodología analítica que permita identificar y cuantificar estos medicamentos cuando son usados en terapia conjunta.

Uno de los atributos críticos de la calidad que se requiere controlar es la concentración de mAb como principio activo en los preparados farmacéuticos. Hasta el momento, según nuestro conocimiento, existen métodos analíticos que permiten cuantificar cada mAb individualmente pero no mezclas de ellos. Para poder cuantificar mezclas de mAb terapéuticos, lo primero que hay que hacer es separarlos y la separación de estos es una tarea complicada ya que se asemejan mucho en su estructura proteica (ya que todos son IgG1), que es además muy compleja y de elevado tamaño.

La técnica analítica usada por excelencia para la cuantificación de mAb es la cromatografía de líquidos en fase inversa. Con anterioridad, en este grupo de investigación se han desarrollado varios trabajos en los que se han cuantificado mAb individualmente [1,2,3]. Por otro lado la identificación y caracterización del perfil de

[1] 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 (2016) 117–124.

isoformas de un mAb es un atributo crítico de la calidad que hay que tener en cuenta y controlar en el desarrollo y administración del medicamento.

Con el objetivo de poner solución a este problema se ha desarrollado un método cromatográfico de fase inversa con detección mediante absorción ultravioleta y espectrometría de masas para la separación, cuantificación e identificación de mAb terapéuticos en mezclas. Estos mAb terapéuticos son cinco de los más usados en la actualidad: BEV, CTX, INF, RTX y TRA. La separación se ha realizado en una columna monolítica de divinilbenceno específica para el análisis de mAb. La detección se ha llevada a cabo mediante absorción en el ultravioleta y mediante espectrometría de masas. Para llevar a cabo la separación se aplica el diseño estadístico de experimentos (DoE).

El método se ha validado para la cuantificación siguiendo un protocolo interno que está basado en las guías internacionales más usuales de validación en el ámbito farmacéutico ('International Conference on Harmonization', ICH; 'US Food and Drugs Administration', FDA; 'United States Pharmacopeia', USP). La respuesta experimental se ha obtenido usando la señal a partir del cromatograma procedente del detector de absorción en el ultravioleta. Se han estudiado parámetros como la linealidad, exactitud (precisión y veracidad), los límites de detección y cuantificación y la robustez. Esta última se evalúa mediante DoE, calculando los efectos totales y laterales de las variables en estudio.

La identificación de los mAb se valida a partir de un método de inyección directa en el espectrómetro de masas, que también se ha desarrollado en este trabajo. Se comparan diferentes modificadores de la fase móvil que son habituales en espectrometría de masas, como son el ácido trifluoroacético y el ácido fórmico.

-
- [2] A. Martínez-Ortega, A. Herrera, A. Salmerón-García, J. Cabeza, L. Cuadros-Rodríguez, 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.
- [3] N. Navas, A. Herrera A. Martínez-Ortega, A. Salmerón-García, J. Cabeza, L. Cuadros-Rodríguez, Quantification of an intact monoclonal antibody, rituximab, by (RP)HPLC/DAD in compliance with ICH guidelines, *Anal. Bioanal. Chem.* 29 (2013) 9351–9363.

2.2. Recursos

En este apartado se describen todos los recursos usados para la realización del trabajo que se recoge a continuación, tanto disolventes y reactivos, instrumentación, muestras usadas y programas de tratamiento de datos.

2.2.1. Disolventes y reactivos

Los disolventes empleados son de pureza LC-MS. En la Tabla 2.1 se recogen todos los disolventes y reactivos empleados.

Tabla 2.1. Disolventes y reactivos usados.

Disolventes y reactivos	Casa comercial
Acetonitrilo (ACN)	VWR International Eurolab, S.L. (Barcelona, España)
Agua de ósmosis inversa, purificada con una estación Milli-RO Milli-Q	Merck Millipore (Darmstadt, Alemania)
Solución isotónica para perfusión (0.9% NaCl en agua para inyección)	B. Braun Medical (Madrid, España)
Ácido trifluoroacético (TFA)	Scharlab S.L. (Barcelona, España)
Ácido fórmico (FA)	Fisher Scientific (Geel, Bélgica)
Lisozima procedente de clara de huevo de pollo	Sigma Aldrich (Madrid, España)

2.2.2. Muestras

Todas las muestras de medicamentos utilizadas en este trabajo han sido cedidas por el Servicio de Farmacia Hospitalaria perteneciente al Hospital Universitario San Cecilio (Granada, España). Estas muestras se recogen justo después del momento de preparación, para ser empleadas en los correspondientes estudios experimentales siempre dentro del periodo de caducidad establecido por el fabricante. Los medicamentos que requieren reconstitución, como es el caso de INF y TRA, son preparados por el personal del Servicio de Farmacia anteriormente mencionado tal y

como indica el fabricante en su ficha técnica, esto es, en cabina de flujo laminar, diluyendo adecuadamente su contenido en agua para inyectables. Los sobrantes de los medicamentos no empleados en la farmacia han sido conservados en frío a 4°C hasta el momento de su recogida (no más de 24 horas), para ser analizados ese mismo día. En este trabajo se han usado las siguientes muestras:

- BEV en su medicamento original Avastin®. La concentración del fármaco es de 25 mg/ml.
- CTX en su medicamento original Erbitux®. La concentración del fármaco es de 5 mg/ml.
- INF en su medicamento original Remicade®. Tras su reconstitución, la concentración de fármaco es de 10 mg/ml.
- RTX en su medicamento original Mabthera®. La concentración del fármaco es de 10 mg/ml.
- TRA en su medicamento original Herceptin®. Tras su reconstitución, la concentración de fármaco es de 21 mg/ml.

Los propios medicamentos han sido usados como patrones ya que se carece de patrones comerciales. A partir de estos patrones se hacen tres tipos de disoluciones: disoluciones de calibración, disoluciones de validación y disoluciones test. Las disoluciones de calibración se han usado para llevar a cabo la calibración del método. Las disoluciones de validación se han empleado para el cálculo de la precisión y por último las disoluciones test se han usado para el cálculo de la veracidad del método.

2.2.3. Instrumentación analítica

Se ha utilizado una plataforma analítica que consta de un cromatógrafo de líquidos de ultra altas prestaciones equipado con dos bombas ternarias, desgasificador, automuestreador y columna termostaticada, y que incorpora un detector de absorción molecular UV/Vis de longitud de onda variable. Este cromatógrafo está además acoplado en línea con un espectrómetro de masas de alta resolución híbrido cuadrupolo-Orbitrap (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). La ionización se lleva a cabo con una fuente de ionización HESI (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.).

Para la separación de los mAbs se emplea una columna monolítica ProSwift RP-4H 1 x 50 mm (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) acoplada a una columna de 'desalting' massPREP 2.1 x 5mm, 20 µm, 1000 Å (Water, Milford, MA, USA).

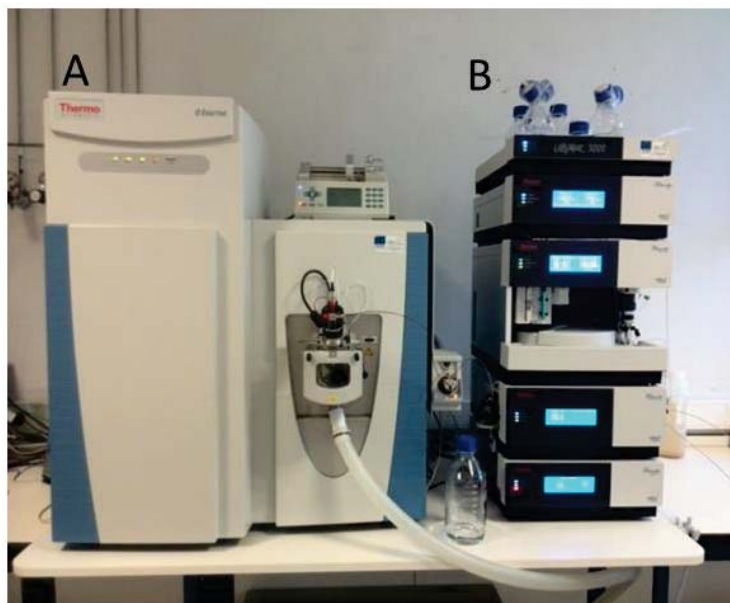


Figura 2.1. Plataforma analítica usada en este trabajo. A) Espectrómetro de masas de alta resolución híbrido cuadrupolo-Orbitrap. B) Cromatógrafo de líquidos de ultra altas prestaciones.

2.2.4. Tratamiento de datos

El tratamiento estadístico se ha llevado a cabo mediante el software Statgraphics Centurion XVI (Statgraphics.Net, Madrid, España), (para las regresiones pertinentes y el análisis los diseños de experimentos).

Los datos de espectrometría de masas se han analizado mediante el software BiopharmaFinder 2.0. (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Con este software se han deconvolucionado todos los espectros de masas de los mAb.

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Development and validation of a (RP)UHPLC-UV-(HESI/Orbitrap)MS method for the simultaneous quantification and identification of mixtures of intact therapeutical monoclonal antibodies using a monolithic column

Raquel Pérez-Robles ^a, Luis Cuadros-Rodríguez ^a, Antonio Salmerón-García ^b,
Natalia Navas ^a,

^a Department of Analytical Chemistry / Biohealth Research Institute (ibs.GRANADA),
University of Granada, E-18071 Granada, Spain.

^b UGC Intercentro Interniveles Farmacia Granada, "San Cecilio Hospital", Biohealth Research
Institute (ibs.GRANADA), Hospitales Universitarios de Granada, E-18012 Granada, Spain.

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 159 (2018) 437-448

Accepted: 11 /07/ 2018

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 159 (2018) 437-448



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpba



Development and validation of a (RP)UHPLC-UV-(HESI/Orbitrap)MS method for the identification and quantification of mixtures of intact therapeutical monoclonal antibodies using a monolithic column



Raquel Pérez-Robles ^a, Luis Cuadros-Rodríguez ^a, Antonio Salmerón-García ^b,
Natalia Navas ^{a,*}

^a Department of Analytical Chemistry/Biohealth Research Institute (ibs.GRANADA), University of Granada, E-18071 Granada, Spain

^b UGC Intercentro Interniveles Farmacia Granada, "San Cecilio Hospital", Biohealth Research Institute(ibs.GRANADA), University Hospital San Cecilio, E-18012 Granada, Spain

Abstract

Monoclonal antibodies (mAbs) are one of the most important types of biopharmaceuticals worldwide and have proved enormously successful in the treatment of cancers and autoimmune diseases. In this paper, we present a fast, straightforward reversed phase (RP)UHPLC-UV-(HESI/Orbitrap) MS method for the separation and identification of five of the most commonly used mAbs, i.e. bevacizumab (BEV), cetuximab (CTX), infliximab (INF), rituximab (RTX) and trastuzumab (TTZ) in mixtures. The RP mAbs separation was performed in a divinylbenzene-based monolithic column, after statistical design of the experiments with a novel approach for optimizing chromatographic conditions called the heteroscedasticity function. Results led us to split the initial mixture of five mAbs into two mixtures with four mAbs each, one containing RTX and the other TTZ. The method were validated for quantification using the signal from the UV detector and identification by (HESI-Orbitrap)MS. Direct MS characterization of the intact isoform profile of each mAb was also obtained. Advantages and disadvantages of the use of trifluoroacetic acid or formic acid as ion pairing agents for mass spectrometric analysis and chromatographic separation are discussed. Validation was performed using an internal protocol based on well-known international guidelines such as the International Conference on Harmonization (ICH) guideline, the US Food and Drugs Administration (FDA) guideline and the United States Pharmacopeia (USP) guideline. Performance parameters such as linearity, accuracy (precision and trueness), detection limits, quantification limits and robustness were evaluated. Robustness was established by studying the total and one-sided effects of four selected variables: column temperature, trifluoroacetic acid content in the mobile phases, initial proportion of eluent B and gradient. The results indicated the suitability of this method for quantifying these five mAbs in mixtures, as well as its robustness, reproducibility and sensitivity.

Keywords

Therapeutical monoclonal antibody; RP/UHPLC-UV-(HESI/Orbitrap)MS; Method validation; Intact protein glycoforms profile; Monoclonal antibody mixtures.

Introduction

Monoclonal antibodies (mAbs) are large glycoproteins with a molecular weight of around 150 kDa. They are currently the most important class of therapeutic proteins on the market and are used worldwide in the treatment of a broad spectrum of disorders, above all cancers. [1,2]. Bevacimab (BVZ), cetuximab (CTX), infliximab (INF), rituximab (RTX) and trastuzumab (TTZ) are among the most prescribed therapeutic mAbs as they are indicated for the treatment of widespread disorders such as cancer and autoimmune diseases. They were the top-selling biopharmaceuticals in 2015 and 2016 [3,4]. BVZ (Avastin®) is indicated for the treatment of several kinds of cancer, i.e. metastatic carcinoma of the colon or rectum, breast cancer, lung cancer, etc [5]. CTX (Erbix®) is approved for the treatment of colon, head and neck cancers [6]. INF (Remicade®) is used in the treatment of psoriasis, Crohn's disease, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, rheumatoid arthritis and ulcerative colitis [7]. RTX (MabTera®) is indicated for use in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma, rheumatoid polyarthritis and chronic lymphoid leukaemia [8]. TTZ (Herceptin®) is indicated for the treatment of patients with metastatic breast cancer with tumours that overexpress HER2 (25% of patients) [9]. All of the mAbs share the same IgG1 structure (Figure 1), differing only in the part involved in specific interaction with the antigen (Fab). This structural similarity makes reversed phase (RP) chromatographic separation using packed bed-columns difficult [10,11].

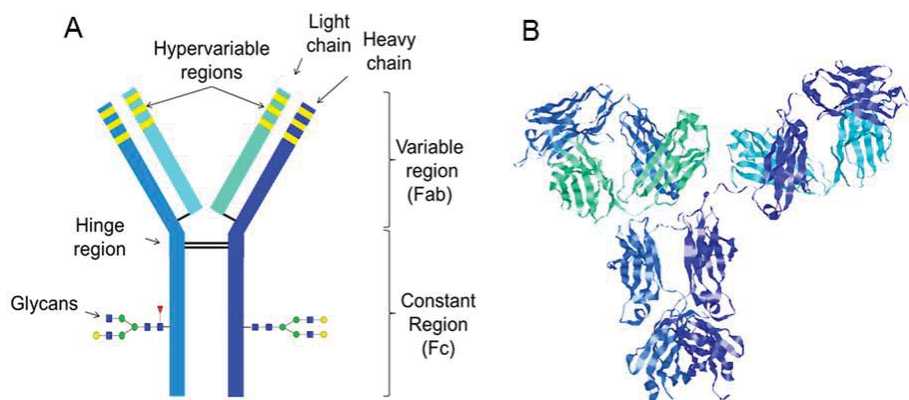


Figure 1. Diagram of the chemical structure of a monoclonal antibody (A). 3D structure of an IgG1 (B).

Reversed-phase liquid chromatography ((RP)LC) is generally considered as more efficient and more sensitive for the analysis of intact biotherapeutic proteins than other types of chromatography (*i.e.* size exclusion or ionic exchange chromatography) [12,13]. However, this mode of chromatography has frequently been associated with low recovery due to the absorption of the proteins by the column stationary phase material and due to the low diffusion capacity towards the mobile phase, an issue that is even more complicated in large proteins such as mAbs [14]. To solve these drawbacks, high-performance reversed-phase liquid chromatography ((RP)HPLC) requires mobile phases composed of complex mixtures of organic solvents [10,15,16] combined with high temperatures in the column (up to 90 °C [13,17]) to increase the diffusion of the proteins into the mobile phase, so increasing the efficiency of the chromatographic process. Gradient elution mode must always be used. In conventional analytical chromatography, analysis is usually performed on a column packed with 3 to 5 µm wide-pore (300 Å) silica particles with a pressure of up to 400 bar. Nevertheless, the chromatographic separation of the mixtures of intact mAbs such as those described above has never been achieved using this approach. This could be due to the high degree of structural similarity (sharing the IgG structure), which promotes similar hydrophobicity features that prevent the separation of therapeutic mAbs by (RP)HPLC.

Ultra-high-performance liquid chromatography in reversed-phase mode ((RP)UHPLC) uses sub-2µm particle sizes and therefore needs higher pressures in the system (around 1000 bar). This significantly enhances the efficiency of the separation of intact proteins using common organic solvent composition in the mobile phase, such as mixtures of water and acetonitrile and common ion pairing agents, such as trifluoroacetic acid (TFA) or formic acid (FA). Column temperatures of up to 80 °C are also required [14,18], as are gradient elution modes. These conditions have the advantage of being suitable to analyse intact protein when coupled with a mass spectrometer. Rigid polymer-based monolithic columns can also be used as an alternative to packed-bed columns [19,20]. In terms of protein recovery and carryover, monolithic columns have been shown to be clearly superior to particle based stationary phase formats for analysing mixtures of intact protein in the 5.7 to 150 kDa size range (including recombinant mAbs). This method is also very sensitive, detecting at femtomole level [21]. This means that, as indicated in [22], organic polymer-based monolithic columns are suitable for both high-resolution and high-speed biomolecule separations. High peak capacity peptide and protein separations have been reported which were at least as good, if not better, as those achieved using packed

columns. An additional advantage is that the unique porous structure and chemistry of the organic polymer-based monolithic columns decreases the carryover [23].

Notwithstanding the above, the analysis of therapeutic mAbs by (RP)LC has tended to focus on the analysis of a single mAb. Normally this is done by analysing intact mAbs or by applying enzymatic strategies to analyse Fc and Fab fragments [23,18]. So far little research has been done into mixtures of mAbs. This could be due to the fact that they are mainly formulated and prescribed individually. Nevertheless, mAbs could theoretically work well in combination therapy because of their limited overlapping toxicity and the lack of pharmacokinetic interactions [24,25]. It has already been reported that a combination of mAbs can have a greater therapeutic potential for treating cancer than a single mAb [26]. By combining mAbs in the treatment of a particular cancer, several pathways may be targeted simultaneously, potentially creating additive or synergistic effects; preclinical and clinical studies of twenty-five different combinations of therapeutic mAbs have been reported [24]. MAb combination is therefore likely to become a promising cancer therapy in the near future. MAb mixtures can be produced either by individually manufacturing the constituent mAbs or by producing a single batch of two or more mAbs [27]. In this context, it is important to provide rigorous and reliable analytical methods that enable us to study mixtures of mAbs, and not only the individual mAb constituents [28]. It is evident that Size-Exclusion Chromatography (SEC) is not suitable for analysing intact mAb mixtures since all the mAbs have similar molecular weights of around 150 kDa [29]. Cation Exchange Chromatography (CEX) has proved to be a fast, reliable method for the characterization of charge variants [30], which could also be used for the analysis of mixtures [28]. Nevertheless, as mentioned earlier, (RP)LC has greater resolving power and efficiency [31] and sharper peaks [10,11], which can be used for quantification purposes in single mAbs or in mixture solutions. (RP)LC has the additional advantage of straightforward coupling to several ionization methods, such as heat electrospray ionization (HESI), for mass spectrometry (MS) detection. Native mass spectrometry on an Orbitrap™ platform was recently used to characterize the composition of complex mAbs mixtures generated from single production to be used for batch to batch assessment [28]; the analysis focused on the intact mAbs without previous LC separation.

Our previous research has focused on the development and validation of (RP)HPLC/DAD methods for the rigorous analytical quantification of single therapeutic mAbs using a wide

porous (300 Å) 5 µm particle size packed column [10,11]. We also tried to analyse mAb mixtures, but this proved impossible using this form of analytical chromatography.

In this paper, we present the development and validation of an (RP)UHPLC-UV-(HESI/Orbitrap)MS method for the quantification of mixtures of five commercially available, therapeutic mAbs (i.e. BVZ, CTX, INF, RTX and TTZ). A monolithic column based on a poly(divinylbenzene-co-ethylvinylbenzene) co-polymer was selected to perform mAb separation. The experiment was statistically designed (DoE) to optimize the liquid chromatographic conditions. Direct MS characterization of the intact isoform profile of each mAb was achieved and is described below. We also demonstrated the compatibility of the use of TFA or FA as ion pairing agents for mass spectrometric analysis and for chromatographic separation. Validation was performed according to an internal protocol based on well-known international guidelines. We also propose a new approach for obtaining a model, which we call the heteroscedasticity function, which describes the dependence of the experimental measurement standard deviation vs the mAb concentration.

Materials and methods

Chemicals, reagents and mAb solutions

Reverse-osmosis-quality water was purified with a Milli-RO Milli-Q station from Merck Millipore (Darmstadt, Germany). The reagents used were LC-MS purity grade. Acetonitrile (ACN) was supplied by VWR International Eurolab, S.L. (Barcelona, Spain). Trifluoroacetic acid (TFA) was obtained from Scharlab S.L. (Barcelona, Spain). Lysozyme from chicken egg white was purchased from Sigma Aldrich (Madrid, Spain). Isotonic solution (0.9% NaCl in water for injection) was supplied by B. Braun Medical (Madrid, Spain).

Avastin® (Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlmen, Germany), Erbitux® (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), Remicade® (Janssen Biotech, Horsham, U.S.A.), MabThera® (Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlmen, Germany) and Herceptin® (Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlmen, Germany) are the tradenames of the marketed medicine formats of BEV, CTX, INF, RTX and TTZ respectively used in this study. BEV, CTX and RTX are presented as solutions in water for injection containing 25, 5 and 10 mg/ml respectively [5,6,8]. INF and TTZ are presented as lyophilized powders; they were reconstituted in water for

injection (B. Braun Medical, S.A., Tarrasa, Spain) at a concentration of 10 and 21 mg/mL, respectively, as indicated in the relevant technical specifications [7,9].

The resulting medicine solutions were kindly supplied by the Pharmacy Unit of the Granada Hospitals (Granada, Spain) and then used as laboratory standard solutions since it was impossible to obtain a suitable reference material for each mAb. The standard uncertainty associated with the active pharmaceutical ingredient (API) concentration in the medicine solution is about 5%.

From the standard solutions, three types of work solutions were prepared: calibration, test and validation solutions. The calibration and test solutions were obtained by dilution in deionised water, while the validation solutions were made by dilution in 0.9% NaCl isotonic solution.

Direct (HESI/Orbitrap)MS analysis of single intact mAbs

A Q-Exactive hybrid quadrupole-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) was used to determine the isoform mass spectral profiles individually. The ionization was performed using heated electrospray ionization source (HESI). The platform was managed by Chromeleon 7 and Xcalibur 4.0 software for the chromatographic instrument and Tune Software for the mass spectrometer; all the software was also provided by Thermo Scientific.

To that end, 5 μ L at 50 mg/L of mAb solution were injected through a desalting column (MassPREP Micro desalting column, Water, Milford, MA, USA) with a linear gradient from 5% to 90% of acetonitrile-water, with 0.2% FA as the ion pairing agent for 1.5 min (a modification of the procedure followed in [32]). In order to preserve the mass analyser, the first 0.5 min of the eluent was discarded. The MS conditions were: Full MS positive mode, acquisition mass range 1500-3500 m/z, 3000 VCap, 350 °C capillary temperature, sheath gas flow rate of 35 arbitrary units (auxiliary gas not needed), 106 automatic gain control (AGC) with injection time 50 ms and resolution 17500. The intact molecular masses of each peak from the mAbs were inferred from multiple charged ions and deconvoluted using the Protein Deconvolution software v2.0 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) using manually deconvolving isotopically unresolved mass spectra with ReSpect algorithms.

Reversed phase UHPLC-UV-(HESI/Orbitrap)MS analysis of intact mAbs in mixtures

The method was performed using a proper analytical platform (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Chromatographic separation was carried out using a Dionex Ultimate 3000 chromatograph equipped with two ternary bombs, a degasser, an autosampler, and a thermostated column compartment. The UHPLC system was connected to a multiple-wavelength detector (MWD-3000 Vis-UV detector) and coupled in line to a Q-Exactive Plus mass spectrometer described above.

Chromatographic separations were carried out in a 1 × 50 mm id. monolithic column (ProSwift RP-4H, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) coupled to a 2.1 × 5 mm id. micro desalting column (particle size 20 μm, 1000 Å pore size, MassPREP, provided by Waters, Milford, MA, USA). The column temperature was 60 °C. The flow rate was 0.25 ml/min and 5 μL of mAbs samples solution were injected into the column for analysis. The eluent system was composed of 0.04% TFA in deionised water (eluent A) and 0.04% TFA in ACN (eluent B). The column was equilibrated with 30% of eluent B for 5 min. Then a linear gradient was applied from 30% to 40% of eluent B for 4 min, and kept constant for 6 min. In order to recondition the column, the gradient was reduced to 30% of eluent B for 3 min. Total analysis run time was therefore 13 min.

The UV chromatograms were registered at 214 nm, using 360±10 nm as the reference wavelength. The MS chromatograms were registered from 1 min to 8.5 min in positive mode, with 3000 VCap, a capillary temperature 350 °C and sheath and auxiliary gas flow rates of 35 and 10 units. The resolution was set at 17500 and the scan range was 1500-3500 *m/z*. The AGC Full MS was set at 10⁵ with a maximum injection time of 50 ms and 10 microscan. Nitrogen (99.999%, Air Liquide, Spain) was used as a nebulizer gas. As indicated before, to obtain the molecular weights of the mAbs, the mass spectra were deconvoluted using Protein Deconvolution software v2.0 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) with ReSpect algorithms.

Lysozyme was used as an external quality control standard (QC-standard) for daily control of instrument performance. The area values were verified and accepted if the peak area was within ±5% of the previously determined average area.

Results and discussion

(RP)UHPLC-UV method optimization

The experimental operational conditions of the chromatographic method were optimized by applying the methodology of statistical design of experiments (DoE). The signal from the UV detector was used for optimisation purposes as it is more sensitive than the mass detector. The latter detector was later used for isoform mAbs profile/ identification.

Before applying DoE, two organic modifiers (TFA and FA) were checked in order to improve the mass spectral signal. It is well known that FA is a better ion pairing agent than TFA in the mass spectrometer ion source (HESI). However, we confirmed that FA strongly suppresses the UV-Vis signal. We therefore decided to use TFA despite its worse ionization characteristics. A fixed concentration of 0.04% of TFA in the mobile phase was selected as no improvements in the mass spectral signal were observed at higher concentrations.

To apply this optimization strategy, the chromatographic parameters affecting separation were previously selected on the basis of the results of previous research to develop an analytical (RP)UHPLC method for single mAb quantification. The reported HPLC method mainly describes the use of mobile phases with complex compositions, complex gradients and long run times [15]. Although we used UHPLC, which allows for more compatible mobile phase composition for mass detection, the optimization by DoE presented here aims to improve the optimization of the chromatographic conditions, and to discover new experimental conditions for the simultaneous quantification of mixtures of mAbs.

As explained earlier in the introduction section, we used a divinylbenzene based-monolith column (ProSwift RP-4H) because it is indicated for fast, efficient separation of proteins, including those which, like mAbs, have high molecular weight and hydrophobicity. With this type of column, it is also possible to use a mobile phase composed of common solvent systems –such as water and ACN, and TFA as an organic modifier– instead of the complex solvent systems that must be applied when particle-bed columns are used [10,11].

Two experimental designs were sequentially performed to achieve the chromatographic separation of five mAbs (BEV, CTX, INF, RTX and TTZ). No quantitative variable response was used. The selection of the best conditions was performed qualitatively by means of the visual analysis of the chromatograms as we had been unable to define a suitable response function due to the unresolved chromatographic peaks obtained in several chromatographic analyses.

The first design was a fractional factorial two-level design (2^{4-1}) for four factors or operational variables. The variables selected were the gradient of the mobile phase expressed as the slope of the ramp (in %/min), the temperature of the column (in °C), the initial composition of eluent B of the mobile phase (in %), and the flow rate (in ml/min). The experimental domain is shown in Table 1.a. The second design was a full factorial two-level design (2^3) for three factors: the gradient of the mobile phase (in %/min), the temperature of the column (in °C) and the flow rate (in ml/min). The experimental domain is also shown in Table 1.b.

Table 1. The chromatographic factors and corresponding level settings. a) in 2^{4-1} design (DoE 1) and b) 2^3 design (DoE 2)

a)				
Level	Gradient (%/min)	Column temperature (°C)	Initial proportion of eluent B (%)	Flow rate (ml/min)
-1	3.0	45	10	0.20
0	4.0	55	30	0.30
+1	5.0	65	50	0.40

b)			
Level	Gradient (%/min)	Temperature (°C)	Flow rate (ml/min)
-1	2.5	50	0.25
0	3.0	55	0.30
+1	3.5	60	0.35

In both cases, the experimental matrix is composed of eight experimental runs plus two additional central points. Two replicates were carried out for each experimental run, making a total of 20 chromatographic runs for the whole experimental study.

The results of the application of the first design proved crucial in the selection of the percentage of the mobile phase composition from which the gradient starts, the most critical operational variable in successful chromatographic separation of mAbs. This could be due to the need for very specific conditions of polarity inside the column, modifications of which are required to obtain proper mAbs separation. It could also be inferred that mAbs separation is therefore produced by very slight differences in polarity. Once the

initial composition of the mobile phase had been established, the second design was then applied to select the other chromatographic conditions indicated in Table 1.

The optimal chromatographic conditions from design 1 were: slope gradient 3%, flow rate 0.3 ml/min, initial composition of eluent B 30%, and column temperature 55 °C. Three of the five mAbs were successfully separated by applying these experimental conditions. design 2 was then applied in order to improve the results. The variable "initial composition of eluent B in the mobile phase" was fixed and excluded from design 2. The results of this second study indicated that the best chromatographic conditions for mAbs separation were a gradient of 2.5%, a flow rate of 0.25 ml/min and a column temperature of 60 °C. Nevertheless, chromatographic separation of the five therapeutic mAbs was not achieved as TTZ and RTX eluted simultaneously. If we take into account the experimental results, it can be inferred that the simultaneous chromatographic separation of these five mAbs is impossible with the current reversed-phase column, or with the packet column [13,17] or indeed with the monolithic column. The high level of structural similarity between TTZ and RTX makes it difficult to separate them using reversed-phase mode chromatography.

Figure 2 shows the chromatographic separations obtained with the selected conditions from Design 2. The first peak is the solvent. The five initial mAbs were split into two mixtures of four mAbs each, one containing RTX (Figure 2(a)) and the other TTZ (Figure 2(b)). In both chromatograms, two peaks were not entirely resolved to the base line, i.e. RTX and INF (Figure 2(a)) and TTZ and INF (Figure 2(b)), nevertheless these overlaps were resolved by dropping a perpendicular line.

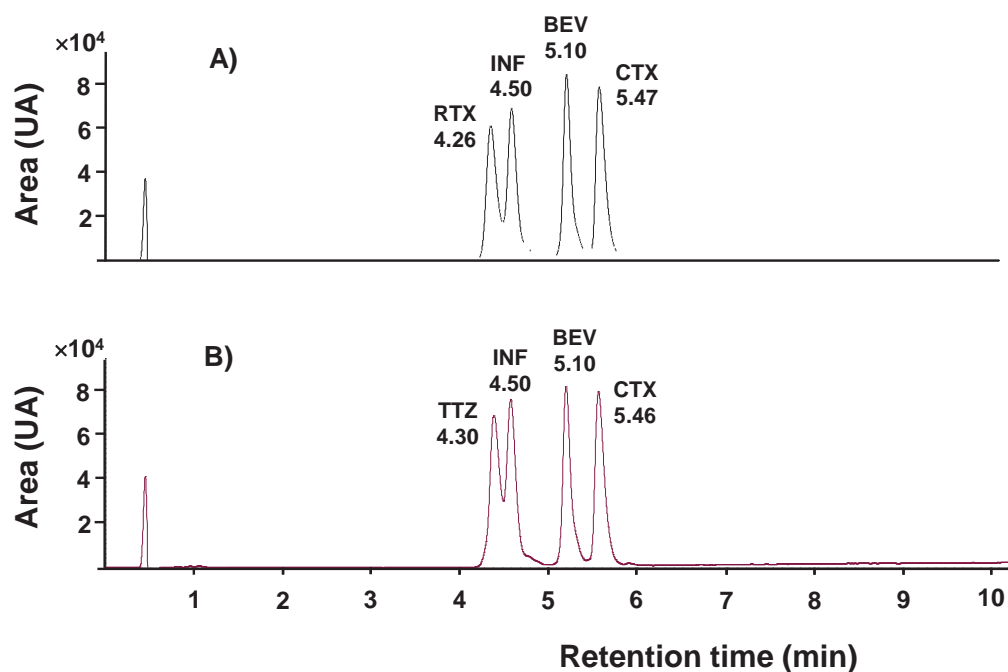


Figure 2. UV chromatograms corresponding to the analytical method; separation I: (A) TTZ, INF, BEV and CTX; and (B) separation II: RTX, INF, BEV and CTX. Concentration 50 mg/L of each mAbs. (TTZ, trastuzumab; RTX, rituximab; INF, infliximab; BEV, bevacizumab; and CTX, cetuximab).

Method validation for mAbs quantification

There are various recognised guidelines that can be used as a reference for analytical method validation in the pharmaceutical field, i.e. the International Conference on Harmonization (ICH) guideline [33]; the US Food and Drugs Administration (FDA) guideline [34]; and the United States Pharmacopeia (USP) guideline [35]. These guideline documents do not establish legally enforceable responsibilities and should only be considered as recommendations. The validation we reported has been developed by an internal protocol based on the aforementioned guidelines. The Statgraphics Centurion XVI (Statgraphics Technologies, The Plains, VA, USA) software package was used for the statistical analysis.

The analytical validation was carried out for the two chromatographic separations we performed; separation (I) of BEV, CTX, INF, RTX, and separation (II) of BEV, CTX, INF, TTZ. The validations were made on the basis of calibration goodness-of-fit (linearity), accuracy

(precision and trueness), limits of detection and quantification and robustness. Robustness will be discussed in the next subsection.

Calibration goodness-of-fit (linearity)

Two sets of five independent aliquots of three multi-standard solutions were prepared at 10, 35 and 50 mg/L of each mAb (calibration solutions). The first set contained BEV, CTX, INF and RTX, and the second contained BEV, CTX, INF and TTZ. Each solution was analysed in duplicate.

Two different calibration curves were obtained. Each calibration data set was fitted by a weighted residual least-squares linear regression (WLS). The inverse of the standard deviation for the area was used as the weighting factor, and each one of the values was predicted from a proper heterocedasticity function. In order to obtain a model describing the dependence of the experimental measurement standard deviation vs the concentration of mAb for each calibration data set, two representative linear functions, referred to as 'heterocedasticity functions', were fitted by ordinary residual least-squares regression (OLS). To that end, for each mAb and for each concentration level, a peak area standard deviation was calculated from the calibration data set. We then regressed the twelve standard deviation values from each calibration vs the mAb concentration. Both plots are shown in Figure 3.

We also studied the significance of the intercept of the calibration lines. All intercept values were non-significant (P-values ≥ 0.49 , in all cases), so when new calibration functions were fitted only the slope was considered (regression to the origin).

The linearity was studied, bearing in mind the subsequent application of the method and the limitations of the mass spectrometer, i.e. the concentration under hospital conditions of mAbs and the use of a low concentration in order not to saturate the mass spectrometer. The linearity of the curves was evaluated by the coefficient of determination (R^2) and the lack-of-fit signification test. The linearity index (LIN) was also calculated, as described by Equation 1.

$$\text{LIN}(\%) = 1 - \left(\frac{s_b}{b} \right) \times 100 \quad (1)$$

where b is the slope and s_b is the associated standard deviation. Linearity was accepted if the lack-of fit P-value (P_{LOF}) was more than 5%, and the coefficient of determination and the linearity index were over 98% and 95% respectively. The new calibration functions have satisfactory values of P_{LOF} , R^2 and LIN.

The calibration performance characteristics are summarized in Table 2, the results shown for BEV, CTX and INF are for the best calibration of the two analytical separations, although comparable results were achieved from both calibrations.

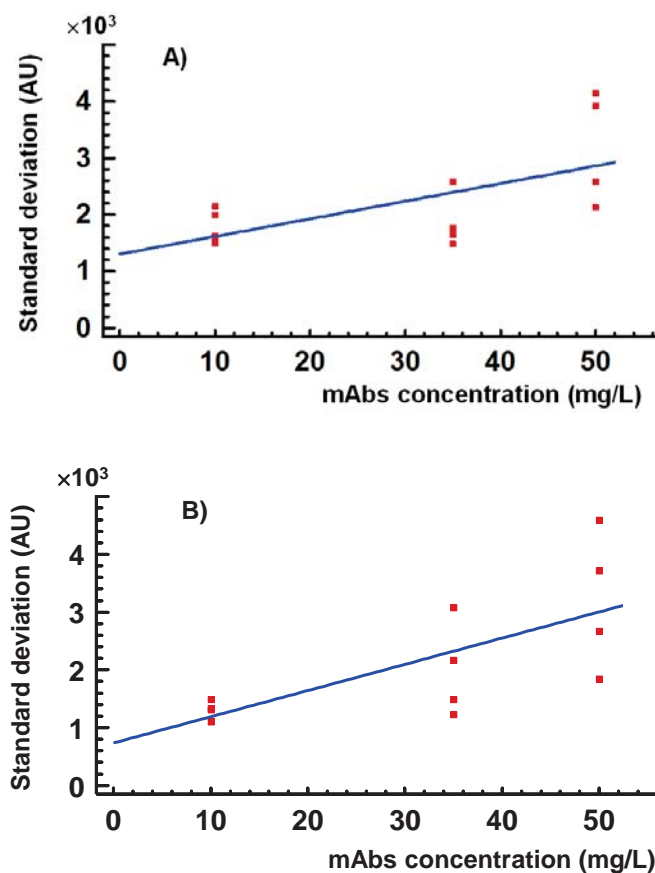


Figure 3. Heterocedasticity functions for the analytical method we developed: (A) analytical separation I; and (B) analytical separation II (read text for additional details).

Table 2. Performance characteristics of the analytical method (RP/UHPLC-UV): (A) calibration, (B) lower limits.

	BEV	CTX	INF	RTX	TTZ	BEV	CTX	INF	RTX	TTZ
(a) Calibration										
	Linear calibration (no-null intercept)					Linear calibration (intercept fitted to zero)				
Slope, b (AU* / (mg/L))	15108	14454	13932	13479	15716	14815	14544	13884	13401	15537
s_b (AU* / (mg/L))	244.5	166.2	277.4	211.7	308.1	137.5	90.9	141.6	108.3	168.6
Intercept, a (AU*)	-10561	3249	-1824	-2954	-6410	--	--	--	--	--
s_a (AU*)	7336.9	4988.1	8961.0	6839.7	9244.4	--	--	--	--	--
R ² (%)	98.8	99.6	98.9	99.3	98.9	99.8	99.9	99.7	99.8	99.7
LIN (%)	98.4	98.8	98.0	98.4	98.0	99.1	99.4	98.4	99.2	98.9
P _{LoF} (%)	58.6	24.8	44.8	8.2	80.6	64.4	41.4	73.1	19.7	77.1
Interval (mg/L)	0 - 50					0 - 50				
(b) Lower limits										
	S/N-LOD (mg/L)					S/N-LOD (mg/L)				
	Statistical-LOD (mg/L)					Statistical-LOD (mg/L)				
	S/N-LOQ (mg/L)					S/N-LOQ (mg/L)				
	Statistical-LOQ (mg/L)					Statistical-LOQ (mg/L)				
	0.35	0.33	0.20	0.20	0.12	0.35	0.33	0.20	0.18	0.12
	0.23	0.22	0.21	0.21	0.20	0.23	0.22	0.21	0.23	0.20
	1.18	1.10	0.66	0.66	0.42	1.18	1.10	0.66	0.60	0.42
	0.75	0.73	0.72	0.72	0.65	0.75	0.73	0.72	0.76	0.65

* AU: Arbitrary units

Limits of detection and quantification

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were assessed according to two different methodologies: (i) the signal to noise ratio (S/R) measured on a blank ($3 \cdot S/R$ for LOD, and $10 \cdot S/R$ for LOQ); and (ii) the standard deviations at zero concentration ($s_{c=0}$) for each mAb, which are statistically inferred from the calibration data set. These standard deviations were estimated from the heterocedasticity function; this is a new method developed for this study.

The values obtained for both lower limits are shown in Table 3(b). As can be seen, very similar values were obtained from the two approaches.

Accuracy (precision and trueness)

The precision and trueness of the two separations were firstly determined from two types of validation solutions: (i) one-mAb validation solutions containing a single mAb; and (ii) two-mAb validation solutions, which were made up of a blend of two mAbs. The use of these combinations of mAbs in clinical oncology has already been proposed [36]. In order to allow representative solutions of the therapeutic dosage to form, the concentration of the validation solution was fitted to the most habitual use of the medicine for a 70 kg person. The validation solutions were diluted in ratios of 1/20, 1/100 and 1/500 in order to ensure that the therapeutic concentration of each mAb was within the calibration interval (0-50 mg/L). The selected dilution ratio depends on the therapeutic concentration of the validation solution.

Trueness was also evaluated from ten independent aliquots of the test solutions at three concentrations: 50, 35 and 10 mg/L. Table 3 shows the concentration of both the test and validation solutions analysed.

Precision was expressed as repeatability and intermediate precision (interday precision), which was evaluated by analysis of variance (ANOVA). The results are calculated as relative standard deviations (RSD). The interday precision was calculated over two non-consecutive days. No significant difference was found between the values of repeatability and interday RSDs. Table 4(b) shows the precision results.

Trueness was assessed from the bias relative error (Er). Two statistical tests were done, an overall conventional t-student test of the relative error (null hypothesis, $Er = 0$), and an

ISO-recommended statistical test considering the test and validation solutions one by one, according to ISO Guide 33:2015 [37]. The following equations were applied:

$$\frac{x_{\text{refer}} - x_{\text{found}}}{S_D} \leq 2 \quad (2)$$

$$S_D = \sqrt{s_{\text{std}}^2 + \frac{s_{\text{lab}}^2}{r}} \quad (3)$$

Where x_{add} and x_{found} are respectively the theoretical added concentration and the found concentration in the samples. S_D is the standard deviation from the difference, which is calculated by Equation 3. s_{std}^2 is the variance associated with the hospital preparation of the medicine solution (5%), s_{lab}^2 is the validation precision variance, and r is the number of replicates.

The overall t-student test shows non-significant differences between the reference and found concentrations in both the test and validation solutions (P-value 0.23 and 0.49 respectively). In addition, when the ISO-test is applied, all the single differences are less than the critical value.

Table 3 shows the trueness results for both the test and validation solutions.

Robustness

Robustness testing was performed to provide us with reliable information about the critical operational variables affecting the response. Robustness was evaluated by applying a suitable methodology based on experimental design. The variables studied were column temperature (°C), concentration of TFA in the mobile phases (% v/v), initial proportion of eluent B (% v/v) and gradient (%/min). A tree-level fractional factorial design (34-2) was performed.

The design is shown in Table 4.

Table 3. Accuracy of the analytical method (RP/UHPLC-UV).

mAb	Reference (mg/L)	Relative standard deviation (%)	Found (mg/L)	Relative error (%)
a) Test solutions				
BEV	50	--	50.1	0.2
	35	--	35.2	0.6
	10	--	9.4	-5.4
CTX	50	--	49.6	-0.7
	35	--	35.3	1.0
	10	--	10.1	0.96
INF	50	--	49.8	-0.5
	35	--	35.4	1.1
	10	--	9.8	-1.9
RTX	50	--	49.6	-0.9
	35	--	35.7	1.9
	10	--	9.7	-3.3
TTZ	50	--	50.3	0.5
	35	--	34.9	-0.4
	10	--	9.7	-2.7
b) One-mAb validation solutions				
BEV	10500	18.6	10244	-2.4
CTX	2900	18.3	2713	-6.4
INF	1450	17.6	1395	-3.8
RTX	1400	16.4	1350	-3.6
TTZ	1680	17.5	1789	6.5
c) Two-mAb validation solutions				
BEV	3500	--	3709	6.0
CTX	3500	--	3606	6.7
BEV	7000	--	6845	-2.2
RTX	6200	--	6443	3.9
BEV	10500	--	10911	3.9
TTZ	5600	--	5963	6.5

Table 4. Tree-level fractional factorial design ($3^{4-2} + 2$ central points) used in the robustness study.

Run	Column temperature (°C)		TFA content (%) in the mobile phases		Initial proportion of eluent B (%)		Gradient (%/min)	
1	60	(0)	0.040	(0)	30	(0)	2.5	(0)
2	58	(-1)	0.035	(-1)	32	(+1)	2.5	(0)
3	60	(0)	0.035	(-1)	28	(-1)	2	(-1)
4	62	(+1)	0.035	(-1)	30	(0)	3	(+1)
5	58	(-1)	0.040	(0)	28	(-1)	3	(+1)
6	60	(0)	0.040	(0)	30	(0)	2.5	(0)
7	62	(+1)	0.040	(0)	32	(+1)	2	(-1)
8	58	(-1)	0.045	(+1)	30	(0)	2	(-1)
9	60	(0)	0.045	(+1)	32	(+1)	3	(+1)
10	62	(+1)	0.045	(+1)	28	(-1)	2.5	(0)
11	60	(0)	0.040	(0)	30	(0)	2.5	(0)

The values of the variables in the central point are the nominal values from the previously optimized method. Two replicates of each run were carried out in order to gain enough information about the experimental error. This means that a total of 22 experimental runs were performed.

The values for the response variable were calculated using Equation 4, in which the chromatogram from the nominal condition (central point) was used as a reference.

$$Y_i = \frac{A_{\text{ref}}}{A_i} \times (t_i - t_{\text{ref}}) \quad (4)$$

A_{ref} is the sum of the areas from all the chromatographic peaks of the mAbs in the reference chromatogram, A_i is the sum of the areas from all the chromatographic peaks of the run chromatogram, t_i is the time corresponding to the first peak in the run

chromatogram and t_{ref} is the time corresponding to the first peak in the reference chromatogram.

The tree-level fractional factorial design should have two parts. Indeed, if we imagine a line passing through run 6, the runs below the line are a mirror image of the runs above it (the value -1 acquires the value $+1$ and viceversa, while the central point remains unchanged). The design has an orthogonal structure as for each value of one variable ($+1$, 0 and -1), the other variables acquire the opposite value throughout the entire design. Total and one-sided effects (right effect, $E(+)$; left effect, $E(-)$) of the operational variables were determined by Equations 5, 6 and 7, respectively.

$$E = \frac{1}{3r} \left[\sum_1^{3r} Y_i(+1) - \sum_1^{3r} Y_i(-1) \right] \quad (5)$$

$$E(+)= \frac{1}{3r} \left[\sum_1^{3r} Y_i(+1) - \sum_1^{3r} Y_i(0) \right] \quad (6)$$

$$E(-)= \frac{1}{3r} \left[\sum_1^{3r} Y_i(-1) - \sum_1^{3r} Y_i(0) \right] \quad (7)$$

$Y_i(+1)$, $Y_i(0)$ and $Y_i(-1)$ are the response of the variables at high, nominal and low level respectively. r is the number of replicates.

Three vertical bar-charts of the total and the one-sided effects are shown in Figure 4. The significance threshold (a black horizontal line in the bar-charts) is calculated from the standard deviation related to the estimate of the effects, which in turn depends on the standard deviation of the response.

The total effects of the temperature, the proportion of TFA in the mobile phases, and the slope of the gradient are not significant in the studied range. The one-sided effects obtained for these variables are also not significant, which confirms the result obtained in the total effect study. On the other hand, the initial proportion of eluent B shows a significant total effect, making it the only variable with a significant influence on the system (small modifications could yield systematic differences in the chromatographic separation). The one-sided effects were analysed in order to determine the direction of this significant effect. The results show a significant right-sided effect, which implies that this variable could take values from 28 (-1) to 30 (0) and the response of the system

would remain unchanged. This variable therefore requires strict control of the composition of the mobile phase.

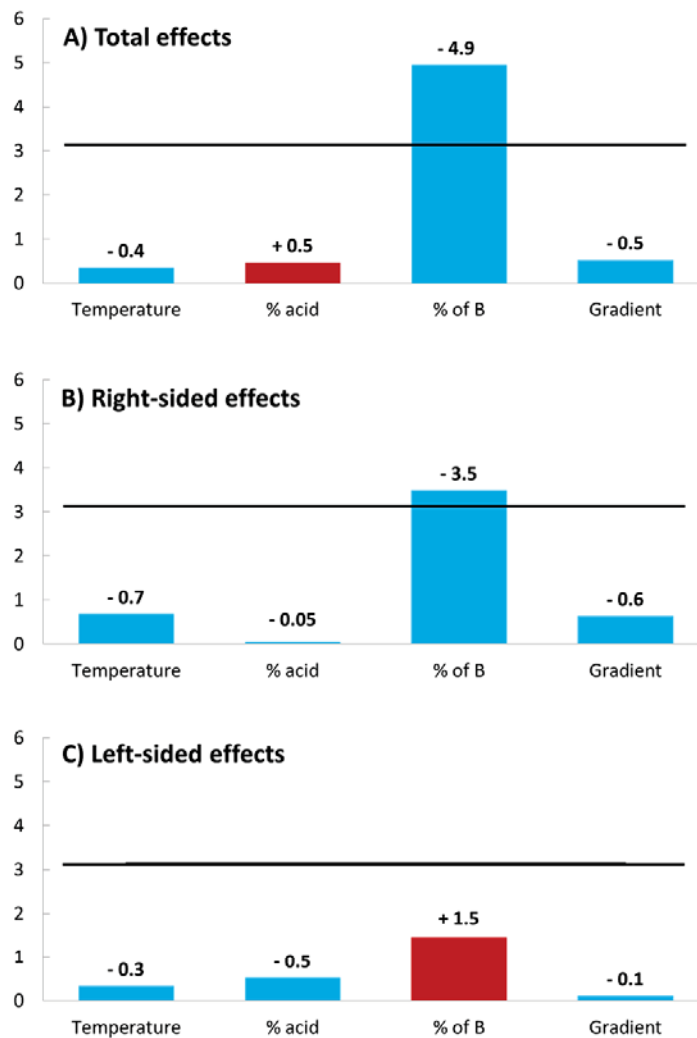


Figure 4. Bar-charts showing the total (A), right-sided (B) and left-sided (C) effects for the variables analysed in the robustness study. The horizontal line denotes the effect significance threshold.

Isoforms profile determination of intact mAbs by direct (HESI/Orbitrap)MS and RP/UHPLC-UV-(HESI/Orbitrap)MS

Once the method for quantification had been optimized and validated, the mAbs isoform profiles were obtained by coupling the chromatographic systems to the (HESI/Orbitrap)MS.

Earlier, we had optimized the mAbs isoform profiles using FA by direct injection of each single mAb into the mass detector with only one previous sample desalting column. The experimental optimized conditions for this analysis were a modification of reference [32]. The mass detector parameters were adjusted with similar gradient conditions for the desalting column as those indicated in reference [32]. The selected experimental conditions were identical for the five mAbs. In addition to obtaining a direct method for isoform profiling, our objective was also to compare the isoform profile previously obtained by the chromatographic method discussed above in which TFA was used as the ion pairing agent with that obtained in this new direct method using FA.

Figure 5 shows the deconvoluted mass spectra obtained for each mAb by the two different methods; spectra A, C, E, G and I were obtained by the direct (HESI/Orbitrap)MS method (using FA as the ion pairing agent) and spectra B, D, F, H and J were obtained by (RP)UHPLC-UV-(HESI/Orbitrap)MS (using TFA as the ion pairing agent). The mass spectra were acquired with the lower resolution power (i.e. 17500). The most abundant glycoforms for each mAb were also determined.

To correlate the experimental masses and interpret the data generated, the theoretical average masses of the expected mAbs isoforms were calculated on the basis of the theoretical sequence of the mAbs provided in different sources [31,38,39] (Table 5).

Some adjustments were made to account for the loss of C-terminal lysine (-128 Da) per heavy chain, for the incorporation of 16 disulphide bonds (-32 Da), and for the addition of most of the N-glycans to the average mass of the biomolecules. A pyroglutamic acid formation was considered as a modification of the theoretical average mass for INF and for RTX (-17 Da). The accuracy (in ppm) of the intact masses calculated (Table 1) was consistent with that expected for the intact analysis of a typical IgG1 [40,41].

As a general pattern for the five mAbs we studied, the charge state and the number of isoforms detected were higher when we used FA than when we used TFA. Sensitivity – after taking the mass signal intensity into account – was at least one order greater for the

experiments with FA. The most abundant isoforms detected were the same for the two ionizer agents, although the number of isoforms detected was higher when FA was used as the modifier.

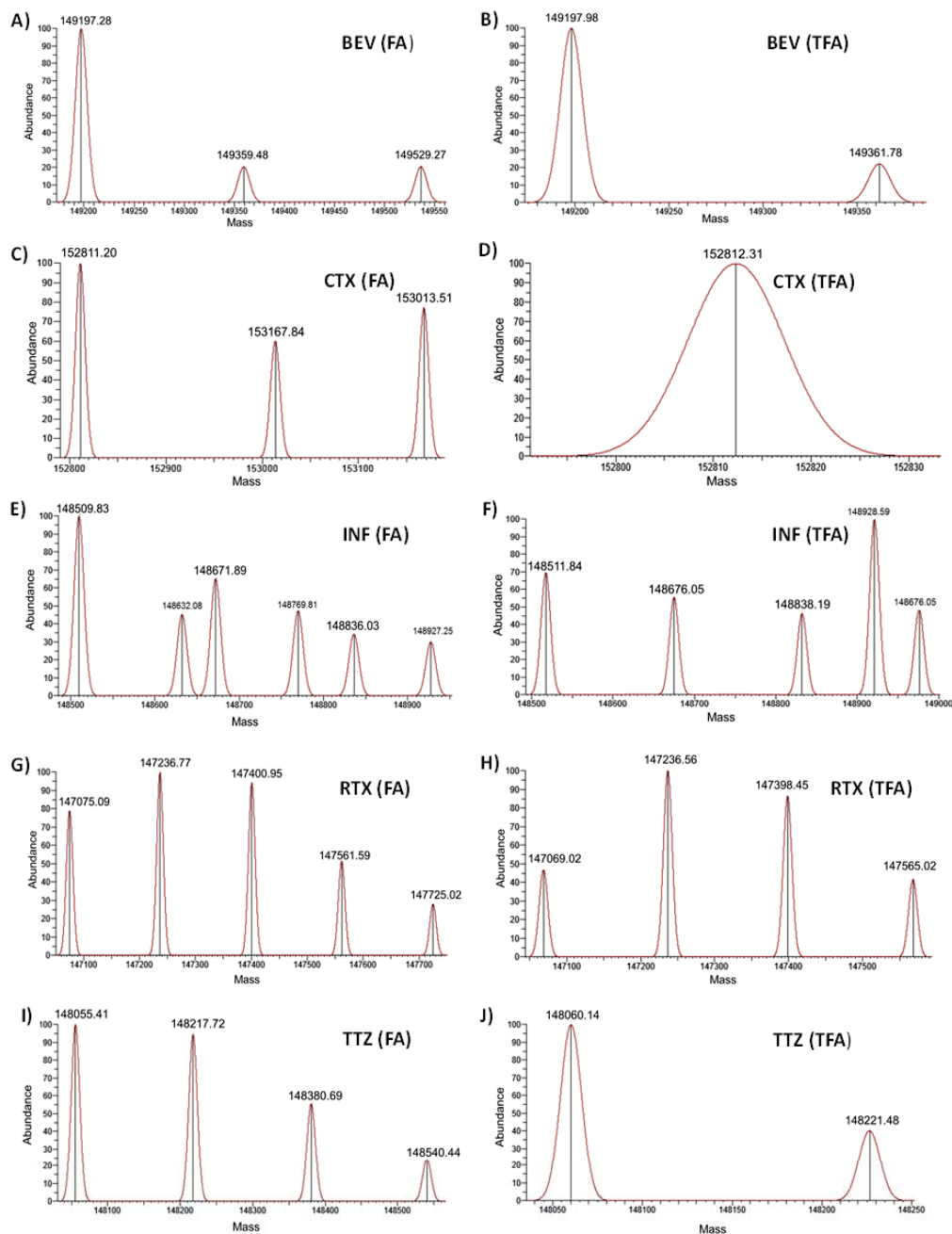


Figure 5: Deconvoluted mass spectra for the five mAbs showing the mass isoform profiles when formic acid (FA) and trifluoroacetic acid (TFA) are used as mobile phase modifiers. Bevacizumab (FA (A) and TFA (B)), cetuximab (FA (C) and TFA (D)), infliximab (FA (E) and TFA (F)), rituximab (FA (G) and TFA (H)), and trastuzumab (FA (I) and TFA (J)).

Table 5. Experimental mass for the different intact mAb glycoforms and the difference between the experimental mass and the theoretical average mass. The relative abundances of glycoforms are also shown.

mAb	Conditions	Modifications/Glycoforms	Experimental mass	Theoretical average mass	Mass difference (ppm)	Relative abundance (%)
BEV		No C-term K, 16 S-S bonds, G0F/G0F	149197.2813	149197.1980	0.56	71.0
	FA	No C-term K, 16 S-S bonds, G0F/G1F	149359.4844	149359.3389	0.97	14.5
		No C-term K, 16 S-S bonds, G1F/G1F or G0F/G2F	149530.2656	149521.4797	58.76	14.5
CTX	TFA	No C-term K, 16 S-S bonds, G0F/G0F	149197.9844	149197.198	5.27	81.9
		No C-term K, 16 S-S bonds, G0F/G1F	149361.7813	149359.3389	16.35	18.1
	FA	Unknown	152811.2031	---	---	42.1
INF		Unknown	153167.8438	---	---	35.5
	TFA	Unknown	153013.5156	---	---	25.4
		Unknown	152812.3125	---	---	100
CTX		No C-term K,-pyroglutamic acid, 16 S-S bond, G0F/G0F	148509.8281	148510.3662	3.62	50.1
	FA	No C-term K,-pyroglutamic acid, 16 S-S bonds, G0F/G1F	148671.8906	148672.5070	4.14	32.7
		No C-term K,-pyroglutamic acid, 16 S-S bonds, G1F/G1F or G0F/G2F	148836.0313	148834.6479	9.29	17.9
INF		No C-term K,-pyroglutamic acid, 16 S-S bonds, G0F/G0F	148511.8438	148510.3662	9.95	39.8
	TFA	No C-term K,-pyroglutamic acid, 16 S-S bonds, G0F/G1F	148676.0469	148672.5070	23.80	35.9
		No C-term K,-pyroglutamic acid, 16 S-S bonds, G1F/G1F or G0F/G2F	148838.1875	148834.6479	23.78	29.1

*Continuation of Table 5

mAb	Conditions	Modifications/Glycoforms	Experimental mass	Theoretical average mass	Mass difference (ppm)	Relative abundance (%)
		No C-term K, -pyroglutamic acid, 16 S-S bonds, G0F/G0F	147075.0938	147075.3425	1.69	22.5
		No C-term K, -pyroglutamic acid, 16 S-S bonds, G0F/G1F	147236.7656	147237.4836	4.88	28.3
		No C-term K, -pyroglutamic acid, 16 S-S bonds, G1F/G1F or G0F/G2F	147400.9531	147399.6236	9.02	26.6
RTX		No C-term K, -pyroglutamic acid, 16 S-S bonds, G1F/G2F	147561.5781	147561.7645	1.26	14.6
		No C-term K, 16 S-S bonds, G2F/G2F	147725.0156	147723.9056	7.51	8.0
		No C-term K, 16 S-S bonds, G0F/G0F	147069.0156	147075.3425	43.02	17.1
TFA		No C-term K, 16 S-S bonds, G0F/G1F	147236.5625	147237.4836	6.26	36.3
		No C-term K, 16 S-S bonds, G1F/G1F or G0F/G2F	147398.4531	147399.6236	7.94	31.4
		No C-term K, 16 S-S bonds, G1F/G2F	147565.0156	147561.7645	22.03	15.2
		No C-term K, 16 S-S bonds, G0F/G0F	148055.4063	148056.5623	7.78	36.5
		No C-term K, 16 S-S bonds, G0F/G1F	148217.7188	148218.7033	6.63	34.5
		No C-term K, 16 S-S bonds, G1F/G1F or G0F/G2F	148380.6875	148380.8433	1.03	20.3
TTZ		No C-term K, 16 S-S bonds, G1F/G2F	148540.4400	148542.9843	17.13	8.7
		No C-term K, 16 S-S bonds, G0F/G0F	148060.1406	148056.5623	24.17	71.3
		No C-term K, 16 S-S bonds, G0F/G1F	148221.4844	148218.7033	18.76	28.7

Three isoforms were detected in BEV using FA and only two of these were detected using TFA. CTX proved to be the most difficult for MS analysis, which could be due to its more complex glycosylation characteristics; three isoforms were detected with FA and only one using TFA. The highest number of isoforms detected using the two ion pairing agents were for INF (6 for TFA and 5 for FA), although a complete identification could not be performed as in some cases different masses did not correspond to acceptable glycans. Several isoforms were also detected and identified in RTX, i.e. 5 for FA and 4 for TFA. TTZ was characterized by 4 isoforms with FA while TFA only characterized the 2 simplest ones.

These results are important since in the liquid chromatographic method explained above in Section 2.3, FA was discarded for use in the mobile phase because it was found to suppress the UV signal in the optical detector due to its high absorbance. We were therefore forced to use TFA to obtain a suitable peak shape with maximum efficiency in the chromatographic separation of mAbs, despite the worse MS results obtained compared with FA. Nevertheless, and despite the fact that the intact isoform mass spectral profile is more realistic using FA –more isoforms detected with better quality of their mass parameters and better accuracy–, the use of TFA allows us to detect at least the most abundant intact isoforms, as demonstrated by the results of these experiments, so validating the use of TFA with identification and characterization purposes coupled with a UHPLC-UV method.

Conclusions

This paper demonstrates that the chromatographic separation of intact commercially available therapeutic mAbs can be achieved using (RP)LC with a divinylbenzene-based monolithic column. Separation can be achieved despite the similarity in their structure – typically IgG1– which results in similar hydrophobicity features. To the best of our knowledge this is the first method to analyse mixtures of therapeutic intact mAbs focused on quantification. Up to now, (RP)LC has been used for the analysis of single therapeutic mAbs, intact or enzymatically digested, but has never been used in mixtures.

The (RP)UHPLC-UV-(HESI/Orbitrap)MS method we developed is fast and straightforward, and allows for the simultaneous quantification (by UV-absorption measurement) and identification (by (Orbitrap)MS) of mixtures of up to four mAbs in therapeutic solutions. Due to the simplicity of the sample solution preparation and the short analysis time (10

min), the proposed analytical method can be used in quality control when *ad hoc* mixtures are prepared in hospitals and when formulated as combined mAbs therapies.

The applicability and reliability of the analytical method for quantification purposes was confirmed by a proper method validation. Taking into account the complexity associated with the analytical determination of biomolecules, the results of the validation process confirmed that the proposed method is accurate and robust. Good detection and quantification limits were also achieved. Robustness was determined by the one-sided effects of four main operational variables; such effects were estimated from a DoE-based strategy. The proportion of eluent B was shown to be the most critical parameter.

In addition, a novel approach was successfully applied to obtain a model (the heteroscedasticity function) that describes the dependence of the experimental measurement standard deviation *vs* the mAb concentration. This function could be used to predict the standard deviation associated with any mAb concentration, for example, to fit the calibration curve by means of weighted residual least-squares linear regression or to determine the detection limit.

The direct (HESI/Orbitrap)MS method confirms that the glycoform MS profile of the mAbs was not exactly the same when using TFA or FA as ion pairing agents, as more isoforms were detected with greater sensitivity using FA. Nevertheless, we demonstrated that these differences were not dramatic and that TFA could also be used both as an ion pairing agent in the ionization source of the MS and also in the mobile phase of the chromatographic separation, as FA saturated the UV signal.

References

- [1] H. Kaplon, J.M. Reichert, Antibodies to watch in 2018, *MAbs.* 10 (2018) 183–203.
- [2] Z. Elgundi, M. Reslan, E. Cruz, V. Sifniotis, V. Kayser, The state-of-play and future of antibody therapeutics, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 122 (2017) 2–19.
- [3] D.M. Ecker, S.D. Jones, H.L. Levine, The therapeutic monoclonal antibody market, *MAbs.* 7 (2015) 9–14.
- [4] C.W. Lindsley, New 2016 Data and Statistics for Global Pharmaceutical Products and Projections through 2017, *ACS Chem. Neurosci.* 8 (2017) 1635–1636.
- [5] EMA/302947/2017, European Public Assessment Report (EPAR) Summary for Avastin, Annex I: Summary of product characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK), 2017.
- [6] EMA/13275/2014, European Public Assessment Report (EPAR) Summary for Erbitux, Annex I: Summary of product characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK), 2014.
- [7] EMA/76495/2012, European Public Assessment Report (EPAR) Summary for Remicade, Annex I: Summary of product characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK), 2012.
- [8] EMA/424820/2016, European Public Assessment Report (EPAR) Summary for Mabthera, Annex I: Summary of product characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK), 2016.
- [9] EMA/981900/2011, European Public Assessment Report (EPAR) Summary for Herceptin, Annex I: Summary of product characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK), 2017.
- [10] N. Navas, A. Herrera, A. Martínez-Ortega, A. Salmerón-García, J. Cabeza, L. Cuadros-Rodríguez, Quantification of an intact monoclonal antibody, rituximab, by (RP)HPLC/DAD in compliance with ICH guidelines, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 9351–9363.
- [11] 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 (2016) 117–124.
- [12] K. Sandra, I. Vandenheede, P. Sandra, Modern chromatographic and mass spectrometric techniques for protein biopharmaceutical characterization, *J. Chromatogr. A.* 1335 (2014) 81–103.
- [13] S. Fekete, S. Rudaz, J. Fekete, D. Guillarme, Analysis of recombinant monoclonal antibodies by RPLC: Toward a generic method development approach, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 70 (2012) 158–168.
- [14] S. Fekete, S. Rudaz, J.L. Veuthey, D. Guillarme, Impact of mobile phase temperature on recovery and stability of monoclonal antibodies using recent reversed-phase stationary phases, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 3113–3123.
- [15] T.M. Dillon, P. V. Bondarenko, M. Speed Ricci, Development of an analytical reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry method for characterization of recombinant antibodies, *J. Chromatogr. A.* 1053 (2004) 299–305.

- [16] T.M. Dillon, P. V. Bondarenko, D.S. Rehder, G.D. Pipes, G.R. Kleemann, M.S. Ricci, Optimization of a reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry method for characterizing recombinant antibody heterogeneity and stability, *J. Chromatogr. A.* 1120 (2006) 112–120.
- [17] S. Fekete, D.S. Jensen, J. Zukowski, D. Guillarme, Evaluation of a new wide-pore superficially porous material with carbon core and nanodiamond-polymer shell for the separation of proteins, *J. Chromatogr. A.* 1414 (2015) 51–59.
- [18] S. Fekete, D. Guillarme, Reversed-phase liquid chromatography for the analysis of therapeutic proteins and recombinant monoclonal antibodies, *LC GC.* 25 (2012) 540–550.
- [19] F. Svec, J.M.J. Fréchet, Continuous Rods of Macroporous Polymer as High-Performance Liquid Chromatography Separation Media, *Anal. Chem.* 64 (1992) 820–822.
- [20] Q.C. Wang, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Macroporous polymeric stationary-phase rod as continuous separation medium for reversed-phase chromatography, *Anal. Chem.* 65 (1993) 2243–2248
- [21] J. Mohr, R. Swart, M. Samonig, G. Böhm, C.G. Huber, High-efficiency nano- and micro-HPLC - high-resolution orbitrap-MS platform for top-down proteomics, *Proteomics.* 10 (2010) 3598–3609.
- [22] S. Eeltink, S. Wouters, J.L. Dores-Sousa, F. Svec, Advances in organic polymer-based monolithic column technology for high-resolution liquid chromatography-mass spectrometry profiling of antibodies, intact proteins, oligonucleotides, and peptides, *J. Chromatogr. A.* 1498 (2017) 8–21.
- [23] S. Fekete, J.L. Veuthey, S. Eeltink, D. Guillarme, Comparative study of recent wide-pore materials of different stationary phase morphology, applied for the reversed-phase analysis of recombinant monoclonal antibodies, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 3137–3151.
- [24] L.M. Henricks, J.H.M. Schellens, A.D.R. Huitema, J.H. Beijnen, The use of combinations of monoclonal antibodies in clinical oncology, *Cancer Treat. Rev.* 41 (2015) 859–867.
- [25] T. Robak, The emerging therapeutic role of antibody mixtures, *Expert Opin Biol Ther.* 13 (2013) 953–958.
- [26] G. Fuentes, M. Scaltriti, J. Baselga, C.S. Verma, Synergy between trastuzumab and pertuzumab for human epidermal growth factor 2 (Her2) from colocalization: An in silico based mechanism, *Breast Cancer Res.* 13 (2011) R54.
- [27] S.K. Rasmussen, H. Næsted, C. Müller, A.B. Tolstrup, T.P. Frandsen, Recombinant antibody mixtures: Production strategies and cost considerations, *Arch. Biochem. Biophys.* 526 (2012) 139–145.
- [28] N.J. Thompson, L.J.A. Hendriks, J. De Kruif, M. Throsby, A.J.R. Heck, Complex mixtures of antibodies generated from a single production qualitatively and quantitatively evaluated by native Orbitrap mass spectrometry, *MAbs.* 6 (2014) 197–203.
- [29] A. Goyon, A. Beck, O. Colas, K. Sandra, D. Guillarme, S. Fekete, Evaluation of size exclusion chromatography columns packed with sub-3 μm particles for the analysis of biopharmaceutical proteins, *J. Chromatogr. A.* 1498 (2017) 80–89.

- [30] E. Wagner-Rousset, S. Fekete, L. Morel-Chevillet, O. Colas, N. Corvaia, S. Cianféroni, D. Guillaume, A. Beck, Development of a fast workflow to screen the charge variants of therapeutic antibodies, *J. Chromatogr. A.* 1498 (2017) 147–154.
- [31] S. Fekete, D. Guillaume, Ultra-high-performance liquid chromatography for the characterization of therapeutic proteins, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 63 (2014) 76–84.
- [32] H. Xie, A. Chakraborty, J. Ahn, Y.Q. Yu, D.P. Dakshinamoorthy, M. Gilar, W. Chen, S.J. Skilton, J.R. Mazzeo, Rapid comparison of a candidate biosimilar to an innovator monoclonal antibody with advanced liquid chromatography and mass spectrometry technologies, *MAbs* 2 (2010) 379–394.
- [33] ICH Q2(R1), Validation of analytical procedures: text and methodology. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva (Switzerland), 2005.
- [34] FDA, Analytical procedures and method validation for drugs and biologics guidance for industry, US Food and Drug Administration, Maryland (USA), 2015.
- [35] USP 39, <1225> Validation of Compendial Procedures, United States Pharmacopeia, Maryland (USA), 2016.
- [36] L.M. Henricks, J.H.M. Schellens, A.D.R. Huitema, J.H. Beijnen, The use of combinations of monoclonal antibodies in clinical oncology, *Cancer Treat. Rev.* 41 (2015) 859–867.
- [37] ISO Guide 33:2015, Reference materials – Good practice in using reference materials. International Organization for Standardization, Genève (Switzerland), 2015.
- [38] Drug bank, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00112> (Accessed 5 march 2018).
- [39] K. Chen, D.S. Long, S.C. Lute, M.J. Levy, K.A. Brorson, D.A. Keire, Simple NMR methods for evaluating higher order structures of monoclonal antibody therapeutics with quinary structure, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 128 (2016) 398–407.
- [40] J.M. Yang, J. Ai, Y. Bao, Z. Yuan, Y. Qin, Y.W. Xie, D. Tao, D. Fu, Y. Peng, Investigation of the correlation between charge and glycosylation of IgG1 variants by liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 448 (2014) 82–91.
- [41] P. V. Bondarenko, T.P. Second, V. Zabrouskov, A.A. Makarov, Z. Zhang, Mass Measurement and Top-Down HPLC/MS Analysis of Intact Monoclonal Antibodies on a Hybrid Linear Quadrupole Ion Trap-Orbitrap Mass Spectrometer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20 (2009) 1415–1424.

2.3. Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir que se ha desarrollado un método para la separación, identificación y cuantificación de mezclas de mAb en mezclas terapéuticas. Los resultados de los parámetros estudiados de la validación muestran unos buenos valores de linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión, veracidad y robustez.

Se ha podido separar cromatográficamente mAb intactos. Esta separación se ha realizado gracias a la aplicación de la metodología de diseño de experimentos y a la alta especificidad de la columna monolítica de divinilbenceno usada. No ha sido posible la separación de los mAb rituximab y trastuzumab debido a la alta similitud que poseen en sus estructuras, las cuales le confieren una hidrofobicidad parecida.

Se ha puesto de manifiesto que el estudio de la robustez realizado con la aplicación de metodología de diseño de experimentos permite determinar en mayor detalle las variables que son influyentes en el sistema de estudio.

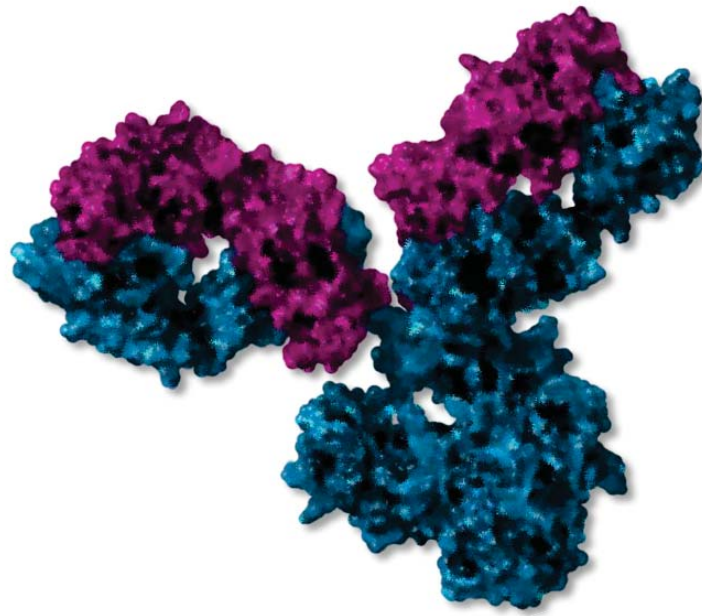
El nuevo desarrollo de la "función de heterocedasticidad" permite estimar el error cómo desviación estándar asociado a cualquier mAb estudiado y a cualquier concentración de estudio. Es un enfoque que permite simplificar el tratamiento de datos que conlleva el estudio de validación de un método. Este enfoque puede ser aplicado a la cuantificación en cualquier ámbito de la química analítica.

El método de espectrometría de masas desarrollado ha demostrado ser idóneo para la identificación de mAb intactos tanto en mezclas como individualmente, ya que se han podido determinar sus masas exactas y las de las isoformas asociadas a cada mAb con gran exactitud.

Se ha comprobado que el ácido fórmico es mejor agente ionizador en espectrometría de masas que el ácido trifluoroacético, ya que el número de isoformas que se detectan usando el primero de ellos es mayor que con el segundo. Sin embargo para la identificación de anticuerpos, estas diferencias no son lo suficientemente significativas en comparación con las ventajas que presenta el uso de ácido trifluoroacético en la detección en espectrometría UV.

Por último decir que este método supone un avance en el control de calidad de fármacos biotecnológicos ya que, ha solucionado un problema existente al poder

separar mAb intactos por cromatografía de fase inversa y poder ser cuantificados tanto individualmente como en mezclas.



CAPÍTULO 3

**Comparing different domains of analysis for
the characterisation of N-glycans on
monoclonal antibodies**

3.1. Introducción al capítulo 3

En este capítulo se exponen los resultados obtenidos en la comparación de diferentes dominios de análisis para la determinación del perfil de N-glicosilación de cuatro mAb terapéuticos. Para ello se hace uso de la cromatografía de líquidos de ultra altas prestaciones acopladas a un sistema de detección por emisión de fluorescencia y a un espectrómetro de masas de alta resolución.

En este capítulo se presenta un artículo científico en proceso de publicación, cuyas referencias son:

- ➔ S. Carillo, R. Pérez-Robles, C. Jakes, M. Rubeiro da Silva, S. Millan-Martín, A. Farrell, N. Navas, J. Bones, Comparing Different Domains of Analysis for the Characterisation of N-Glycans on Monoclonal Antibodies. Enviado a Journal of Pharmaceutical Analysis (Revision requerida).

La glicosilación es la modificación postrasduccional más importante que ocurre en la estructura de mAb. Esta modificación se produce durante la síntesis de los mAb en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi de células de mamífero, como son las células de cáncer de ovario chino (CHO) comúnmente empleadas para su producción biotecnológica. Los N-glicanos se anclan a residuos de asparragina situados en las cadenas pesadas de los mAb. La unión de diferentes glicanos a una misma estructura proteica produce heterogeneidad en un mAb. En la introducción de esta Tesis Doctoral se ha detallado el proceso de N-glicosilación de mAb.

El patrón de glicosilación influye en la estabilidad y en la función de los mAb. Los N-glicanos son mediadores de los procesos de citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) por lo que le confieren determinadas propiedades a los mAb. El control de este patrón en un mAb terapéutico es una operación crítica ya que influye significativamente en la efectividad como fármaco, pudiendo llegar a provocar efectos secundarios no deseados en los pacientes tratados. Reglamentariamente, la caracterización del perfil de N-glicosilación es obligatoria en control de calidad, en la comercialización de nuevos mAb terapéuticos y en la comercialización de nuevos biosimilares. Por este motivo es necesario el desarrollo de metodología que permita caracterizar el patrón de N-glicosilación de un mAb de forma robusta.

En este trabajo se ha realizado un estudio comparativo del perfil de N-glicosilación aplicando diferentes estrategias de análisis ('top-down', 'middle-down' y bottom up'). Se han empleado diez métodos diferentes de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución para caracterizar el perfil de N-glicanos en cuatro mAb terapéuticos: BEV, INF, RTX y TRA. Se han estudiado diferentes dominios de análisis: (i) intacto, usando condiciones desnaturalizantes y nativas; (ii) caderas pesadas y ligeras, bajo condiciones reducidas; (iii) región Fc intacta; (iv) cadenas simples de la región Fc; v) mapeo peptídico de la glicoproteína tras digestión enzimática con tripsina; y vi) N-glicanos liberados de la parte proteica, marcados con dos sustancias diferentes, ácido 2-aminobenzoico (2-AA) y 2-aminobenzamida (2-AB). Como referencia se toman los resultados obtenidos del análisis de los N-glicanos liberados de la estructura proteica y marcados con 2-AA o 2-AB. Los métodos se comparan entre sí en función de diferentes parámetros como son la calidad de información suministrada, el nivel de experiencia del analista, la instrumentación requerida para la preparación de muestra y el análisis de datos, la relevancia e idoneidad de los datos obtenidos para la caracterización estructural y la comparación lote a lote.

3.2. Recursos

En este apartado se describen todos los recursos usados para la realización del trabajo que se recoge en este capítulo.

3.2.1. Disolventes y reactivos

Los disolventes son de pureza LC-MS. En la Tabla 3.1 se reúnen todos los disolventes y reactivos empleados.

Tabla 3.1. Disolventes y reactivos usados.

Disolventes y reactivos	Casa comercial
Acido fórmico en agua (0.1% (v/v))	Fisher Scientific (Dublín, Irlanda)
Acido fórmico en acetonitrilo (0.1% (v/v))	Fisher Scientific (Dublín, Irlanda)
TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina)	Pierce (Massachusetts, Estados Unidos)
Guanidina-HCL	Pierce (Massachusetts, Estados Unidos)
Enzima ideS ('immunoglobulin-degrading enzyme of <i>Streptococcus pyogenes</i> ') (<i>FabRICATOR™</i>)	Genovis (Massachusetts, Estados Unidos)
Enzima kgp ('Lys-gingipain') (<i>GingisKHAN™</i>)	Genovis (Massachusetts, Estados Unidos)
SMART Digest™ kit	Thermo Scientific (Dublín, Irlanda)
PNGase F (CarboClip®)	Asparia Glycomics, (Gipuzkoa, España)
DTT (ditioteitol)	Sigma Aldrich (Wicklow, Irlanda)
iodoacetamida	Sigma Aldrich (Wicklow, Irlanda)
Ácido trifluoroacético	Sigma Aldrich (Wicklow, Irlanda)
Formiato amonico	Sigma Aldrich (Wicklow, Irlanda)
Acetonitrilo	Sigma Aldrich (Wicklow, Irlanda)
2AA (ácido 2-aminobenzoico)	Sigma Aldrich (Wicklow, Irlanda)
2AB (2-aminobenzamida)	Sigma Aldrich (Wicklow, Irlanda)
Acetato amónico	Sigma Aldrich (Wicklow, Irlanda)

3.2.2. Muestras

Todas las muestras de medicamentos utilizadas en este trabajo han sido cedidas por el Servicio de Farmacia Hospitalaria perteneciente al Hospital Universitario San Cecilio (Granada, España).

En este trabajo se han usado las siguientes muestras:

- BEV en su medicamento original Avastin®. La concentración del fármaco es de 25 mg/ml.
- INF en su medicamento original Remicade®. Tras su reconstitución, la concentración de fármaco es de 10 mg/ml.

- RTX en su medicamento original Mabthera®. La concentración del fármaco es de 10 mg/ml.
- TRA en su medicamento original Herceptin®. Tras su reconstitución, la concentración de fármaco es de 21 mg/ml.

Toda la información relativa a los medicamentos anteriormente mencionados se encuentra descrita en el apartado 4 de la Introducción de esta Tesis Doctoral.

3.2.3. Instrumentación analítica

Se ha usado una plataforma analítica formada por un cromatógrafo de líquidos de ultra altas prestaciones Vanquish™ Flex Quaternary UHPLC acoplado a un detector de espectrofotometría de fluorescencia molecular Vanquish™ y a un espectrómetro de masas Q Exactive™ Plus Hybrid Orbitrap MS equipado con el paquete BioPharma (Thermo Scientific, Germering, Alemania). La ionización se lleva a cabo con una fuente de ionización HESI-II (Thermo Scientific, Germering, Alemania).

Se han usado 5 columnas cromatográficas diferentes: i) MAbPac™ RP column, 4 µm, 2.1 × 50 mm, para el análisis intacto en condiciones desnaturalizantes y el análisis en condiciones reductoras; ii) MAbPac™ SEC-1 column, 5 µm, 300 Å, 4.0 × 300 mm, para el análisis intacto en condiciones nativas; iii) MAbPac RP column, 4 µm, 2.1 × 100 mm, para el análisis de fragmentos ('middle analysis'); iv) Acclaim Vanquish C18, 2.2 µm, 2.1 × 250 mm, para el análisis de péptidos ('peptide mapping'); y v) Accucore 150-Amide-HILIC 2.1 × 150 mm, para el análisis de los N-glicanos.

Todas las columnas son de la casa comercial Thermo Scientific, (Germering, Alemania).

3.2.4. Tratamiento de datos

Para la identificación de los N-glicanos liberados se ha usado la plataforma GlycoWork Bench (EUROCarbDB initiative, Londres).

La integración de la señal analítica procedente del análisis de glicanos liberados ha sido realizada usando el programa Xcalibur QualBrowser 4.0 (Thermo Scientific, Germering, Alemania).

Capítulo 3

Para el tratamiento de datos procedente de espectrometría de masas se ha usado el software BiopharmaFinder 3.0. (Thermo Scientific, Germering, Germany). Con este software se han procesado, identificado y cuantificado todas las glicofomas procedentes de cada uno de los mAb.

ARTÍCULO CIENTÍFICO

**Comparing Different Domains of Analysis for the
Characterisation of N-Glycans on Monoclonal Antibodies**

Sara Carillo^{1‡}, Raquel Pérez-Robles^{2‡}, Craig Jakes¹, Meire Ribeiro da Silva¹,
Silvia Millán Martín¹, Amy Farrell¹, Natalia Navas², Jonathan Bones^{1,3*}

¹Characterisation and Comparability Laboratory, NIBRT – The National Institute for
Bioprocessing Research and Training, Foster Avenue, Mount Merrion, Blackrock, Co.
Dublin, A94 X099, Ireland

²Department of Analytical Chemistry, Biohealth Research Institute (ibs.GRANADA),
University of Granada, Granada, Spain

³School of Chemical and Bioprocess Engineering, University College Dublin, Belfield,
Dublin 4, D04 V1W8, Ireland

‡These authors contributed equally to this work

Journal of Pharmaceutical Analysis

Accepted: 28 /11/ 2019

Manuscript Details

Manuscript number	JPA_2019_633
Title	Comparing Different Domains of Analysis for the Characterisation of N-Glycans on Monoclonal Antibodies
Short title	Comparing Methods for Glycan Characterisation
Article type	Research Paper

Abstract

With the size of the biopharmaceutical market exponentially increasing, there is an aligned growth in the importance of data-rich analyses, not only to assess drug product safety but also to assist drug development driven by the deeper understanding of structure/function relationships. In monoclonal antibodies, many functions are regulated by N-glycans present in the constant region of the heavy chains and their mechanism of action are not completely known. The importance of their function focuses efforts of analytical research on the development of robust, accurate and fast methods to support drug development and quality control. Released N-glycan analysis is considered the gold standard for glycosylation characterization; however, it is not the only method for quantitative analysis of glycoform heterogeneity. In this study, ten different analytical workflows for N-glycan analysis were compared on four therapeutic monoclonal antibodies. While observing good comparability between the quantitative results generated, it was possible to appreciate the advantages and disadvantages of each technique and to summarize all the observations to guide the choice of the most appropriate analytical workflow according to application and the desired depth of data generated.

Keywords

N-glycans, biopharmaceuticals, monoclonal antibodies, intact mass analysis, mass spectrometry, native mass spectrometry, glycan analysis, peptide mapping, glycopeptide analysis.

Introduction

Therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) are a major class of biopharmaceuticals that have been used as autoimmune and oncology therapeutics [1]. Over the last decade, three to five new mAb products have been approved annually in Europe and/or the US [2]. The market for mAbs is expected to continue to grow over the coming years with over 300 mAb candidates currently in development [2, 3]. Chinese hamster ovary (CHO) cells are the most commonly used expression system for mAbs, as they have the ability to produce human-like post-translational modifications, thereby reducing the potential for adverse reactions in humans [4]. Moreover, the use of CHO cell lines for over 30 years has established a history of product safety, efficacy and improvements in cell engineering, leading to high product titre and the capacity to adapt their growth in adhesion and suspension cell cultures [5]. Glycosylation, the most prominent post-translational modification (PTM), occurs in endoplasmic reticulum and Golgi apparatus [4]. Glycans can be attached to either the mAb heavy chain constant region (N-glycans) or to serine or threonine (O-glycans) with the former being the most prominent [5]. N-glycans are classified into three main groups, *i.e.* oligomannose glycans, complex glycans and hybrid glycans. The N-glycans on mAbs produced in CHO cells are mainly asialylated core fucosylated complex glycans [6].

Glycosylation significantly impacts the stability and function of mAbs, including mediation of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and complement dependent cytotoxicity (CDC) [7]. N-glycosylation stabilizes the structure of a mAb, therefore deglycosylation renders mAbs thermally less stable, more susceptible to unfolding [8] and prone to aggregation [9]. Afucosylation of mAb N-glycans can result in increased binding affinity of mAbs to receptors present on the surface of leukocyte effector cells, which can enhance ADCC [10, 11]. Several studies have suggested that terminal sialic acid residues on glycans mediates anti-inflammatory responses, reduce ADCC in vivo [12] and inhibits allergic reaction [13]. Galactosylation does not affect ADCC, however the presence of galactose residues on N-glycans may lead to an increase in CDC [14, 15] or anti-inflammatory activity [16]. High-mannose N-glycans have been shown to correlate with accelerated clearance of mAbs from the blood, decreasing circulating half-life of the drugs [17-19]. Therefore, control of the glycosylation pattern is required to ensure adherence to lot release specifications [20].

Characterisation of the glycosylation present on mAbs is a regulatory requirement not only for lot release but also for new drugs applications and biosimilar approval [21], as reported in International Council for Harmonization (ICH) guideline Q6B. European Medicines

Agency guidelines suggest that particular attention should be paid to their degree of mannosylation, galactosylation, fucosylation and sialylation and that distribution of the main glycan structures should be determined [4]. Different strategies can be applied to analyse the N-glycan moieties [22] with the gold standard workflow involving enzymatic release of oligosaccharides from the protein and chemical derivatisation with a label used for the detection technique of choice [23]. The most common separation techniques to analyse released N-glycans are capillary electrophoresis and liquid chromatography (LC) coupled to fluorescent detection and/or high resolution mass spectrometry (HR-MS). N-glycans can also be analysed as glycopeptides after mAb proteolysis (e.g. tryptic digest), glycopeptide enrichment and LC-MS/MS analysis, obtaining in-depth data on the glycoforms present on the protein as well as site-specific information. These two approaches require high levels of expertise and training for both sample preparation and LC-MS data acquisition and analysis, to ensure method robustness. Due to the recent advances in LC-MS technologies and the improvements in high resolution mass spectrometry of proteins, other analytical routes for determining N-glycan profiles are now available. These include characterisation of the glycoforms at intact protein level, using denaturing or native conditions, sometimes supported by top-down data, as well as the analysis of mAbs subunits via LC-MS [4, 24-27]. Intact mass analysis and top down approaches facilitate the analysis of glycosylation with minimal sample preparation and represent rapid methods for the determination of glycoforms profiles. However, if a more detailed analysis is required, it is necessary to produce a complementary glycan map because the intact protein glycan profile may not enable the detection of low abundant glycans [4]. Middle-up analysis is applied to mAbs after digestion with a proteolytic enzyme such as IdeS protease and allows the study of individual domains yielding region specific N-glycan profiles [28, 29]. Intact and subunit analysis for the determination of N-glycan relies on HR-MS analysis that is essential to distinguish near-isobaric species generated by the intrinsic heterogeneity present on the monoclonal antibodies. This heterogeneity arises not only at the N-glycan level but is also due to the presence of other PTMs, such as methionine and tryptophan oxidation, asparagine and glutamine conversion to succinimide intermediates, deamidation or C-terminal lysine truncation.

Here, we performed an extensive Fc-glycosylation analysis comparison using ten different methods to quantitatively characterize the N-glycan profiles from biotherapeutics, i.e. bevacizumab (BEV), infliximab (INF), rituximab (RIT) and trastuzumab (TRA). The four mAbs were studied across different domains of analysis: intact mass analysis using

denatured and native conditions, reduced mAb (heavy/light chain analysis), intact Fc region (gingipain digestion), single chain Fc analysis (IdeS digested subunits), tryptic digestion based peptide mapping and released N-glycan analysis. Due to its wide acceptance, hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) of N-glycans after labelling with anthranilic acid (2-AA) or 2-aminobenzamide (2-AB) was used as a reference method. The ten methods were compared in terms of depth of information achieved, level of expertise and instrumentation required for sample preparation and data analysis, relevance of the data obtained as well as suitability for structural characterization or batch-to-batch comparison to assist with the choice of the most suitable technique for N-glycan analysis.

Materials and methods

Chemicals and Reagents

Rituximab, bevacizumab, infliximab and trastuzumab drug products were kindly provided by the Hospital Pharmacy Unit of the University Hospital of San Cecilio in Granada, Spain. LC-MS grade solvents (0.1% (v/v) formic acid in water, 0.1% (v/v) formic acid in acetonitrile, formic acid, acetonitrile, water) were sourced from Fisher Scientific. TCEP and guanidine-HCl were obtained from Pierce. IdeS (immunoglobulin-degrading enzyme of *Streptococcus pyogenes*) (*FabRICATOR™*), kgp (Lys-gingipain) (*GingisKHAN™*) were purchased from Genovis. SMART Digest™ kit, magnetic resin option was obtained from Thermo Scientific and PNGase F (CarboClip®) was obtained from Asparia Glycomics, (Gipuzkoa, Spain). All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Arklow, Ireland).

Analytical Instrumentation

All LC-MS analysis was performed using a Vanquish™ Flex Quaternary UHPLC (Thermo Scientific, Germering, Germany) and a Q Exactive™ Plus Hybrid Orbitrap MS instrument with BioPharma Option equipped with an Ion Max source with a HESI-II probe (Thermo Scientific, Bremen, Germany). All data were acquired using Thermo Scientific™ Xcalibur™ software 4.0.

Intact mass analysis under native conditions

For mAb analysis using native intact MS, 10 µg of mAb sample was injected on to a MAbPac™ SEC-1 column, 5 µm, 300 Å, 4.0 mm × 300 mm (Thermo Scientific™, Cat# 074696) under isocratic conditions of 50 mM ammonium acetate buffer at 300 µL.min⁻¹ for 20 min. The column temperature was at 30°C. The MS method consisted of full positive polarity MS scans only at 17,500 resolution setting (defined at *m/z* 200) with the mass range set to 2500 – 8000 *m/z* and automatic gain control (AGC) target value of 3.0×10^6 with a maximum injection time of 200 ms and 10 microscans. In-source collision induced dissociation (CID) was set to 150 eV. Runs were performed in HMR mode. MS instrumental tune parameters were set as follows: spray voltage was 3.6 kV, sheath gas flow rate was 20 arbitrary units (AU), auxiliary gas flow rate was 5 AU, capillary temperature was 275°C, probe heater temperature was 275°C and S-lens RF voltage set to 200.

Intact mass analysis under denaturing conditions

For mAb analysis under denaturing conditions, 10 µg of each mAb was injected onto a MAbPac™ RP column, 4 µm, 2.1 mm × 50 mm (Thermo Scientific, Cat# 088648). The analysis was performed using a binary gradient of 0.1% (v/v) formic acid in water (A) and 0.1% (v/v) formic acid in acetonitrile (B). Gradient conditions were as follows: 25% B increased to 45% B in 2.5 min with a further increase to 80% B in 0.5 min with a one min isocratic hold. Initial conditions were restored in 0.2 min and held for an additional 3.8 min to ensure column re-equilibration. The column temperature was maintained at 70°C throughout and flow rate was sustained at 300 µL.min⁻¹. The MS method consisted of full positive polarity MS scans only at 17,500 resolution setting (defined at *m/z* 200) with the mass range set to 1500 – 4500 *m/z* and AGC target value of 3.0×10^6 with a maximum injection time of 100 ms and 10 microscans. In-source CID was set to 100 eV. Analysis was performed using protein mode. MS instrumental tune parameters were set as follows: spray voltage was 3.8 kV, sheath gas flow rate was 35 AU, auxiliary gas flow rate was 10 AU, capillary temperature was 275°C, probe heater temperature was 175°C and S-lens RF voltage set to 80.

Analysis of reduced mAb

MAbs were treated with 50 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine) (TCEP) in 4 M guanidine-HCl, for 45 min at room temperature then diluted to 100 ng,μL⁻¹ in water. 2 μL of mAb was injected onto a MAbPac RP column, 4 μm, 2.1 mm × 50 mm (Thermo Scientific, Cat# 088648) and analysis was performed using a binary gradient of 0.1% (v/v) formic acid in water (A) and 0.1% (v/v) formic acid in acetonitrile (B). Gradient conditions were as follows: 28% B initially for one min, increased to 40% B in 15 mins with a further increase to 80% B in one min and a final one min isocratic hold. Initial conditions were restored in 0.5 mins and held for an additional 9.8 mins to ensure column re-equilibration. The column temperature was maintained at 80°C throughout and flow rate was sustained at 300 μL/min.

The MS method consisted of full positive polarity MS scans only at 17,500 resolution setting for heavy chain analysis and 140,000 for light chain analysis (defined at m/z 200) with the mass range set to 600 – 2400 m/z and AGC target value of 3.0×10^6 with a maximum injection time of 200 ms and 10 microscans. In-source CID was set to 0 eV. Analysis was performed using protein mode. MS instrumental tune parameters were set as follows: spray voltage was 3.8 kV, sheath gas flow rate was 25 AU, auxiliary gas flow rate was 10 AU, capillary temperature was 320°C, probe heater temperature was 150°C and S-lens RF voltage set to 60.

Middle up analysis of mAbs

For each mAb, two populations of mAb sub-units were analysed, one prepared following treatment with IdeS and another with kgp.

For IdeS digestion, 40 μg of each mAb were combined with 0.5 μL of the enzymatic digestion solution (67 units/μL in Optima grade water) and incubated at 37°C for 2 h at 500 rpm. Reduction of disulphide bonds was achieved by incubation in 4 M guanidine hydrochloride and 50 mM TCEP for 45 mins at 56°C. Following incubation, samples were reduced to dryness via vacuum centrifugation and reconstituted in 0.1 % formic acid (1 μg,μL⁻¹) prior of LC-MS analysis. For kgp digestion, 50 μg of each mAb were treated as recommended by the vendor and incubated for 2 h at 37°C.

LC-MS analysis of mAb sub-units was performed on a MAbPac RP column, 4 μm, 2.1mm × 100 mm (Thermo Scientific, Cat# 088648). The mobile phases were 0.1% formic acid in water (90/10, v/v, mobile phase A) and 0.1% formic acid in ACN/water (90/10, v/v, mobile

phase B). The LC gradient profile was as follows 25% B for 1 min, then increased to 45% B in 15 mins; % B was kept constant for 1 min then a wash step at 80% B was performed for 2 mins before restoring initial conditions and perform column re-equilibration for 6 mins. Total runtime was 25 min. The column temperature was maintained at 80°C throughout and flow rate was sustained at 300 µL/min. For the kgp digest, the same column was employed, using 0.1% formic acid in water (A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (B) as mobile phases. For Fc and Fab regions separation, the gradient was 20% B for 2 mins, then increasing to 45% B in 14 mins and a further increase at 80% B in 1 min, hold for an additional min and starting conditions restored in 0.5 min and held for 6.5 mins. The MS method for both analyses consisted of full positive polarity MS scans only at 140,000 or 35,000 resolution setting (defined at m/z 200), for IdeS and kgp digest respectively, with the mass range set to 600 – 2400 m/z and AGC target value of 3.0×10^6 with a maximum injection time of 200 ms and 5 microscans. In-source CID was set to 0 eV. Runs were performed in protein mode. MS instrumental tune parameters were set as follows: spray voltage was 3.8 kV, sheath gas flow rate was 25 AU, auxiliary gas flow rate was 10 AU, capillary temperature was 320°C, probe heater temperature was 150°C and S-lens RF voltage set to 60.

Peptide Mapping

Samples were diluted to 2 mg/mL in water. For each sample digest, sample and SMART Digest buffer were added to each lane of a KingFisher Deepwell 96-well plate as outlined in Table S1. Trypsin Bead “wash buffer” was prepared by diluting SMART Digest buffer 1:4 (v/v) in water. Bead buffer was neat SMART Digest buffer. Digestion was performed using Kingfisher Duo Prime Purification System with BindIt™ software (version 4.0). Samples were incubated for 45 min at 70°C on medium mixing speed (to prevent sedimentation of beads), with post digestion cooling to 10°C. Following digestion, disulphide bond reduction was performed with 10 mM DTT for 30 min at 37°C and subsequent alkylation with 20 mM IA (iodoacetamide) in darkness for 30 mins. The reaction was quenched with 15 µl of 100 mM DTT followed by 15 µl 10% TFA (final concentration 11 mM DTT and 1% TFA). The tryptic peptides were separated and monitored by LC-MS/MS analysis using a Acclaim Vanquish C18, 2.2 µm, 2.1mm × 250 mm (Thermo Scientific, Cat#074812-V).

Analysis was performed using a binary gradient of 0.1% (v/v) formic acid in water (A) and 0.1% (v/v) formic acid in acetonitrile (B). Gradient conditions were as follows: 2% B increased to 40% B in 45 mins with a further increase to 80% B in one min with four min isocratic hold. Initial conditions were restored in 0.5 mins and held for an additional 15 min to ensure column re-equilibration. The column temperature was maintained at 25°C throughout and flow rate was sustained at 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. The MS method consisted of full positive polarity MS scans at 70,000 resolution setting (at m/z 200) with the mass range set to 200 – 2000 m/z and AGC target value of 3.0×10^5 with a maximum injection time of 100 ms and one microscan. In-source CID was set to 0 eV. MS2 settings were as follows: a resolution setting of 17,500 (at m/z 200), AGC target value of 1.0×10^5 , isolation window set to 2.0 m/z , signal intensity threshold of 1.0×10^4 , normalized collision energy set to 28, top 5 precursors selected for fragmentation and dynamic exclusion set to 7 s.

MS instrumental tune parameters were set as follows: spray voltage was 3.8 kV, sheath gas flow rate was 25 AU, auxiliary gas flow rate was 10 AU, capillary temperature was 320°C, probe heater temperature was 150 °C and S-lens RF voltage set to 60 kV.

Glycopeptides identification and quantitation was performed using BioPharma Finder 3.0 software using Full MS and MS/MS data, mass deviation of 5 ppm and minimum confidence of 95 %.

N-glycan release and labelling

N-glycans from 200 μg of each mAb were released and labelled as reported previously [22] All the samples were reconstituted in the starting gradient conditions and analysed on an Accucore 150-Amide-HILIC 2.1mm \times 150 mm (Thermo Scientific) column using both fluorescence and MS detection.

Analysis was performed using a binary gradient of 50 mM ammonium formate, pH 4.4 (A) and acetonitrile (B). Gradient conditions were as follows: 72% B decreased to 45% B in 40 mins with a further decrease to 40% B in 2.5 min with 0.5 min isocratic hold. Initial conditions were restored in 0.1 min and held for an additional 1.9 min to ensure column re-equilibration. The column temperature was maintained at 50°C throughout and flow rate was sustained at 400 $\mu\text{L}/\text{min}$. Fluorescence detection was acquired using the following settings: $\lambda_{\text{ex/em}} = 330/420$ nm for 2-AB and $\lambda_{\text{ex/em}} = 350/425$ nm for 2-AA. The MS method consisted of full MS scans in negative polarity mode at 70,000 resolution setting

(defined at m/z 200) with the mass range set to 380 – 2000 m/z and AGC target value of 3.0×10^6 with a maximum injection time of 50 ms and one microscan. In-source CID was set to 20.0 eV. MS instrumental tune parameters were set as follows: spray voltage was 3.5 kV, sheath gas flow rate was 50 AU, auxiliary gas flow rate was 13 AU, capillary temperature was 320 °C, probe heater temperature was 400 °C and S-lens RF voltage set to 50 kV.

Data Processing

Released N-glycan analysis was performed using Xcalibur QualBrowser 4.0 for signal integration and availing of GlycoWork Bench for correct glycoform identification. All other data processing, quantitation and identification were performed on BioPharma Finder 3.0 software (Thermo Scientific) using the parameters summarized in Table S2 and S3.

Results and Discussion

Intact mass analysis

Intact mass analysis was performed on the four mAbs using both denaturing and native conditions. Excellent MS data quality allowed achievement of mass accuracies ≤ 10 ppm for the majority of mAb proteoforms. In particular, proteoforms containing C-term lysine truncation, N-terminal pyro-Glu formation and Fc N-glycosylation were considered. The N-glycan profiles resulting for the four mAbs are represented in Figure 1 and Table 1.

Both intact mass analysis using native or denaturing conditions show comparable N-glycan quantitative results (Figure 1A, S1-S4, Table S6) and allow minimum sample preparation, rapid analysis and data processing. Nevertheless, some minor differences could be observed between the two techniques as some low abundant species ($<3\%$) can be identified only using native conditions; due to the greater spatial spectral resolution obtained with native MS. In particular, sialylated species were only detected when using native conditions, while they were not revealed in any other analysis at the intact or subunit level. However, the shift of the charge envelope to higher mass ranges generates spectra in a region of reduced resolution causing a small decrease in the average mass accuracy (7.9 ppm in denatured vs. 11.9 ppm in native mode) [31]. Since intact mass analysis returns the mass of the N-glycoforms present on both heavy chains it is possible that this analysis will return an underestimated or overestimated value for some N-glycans. As an example, it is not possible

Capítulo 3

to distinguish between proteoforms presenting A2G1F N-glycans on both chains or presenting one A2G0F and one A2G2F.

Table 1: Experimental mass for the intact mAbs in native and denatured conditions. The relative abundances of proteoforms are also reported. Experimental mass, mass accuracy and relative abundance were calculated as average of triplicate analysis. Theoretical masses were calculated considering 2 C-term lysine clipping and 16 disulphide bonds unless stated otherwise.

mAbs	Analysis	Modifications/Glycoforms associated	Experimental mass (Da)	Theoretical average mass (Da)	Mass difference (ppm)	Relative abundance (%)
BEV	Denatured conditions	A2G0F/unglycosylated	147752.6	147751.9	4.7	2.5
		A2G0F/A1G0F	148995.5	148994.0	10.1	8.2
		A2G0F/A2G0F	149198.0	149197.6	2.7	64.0
		A2G0F/A2G1F	149359.9	149359.7	1.3	19.5
		A2G0F/A2G2F or A2G1F/A2G1F	149521.6	149521.8	1.3	5.5
BEV	Native conditions	A2G0F/unglycosylated	147751.8	147751.9	0.7	4.3
		A2G0F/A1G0F	148991.1	148994.0	19.5	2.9
		A2G0F/A2G0F	149195.6	149197.6	13.4	70.8
		A2G0F/A2G1F	149361.7	149359.7	13.4	17.2
		A2G0F/A2G2F or A2G1F/A2G1F	149524.5	149521.8	18.1	4.3
TRA	Denatured conditions	A2G1F/A2G2F	149685.7	149684.0	11.4	0.5
		A1G0F/A2G0F	147852.5	147853.4	6.3	4.0
		A2G0/A2G0F	147911.7	147910.4	8.7	3.4
		A2G0F/A2G0F	148058.6	148056.6	13.6	27.9
		A2G0F/A2G1F	148219.2	148218.7	3.4	33.7
TRA	Native conditions	A2G0F/A2G2F or A2G1F/A2G1F	148380.1	148380.8	5.0	22.5
		A2G1F/A2G2F	148541.9	148543.0	7.3	8.6
		A2G0F/unglycosylated	146611.6	146610.9	4.7	0.8
		A2G0/A2G0F	147910.7	147910.4	1.7	3.4
		A2G0F/A2G0F	148058.1	148056.6	10.1	31.8
INF	Denatured conditions	A2G0F/A2G1F	148220.5	148218.7	11.9	32.3
		A2G0F/A2G2F or A2G1F/A2G1F	148382.3	148380.8	9.8	22.1
		A2G1F/A2G2F	148544.8	148543.0	12.0	8.0
		A2G2F/A2G2F	148704.4	148705.1	4.7	1.5
		1x C-term K, M5/M5	148185.6	148184.2	9.4	1.4
		2x C-term K, M5/M5	148313.1	148312.4	4.5	5.6
		A2G0F/A2G0F	148514.4	148512.6	12.4	21.6
		1x C-term K, A2G0F/A2G0F	148643.4	148640.7	17.8	12.0
INF	Denatured conditions	A2G0F/A2G1F	148677.7	148674.7	20.2	5.7
		2x C-term K, A2G0F/A2G0F	148770.4	148768.9	10.2	27.7
		2x C-term K, A2G0F/A2G1F	148932.4	148931.1	8.8	17.8
		2x C-term K, A2G0F/A2G2F or A2G1F/A2G1F	149094.6	149093.2	9.3	6.6
INF	Denatured conditions	2x C-term K, A2G1F/A2G2F	149255.9	149255.3	3.5	1.6

Capítulo 3

Table 1. Continuation

mAbs	Analysis	Modifications/Glycoforms associated	Experimental mass (Da)	Theoretical average mass (Da)	Mass difference (ppm)	Relative abundance (%)
INF	Native conditions	M5/M5	148058.3	148056.1	15.3	1.2
		2x C-term K, M5/M5	148314.1	148312.4	11.6	3.9
		A2G0/A2G0F	148367.4	148366.4	6.4	0.6
		A2G0F/A2G0F	148512.9	148512.6	2.0	19.1
		1x C-term K, A2G0F/A2G0F	148643.0	148640.7	15.4	10.0
		A2G0F/A2G1F	148678.0	148674.7	22.2	10.5
		2x C-term K, A2G0F/A2G0F	148770.0	148768.9	7.4	27.4
		2x C-term K, A2G0F/A2G1F	148932.0	148931.1	6.7	19.3
		2x C-term K, A2G0F/A2G2F or A2G1F/A2G1F	149094.1	149093.2	6.0	8.0
R1T	Denatured conditions	A1G0F/A2G0F	146873.1	146872.1	6.6	2.7
		A2G0F/A2G0F	147077.8	147075.3	17.0	24.3
		A2G0F/A2G1F	147238.2	147237.5	4.5	36.0
		A2G0F/A2G2F or A2G1F/A2G1F	147400.9	147399.6	8.4	24.4
		A2G1F/A2G2F	147562.3	147561.8	3.5	9.6
		A2G2F/A2G2F	147724.2	147723.9	2.1	1.0
R1T	Native conditions	A2G0/A2G0F	146927.4	146929.2	12.5	0.3
		A2G0F/A2G0F	147078.4	147075.3	20.8	24.9
		A2G0F/A2G1F	147240.1	147237.5	17.5	36.7
		A2G0F/A2G2F or A2G1F/A2G1F	147403.0	147399.6	22.8	25.4
		A2G1F/A2G2F	147563.8	147561.8	14.0	9.8
		A2G2F/A2G2F	147722.5	147723.9	9.7	2.6
		A2G2F/A2S1G1F	148019.1	148015.2	26.8	0.2
		A2G2F/A2S2F	148308.2	148306.4	11.9	0.1

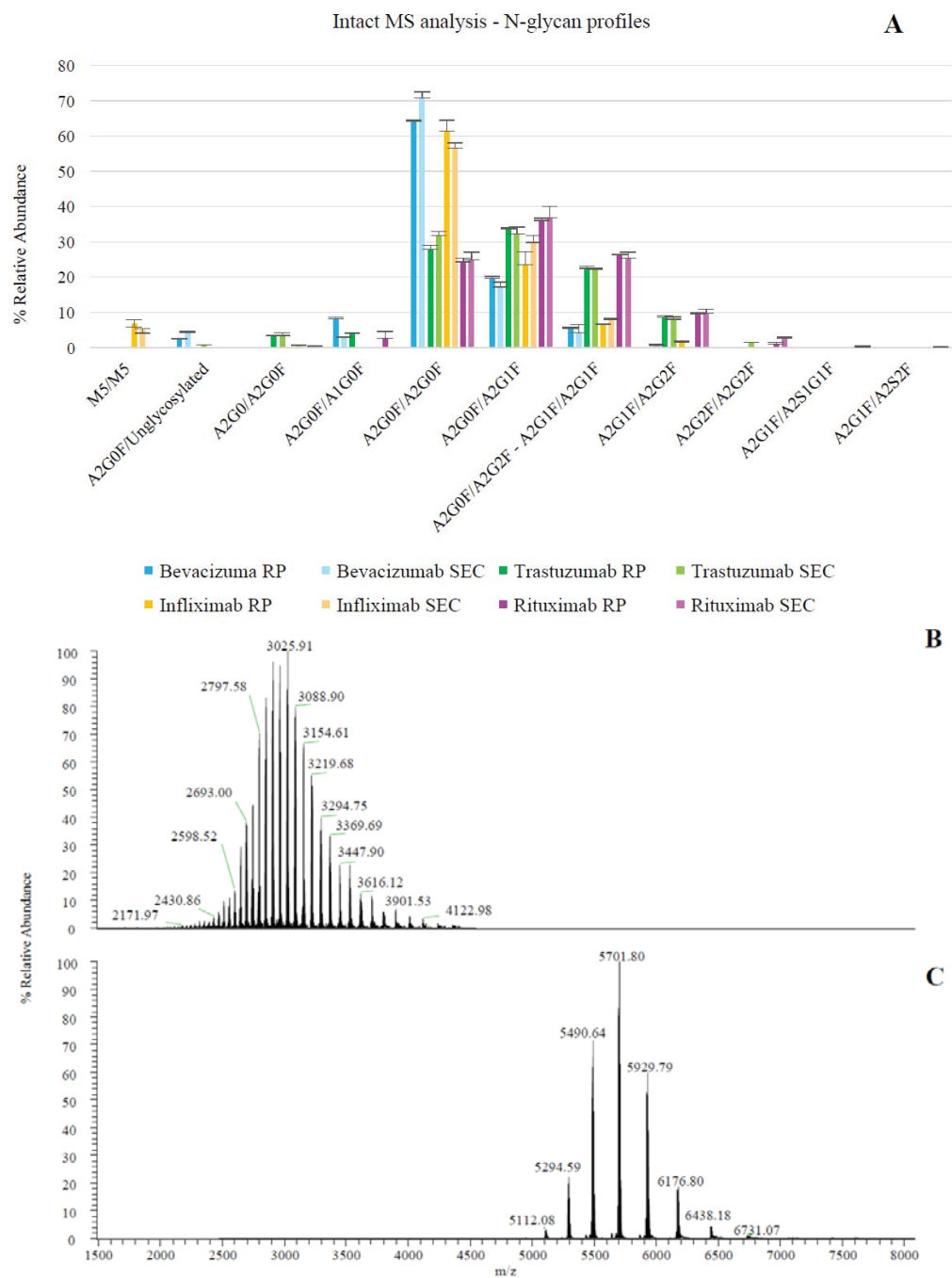


Figure 1. (A) N-glycan profiles of bevacizumab (blue), trastuzumab (green), infliximab (orange) and rituximab (pink) drug products analysed via intact mass analysis in denaturing 438 (dark colour shade) and native (light colour shade) conditions. Relative abundances were calculated on the basis of MS signal intensities obtained after raw data deconvolution and 440 averaged on triplicate analysis. Comparison of intact protein mass spectrometry in denaturing 441 (B) and native (C) conditions.

Table 2: Proteoforms obtained after heavy chain analysis on the four monoclonal antibodies analysed. Average experimental masses on triplicate analysis were reported together with theoretical average masses and average mass accuracies for each proteoform. Relative abundances were calculated based on the MS signal intensities in the triplicate analysis. Masses are calculated accounting for C-term lysine clipping unless stated otherwise.

mAbs	Modifications/ Glycoforms	Experimental mass	Theoretical average mass	Mass difference (ppm)	Rela. Abund. (%)
BEV	Unglycosylated	49718.8	49718.7	1.3	1.5
	A1G0F	50961.2	50960.8	6.7	2.1
	A2G0	51017.5	51017.9	7.1	0.4
	A2G0F	51163.8	51164.0	5.0	82.0
	A2G1	51180.0	51180.0	1.3	1.4
	A2G1F	51325.9	51326.2	4.8	12.0
	A2G2F	51488.3	51488.3	1.3	0.4
	A2S1G1F	51746.2	51745.6	12.1	0.2
TRA	M5	50372.6	50373.2	12.5	0.7
	A1G0F	50398.3	50398.3	1.3	0.6
	A2G0	50455.0	50455.3	6.8	3.9
	A2G0F	50601.2	50601.5	6.1	51.0
	A2G1	50617.4	50617.5	1.6	0.6
	A2G1F	50763.3	50763.6	6.5	38.1
	A2G2F	50925.3	50925.8	8.2	5.1
INF	M5	50605.5	50605.4	3.4	1.2
	1x C-term lysine, M5	50734.1	50733.5	10.1	2.1
	A1G0F	50758.2	50758.6	7.4	1.3
	A2G0	50815.3	50815.7	7.2	1.1
	A2G0F	50833.5	50833.6	1.8	17.8
	1x C-term lysine, A2G0F	50962.0	50961.8	4.5	48.2
	A2G1F	50995.3	50995.8	8.6	11.3
	1x C-term lysine, A2G1F	51123.3	51123.9	12.3	16.2
A2G2F	51158.4	51157.9	9.4	0.8	
RIT	Gln-->Pyro-Glu, A2G0F	50513.9	50514.3	8.1	46.2
	Gln-->Pyro-Glu, A2G1F	50676.1	50676.4	7.0	46.4
	Gln-->Pyro-Glu, A2G2F	50838.1	50838.6	9.9	7.4

Reduced mAb/Heavy chain analysis

Intact analysis of reduced mAb allows monitoring N-glycan abundance without the complexity caused by the presence of glycans on the two chains. Analysed mAbs were reduced with TCEP in HCl-Guanidine 8M and injected for LC-MS analysis after a relatively quick and easy sample preparation. The MS acquisition is performed with different settings for heavy chain and light chain due to the differences in molecular masses and the requirement for different instrument settings [32]. Heavy chain spectra showed a reduced

complexity that enabled identification of a greater number of features including lower abundant glycoforms with respect to the intact mass analysis level (Table 2, S7) as well as an improved overall mass accuracy (average $\Delta = 6.4$ ppm) determination due to the lower mass of the fragment analysed.

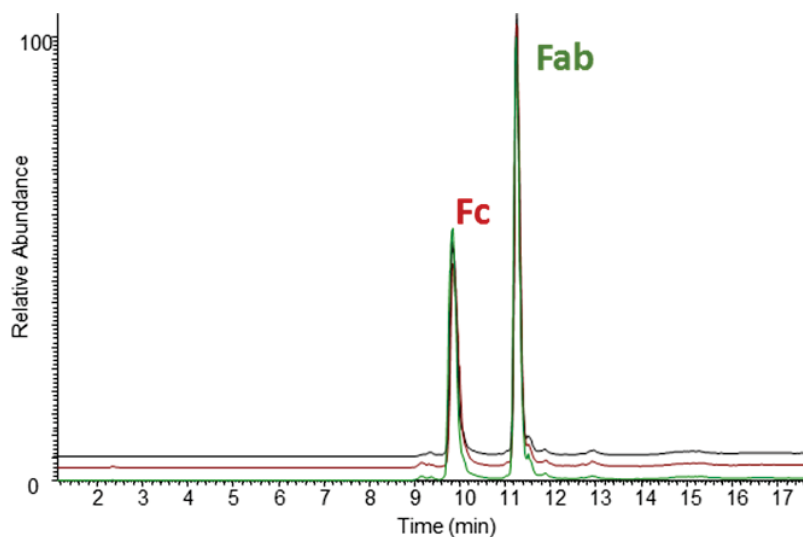


Figure 2. Base Peak Chromatograms (BPCs) of the RP-MS analysis performed in triplicate on Fc region from trastuzumab drug product after digestion with gingipain.

Fc region

The four mAbs presented in this study were digested with gingipain enzyme, which allows the hydrolysis of the heavy chain above the hinge region. As a consequence, disulphide bonds remaining in place in the hinge region preserve both scFc (single chain Fc), reducing the complexity of the associated mass spectra while keeping intact the information present at the same time on both chains (Figure 2, S5). MS data were acquired with higher resolution settings than intact mass spectra allowing the confident identification of a larger number of Fc variants (Table 3, S8), especially for more complex drug products such as infliximab, which presents, on top of the almost equally distributed C-term lysine variants, an higher variety of the N-glycans present at the glycosylation sites of both heavy chains. This type of analysis presents similar ambiguity found in intact mass analysis where it is not possible to distinguish between two isobaric species having different N-glycan distribution.

Capítulo 3

Table 3: N-glycan analysis performed for the 4 mAbs analysed on the Fc region after digestion with gingipain. Experimental average masses are reported as well as theoretical average masses and average mass accuracies based on triplicate analysis. The relative abundances of fragments are also shown and were based on MS signal intensities averaged on triplicate analysis. Both C-term lysine loss and 6 disulphide bonds are considered in the calculation of the theoretical average mass unless stated otherwise.

mAbs	Modifications/Glycoforms associated	Experimental mass	Theoretical average mass	Mass difference (ppm, n=3)	Relative abundance (% , n=3)
BEV	A2G0F/A2G0	53148.2	53149.3	20.7	4.1
	A2G0F/A2G0F	53294.8	53295.4	11.4	61.7
	A2G0F/A2G1F	53456.9	53457.6	12.3	20.6
	A2G1F/A2G1F or A2G0F/A2G2F	53620.3	53619.7	11.1	11.2
	A2G1F/A2G2F	53782.7	53781.8	16.6	2.4
TRA	A2G0/A2G0F	53149.4	53149.3	1.7	6.4
	A2G0F/A2G0F	53294.8	53295.4	10.9	27.3
	A2G0F/A2G1F	53457.2	53457.6	7.4	33.1
	A2G1F/A2G1F or A2G0F/A2G2F	53619.3	53619.7	7.7	24.1
	A2G1F/A2G2F	53781.4	53781.8	7.5	8.9
	A2G2F/A2G2F	53943.3	53944.0	13.5	0.2
INF	1x No C-term K A1G0F/A1G0F	52950.7	52953.1	45.1	0.6
	A2G0F/A1G0F	53028.0	53028.1	1.1	0.2
	A2G0F/A2G0F	53231.3	53231.3	0.1	27.7
	1x C-term K, A2G0F/A2G0F	53358.5	53359.5	18.5	8.7
	A2G0F/A2G1F	53393.2	53393.4	3.7	21.9
	A1G0M5/A2G0F	53464.3	53463.5	13.7	0.3
	2x C-term K, A2G0F/A2G0F	53487.3	53487.6	6.1	9.7
	1x C-term K, A2G0F/A2G1F	53521.5	53521.6	1.4	7.2
	A2G0F/A2G2F or A2G1F/A2G1F	53555.5	53555.6	1.1	10.8
	2x C-term K, A2G0F/A2G1F	53649.6	53649.8	4.1	5.3
	1x No C-term K A1G0M5/A2G2F	53658.6	53658.7	2.3	0.1
	1x C-term K, A2G0F/A2G2F or A2G1F/A2G1F	53682.9	53683.8	15.1	2.7
	A2Sg1G0F/A2G0F	53700.1	53699.8	5.6	0.2
	A2G1F/A2G2F	53718.3	53717.7	9.9	1.0
	2x C-term K, A2G0F/A2G2F or A2G1F/A2G1F	53811.8	53811.9	2.5	1.3
	1x C-term K, A2G2/A2G2F	53862.1	53861.9	3.1	1.2
	A2Sg1G1F/A2G0F	53862.7	53862.8	3.4	0.7
	2x C-term K, A2G1F/A2G2F	53973.1	53974.1	17.9	0.3
	A2Sg1G1F/A2G1F	54024.8	54025.0	3.9	0.1
	RIT	Gln-->Pyro-Glu, A2G0/A2G0F	53085.5	53085.2	7.0
Gln-->Pyro-Glu, A2G1F/ A2G1F		53555.3	53555.6	5.9	27.5
Gln-->Pyro-Glu, A2G1F/ A2G2F		53717.5	53717.7	4.3	11.3
Gln-->Pyro-Glu, A2G0F/ A2G0F		53230.9	53231.3	7.5	25.3
Gln-->Pyro-Glu, A2G2F/ A2G2F		53880.3	53879.9	8.9	1.0
Gln-->Pyro-Glu, A2G0F/ A2G1F		53393.1	53393.4	6.8	34.5

IdeS digestion

IdeS digestion is a widely used enzymatic tool to obtain subunits of the monoclonal antibody in a molecular mass range where high resolution mass spectrometry is readily available. IdeS cleaves monoclonal antibodies below the hinge region, driving the formation of two identical scFc regions. If HR-MS data are needed for Fab region as well, a reduction step facilitates generation of a free light chain and the Fd region, both with the same mass range of approximately 25 kDa making it possible to apply the same tuning parameters for data acquisition, as well as high mass resolution settings, returning isotopically resolved data that enable to obtain monoisotopic mass information. The data analysis enabled the identification of subunit proteoforms with average mass accuracy ≤ 2 ppm (Table 4, S9, Figure S6-9). Moreover, reverse phase separation of the subunits is able to separate proteoforms containing other types of modifications, such as C term lysine truncation, reducing the complexity of MS signal identification for near isobaric variants arising from the combination of N-glycan and lysine presence/absence (Figure 3).

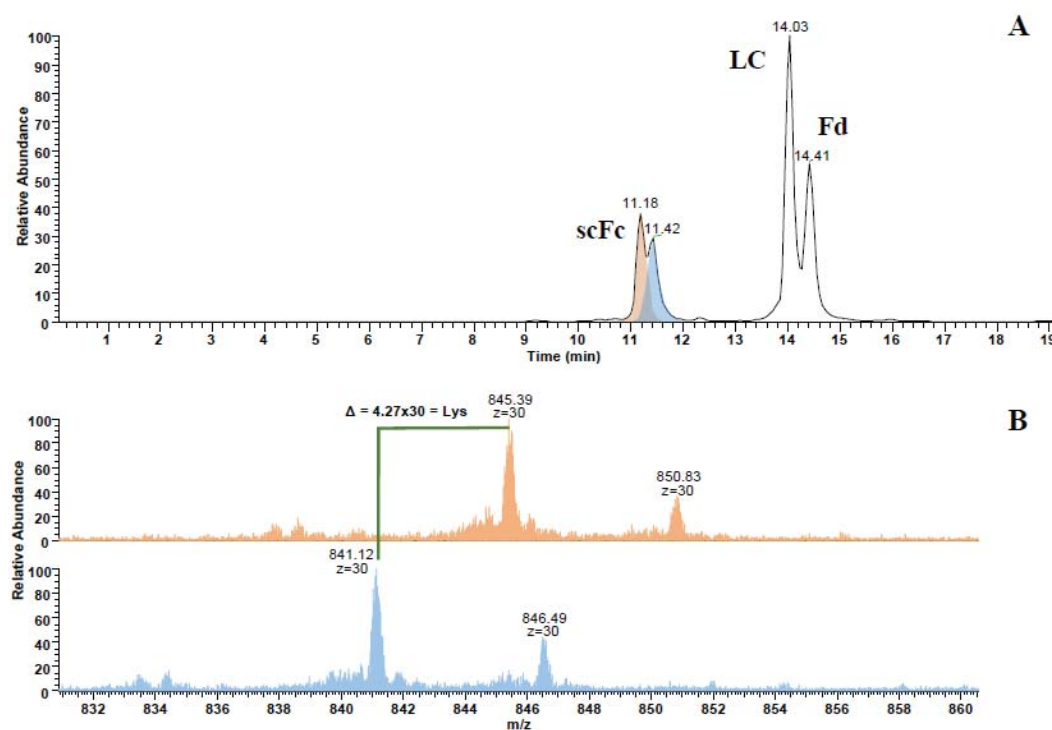


Figure 3. (A) BPC for RP-MS analysis of the IdeS digested infliximab drug product. (B) Zoom of charge state +30 for scFc peaks containing (top) and missing (down) C-term lysine.

Table 4: scFc analysis via RP-HRMS. Average experimental masses were determined based on triplicate analysis, as well as mass accuracies and relative abundancies. C-term lysine clipping is considered in the theoretical mass calculation unless indicated otherwise.

mAbs	Modifications/Glycoforms	Experimental mass	Theoretical monoisotopic mass	Mass difference (ppm, n=3)	Relative abundance (% , n=3)
BEV	Unglycosylated	23775.974	23775.930	1.9	1.4
	A2G0F	25220.485	25220.463	0.8	84.9
	A2G1F	25382.504	25382.516	0.5	10.3
	A1G0F	25018.436	25017.380	2.3	1.9
	A2G0	25074.482	25074.410	2.9	1.5
TRA	A2G0	25074.431	25074.405	1.0	4.3
	A2G0F	25220.513	25220.463	2.0	52.0
	A2G1F	25382.581	25382.516	2.6	36.2
	A1G0F	25017.445	25017.380	2.6	1.8
	M5	24992.715	24992.350	14.6	1.6
	A2G2F	25544.569	25544.569	00	4.1
INF	M5	24960.391	24960.380	0.4	1.6
	A1G0F	24985.423	24985.412	0.4	2.4
	1x C-term lysine, M5	25088.477	25088.475	0.1	1.8
	1x C-term lysine, A2G0F	25316.594	25316.586	0.3	38.6
	1x C-term lysine, A2G1	25332.552	25332.581	1.1	1.4
	1x C-term lysine, A2G0	25170.536	25170.528	0.3	3.0
	A2G0F	25188.488	25188.487	0.0	30.2
	A2G1F	25350.558	25350.544	0.6	10.9
	1x C-term lysine, A2G1F	25478.629	25478.639	0.4	10.1
RIT	A2G0F	25188.541	25188.491	2.0	44.2
	A2G1F	25350.583	25350.544	1.5	48.3
	A2G2F	25512.604	25512.597	0.3	7.5

Peptide mapping

Peptide mapping analysis is a comprehensive tool for protein characterization using proteolysis of the biotherapeutic followed by LC-MS/MS analysis of the peptides. Peptide mapping is widely used in biopharmaceutical analysis to verify the primary sequence and determine the types and locations of PTMs present. The higher sensitivity of peptide mapping, together with the availability of MS/MS data provides accurate information on the N-glycans present as well as site-specific information if multiple glycosylation sites are present on the protein. Peptide mapping analysis has demanding sample preparation that requires multiple steps and analyst expertise to ensure reproducibility. MS/MS data

analysis, although improved by modern software tools, requires experienced analysts. For these reasons, this technique is not yet considered suitable for a regulated environment, even if it is considered a gold standard during product development and many research efforts are directed towards standardization and simplification of the peptide mapping workflow to facilitate its introduction into quality control laboratories [25]. Analysis performed on the four mAbs returned a higher number of N-glycoforms than with any other technique, reaching abundancies $\leq 0.1\%$ (Table 5, S10) and obtained setting a mass accuracy threshold of 5 ppm during data analysis. Glycopeptides separation could resolve isomers like A2G1F and A2G1'F (Figure 4a) enabling their quantitation, although MS/MS data did not provide fingerprint spectra to distinguish the two glycoforms (Figure 4b). Performing peptide mapping analysis without knowledge of pre-existing information from released N-glycans may mislead glycopeptide identification, for example the identification of a low abundant glycan in infliximab as A1S1M5 (Table 5).

It is known that infliximab drug product is characterized by the presence of N-glycolyl neuraminic acid (NeuG) and that there is the possibility of isobaric N-glycans where N-acetyl neuraminic acid (NeuA) and one galactose are substituted by NeuG and one fucosa. The low abundance of this glycan and the absence of MS/MS data relative to the loss of sialic acid or fucose (data not shown) caused the software to incorrectly assign the glycopeptide, which could be avoided by providing a molecule specific N-glycan database relative to the drug product as determined using released N-glycan analysis.

Capítulo 3

Table 5: N-glycan abundancies for the 4 analysed mAbs obtained through peptide mapping analysis via LC-MS/MS. Abundancies are expressed as % respect to the total abundance of the peptide EEQYNSTYR and/or TKPREEQYNSTYR containing 1 miscleavage and were calculated on triplicate independent sample preparation.

Glycoform	% Relative abundance (n=3)			
	Bevacizumab	Trastuzumab	Infliximab	Rituximab
A1G0	0.84	2.30	2.47	0.34
A1G0F	6.61	6.98	8.78	5.06
A1G0M4	-	-	1.70	-
A1G0M5	-	-	3.87	-
A1G0M5F	-	-	1.83	-
A1G1	-	0.59	-	-
A1G1F	0.76	2.18	3.91	1.80
A1G1M5	-	-	1.36	-
A1G1M5F	-	-	0.52	-
A1S1	-	0.09	-	-
A1S1F	-	0.40	-	0.21
A1S1M5 (A1Sg1M4F)	-	-	0.51	-
A1Sg1	-	-	0.32	-
A1Sg1F	-	-	2.10	-
A2G0	2.33	5.38	1.66	1.61
A2G0F	74.86	39.88	44.86	40.77
A2G1	-	1.94	0.37	0.63
A2G1F	10.77	32.28	18.60	39.80
A2G2	-	0.16	-	-
A2G2F	0.73	5.19	2.40	7.51
A2S1G0F	-	0.44	-	0.48
A2S1G1F	-	0.65	-	1.00
A2S2F	-	0.23	-	0.48
A3G1F	-	0.16	-	0.16
A2Sg1G0F	-	-	0.76	-
M3	-	0.16	-	-
M4	-	0.15	0.09	-
M5	0.87	2.87	7.33	1.45
M6	-	0.20	0.12	0.29
Unglycosylated	5.35	1.44	0.39	1.34

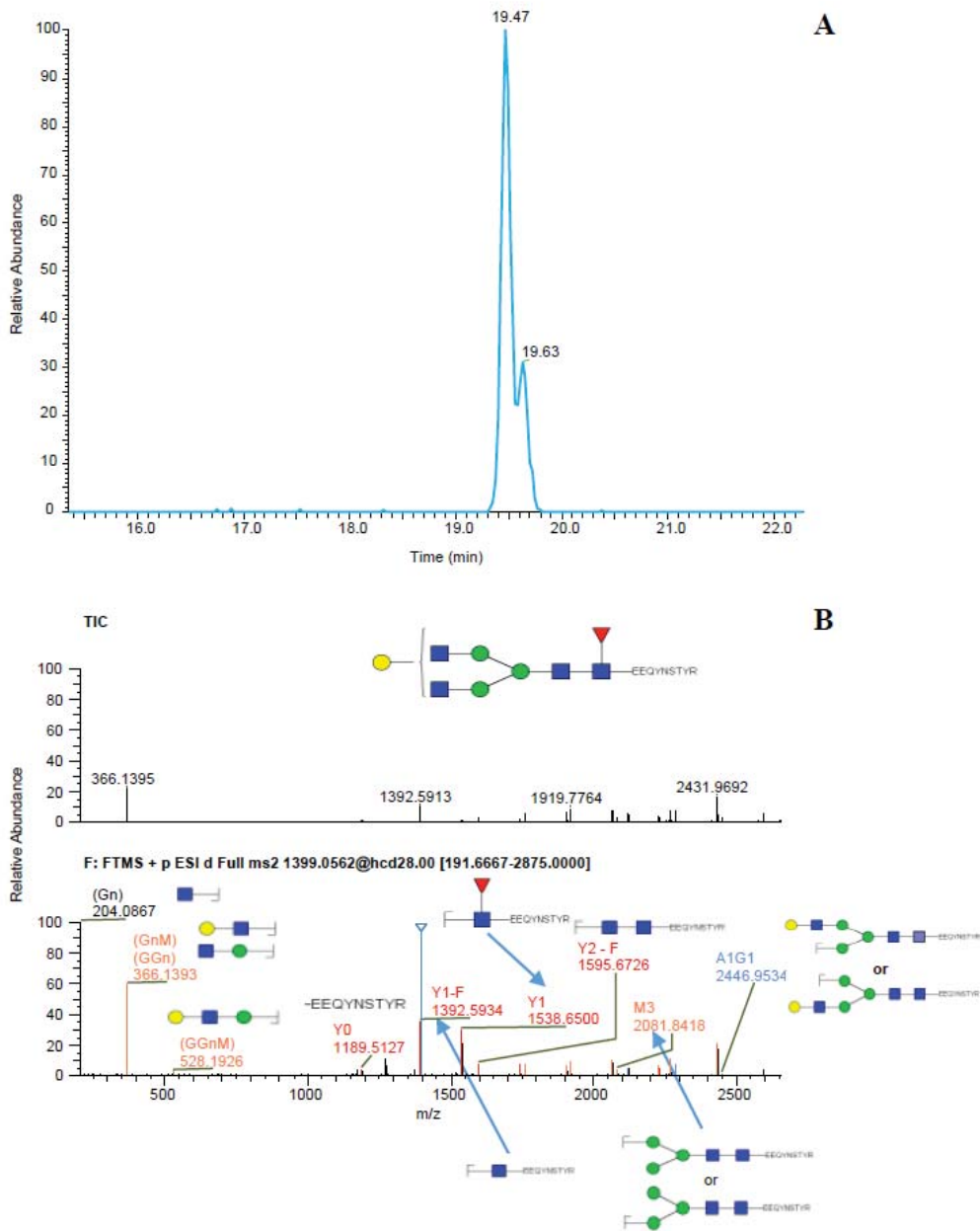


Figure 4. XIC (Extracted Ion Chromatogram) of the glycopeptide carrying A2G1F N-glycan from the peptide mapping analysis of rituximab drug product (A) and relative MS/MS spectrum (B)

Released N-glycan

Released N-glycan analysis is the most established technique for N-glycan profiling of glycoproteins. In this study we evaluated (Table 2, S4-S5) the performance, in terms of relative quantitation of the N-glycans when labelling the sample with two of the mainly used labels (2-AA and 2-AB) and compared the relative quantitation results obtained using MS (Table S4,S11, Figure 5a) and fluorescence (FLR) signal integration (Table S5,S12 Figure 5b). The results show good comparability of the sample preparation performed with the two different labels and with the two detection techniques (Figure 5) while the overall mass accuracy was lower than 2 ppm.

Evaluation of the different approaches for N-glycan analysis

While assessing comparability of the quantitative results obtained across the different techniques, a number of factors which may drive the analyst to the choice of the right technique were evaluated (Figure 6), such as the time of the analysis from sample preparation to final data analysis report, the depth of structural identification obtained on the glycoforms with each technique, the data quality, accuracy and robustness of the results, the sensitivity of the technique, the amount of sample required and the need of expertise to perform both sample preparation and data analysis. Workflows using the information retained at intact or subunits level will require little or no sample preparation, making it ideal for routine analysis to assure robustness of the analysis; nevertheless, the structural details obtained in this way are limited to the most abundant glycoforms (Figure 7) and they do not provide structural details on the glycans; isomers relative abundance cannot be assessed as well as ambiguity between some glycoforms when the analysis is carried on both heavy chains at the same time (intact, gingipain digest) or with other PTMs such as glycation.

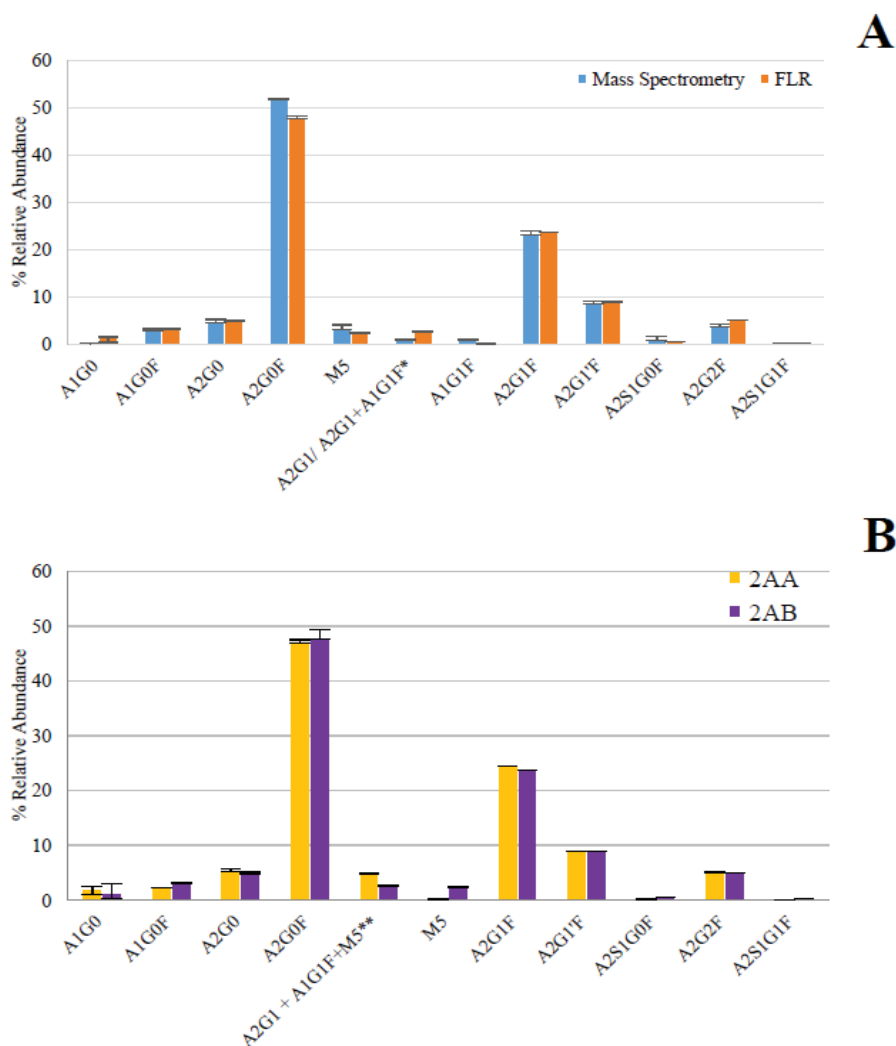


Figure 5. (A) Comparison of released 2-AB labelled N-glycan from trastuzumab drug product. Quantitation was obtained integrating fluorescence trace (orange) and MS signals from each N-glycan (blue). Quantitation is based on triplicate sample preparation. *In 2-AB trace coeluting A2G1 and A1G1F N-glycans were quantified as a single peak. (B) Comparison of released N-glycan from trastuzumab drug product. Quantitation was obtained from fluorescence trace after labelling with 2-AA (yellow) and 2-AB (purple). Quantitation is based on triplicate sample preparation. **In 2-AB labelled N-glycans M5 elutes at a different retention time, and relative percentage is only relative to coeluting A2G1 and A1G1F species.

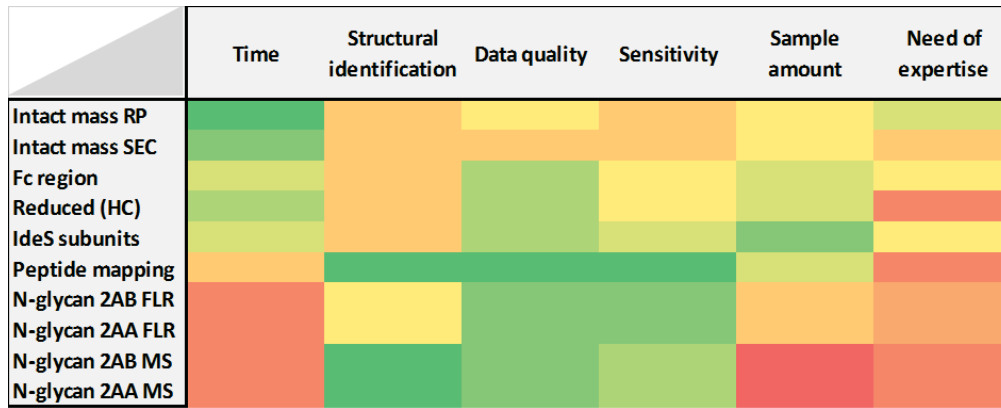


Figure 6. Heat map of the factors leading to the choice of the right technique for N-glycan analysis

N-glycan analysis at intact level is also strongly dependent on sample heterogeneity; when other PTMs strongly influence the complexity of the mass spectra at intact level or there is an intrinsic complexity of N-glycan profiles, the use of tools to simplify the data is strongly recommended and the analysis of subunits can be helpful, as for infliximab drug product analysed in this study. Sample complexity and N-glycan abundance is also strictly related to robustness of the analysis; while generally low %RSD values were obtained, the presence of near-isobaric species or of very low abundant species returned higher values (Table S6-S9).

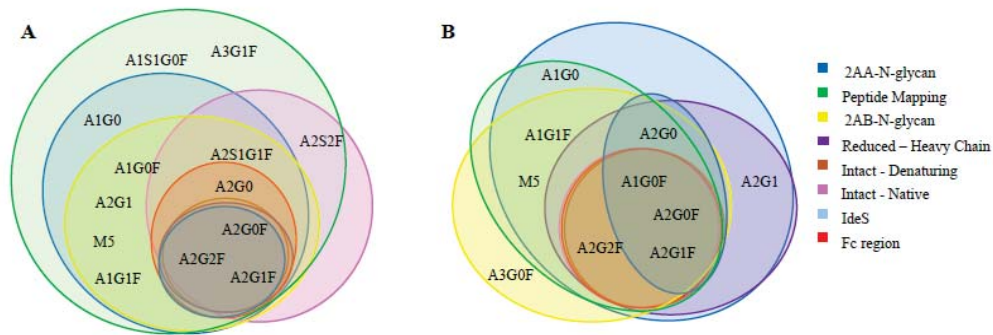


Figure 7. Venn Diagram of the N-glycans quantified through 10 different workflows on rituximab (A) and bevacizumab (B) drug products.

While providing excellent data quality and additional structural information, workflows such as peptide mapping and the analysis of released N-glycans require more time and need

of trained analyst. These analyses are not yet robust enough to assure reproducibility across analysts and laboratories as they require multiple steps for the sample preparation and a high degree of expertise for the data analysis without or with little support from bioinformatics tools. In particular, it was possible to appreciate a marked difference in the quantitative analysis in terms of %RSD values, between released N-glycan and peptide mapping analysis (Table S10-S12). Released N-glycan involved a number of non-automated steps for sample preparation while data processing required efforts in terms of manual integration of the obtained chromatograms as there are few software tools that guarantee a fully automated analysis of fluorescently labelled N-glycans. On the contrary, the possibility to fully automate trypsin digestion and the data analysis fully integrated into bioinformatics tools, is probably the main reason behind the difference of reproducibility between the two techniques. Even if efforts towards standardisation and automatization of these methods are being made to transfer them into the QC laboratories [33], a high level of knowledge in the MS data interpretation is still required.

Conclusion

N-glycan analysis of biotherapeutics is a major critical attribute influencing many functions of the drug product [4]. Their assessment is required from ICH Q6B to assure biologics safety and stability and it constitutes important criteria to assess biosimilarity between originator and newly developed drugs. Although released N-glycan analysis is considered the gold standard, N-glycan heterogeneity on the monoclonal antibodies can be assessed through several analytical workflows.

In this study, we compared N-glycan analysis and quantitation obtained through 10 different methods on 4 different commercially available monoclonal antibodies.

While assessing good comparability of the quantitative data obtained with these techniques, several advantages and disadvantages were proved. Recently, an interlaboratory study was published on the analysis of NIST standard mAb glycosylation [36]; the results highlighted the lack of standardisation of analytical methods for N-glycan identification and quantitation. De Leoz et al. obtained 103 different reports with a range of N-glycans identified spanning 4 to 48 structures. This variability was surely affected by the analytical workflow applied but proved to be mainly dependent on laboratory skills. Since the experiments reported herein were performed in the same laboratory, from analysts with

similar skills and using the same equipment, the variability seen in quantitative results can solely be dependent on the workflow and it was possible to appreciate the differences between more direct or automated methods, such as intact analysis or glycopeptides analysis, and more lengthy and laborious techniques, such as released N-glycan analysis. As well, the choice of the analytical workflow can strongly impact the in-depth of structural features detected.

It should also be considered that analysis occurs at different stages of the bioprocess, from early development to lot-to-lot comparison for batch release and there is usually a stronger need for structural details during drug development than in the later stages. It is possible in this way, to use the technique of choice according to the specific application and information required, justifying the lack of standardisation for this critical workflow. All the consideration provided in this study, while remaining strongly sample dependent, can surely constitute a guide for the choice of the most appropriate technique for N-glycan analysis of biotherapeutics.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge funding from Science Foundation Ireland under Grant Number 13/CDA/2196, the University of Granada for the international mobility scholarship, collaborators from Thermo Fisher Scientific for instrument access, the Hospital Pharmacy Unit of the University Hospital San Cecilio (Granada, Spain) for kindly supplying all the medicine samples.

Supplementary Figures

Figure S1

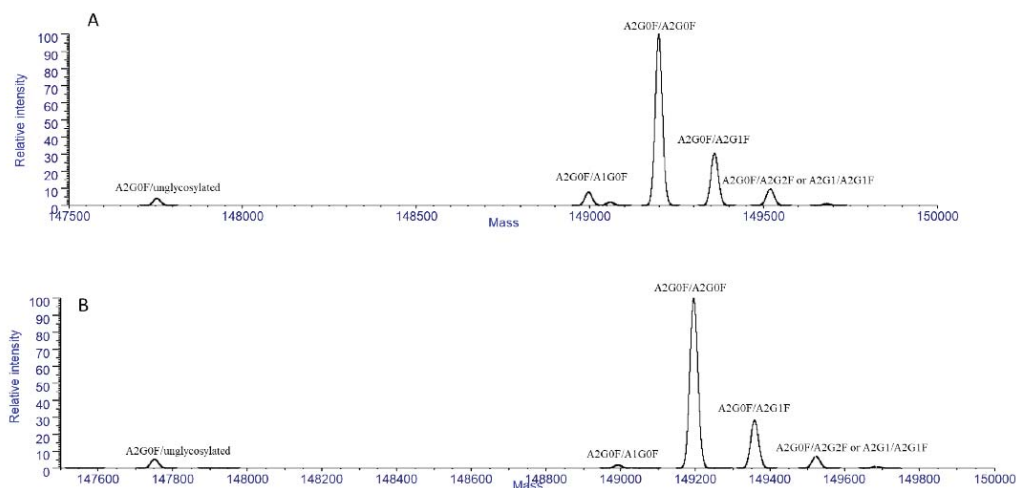


Figure S1: Deconvoluted mass spectra of intact bevacizumab drug product in denaturing (A) and native (B) mode.

Figure S2

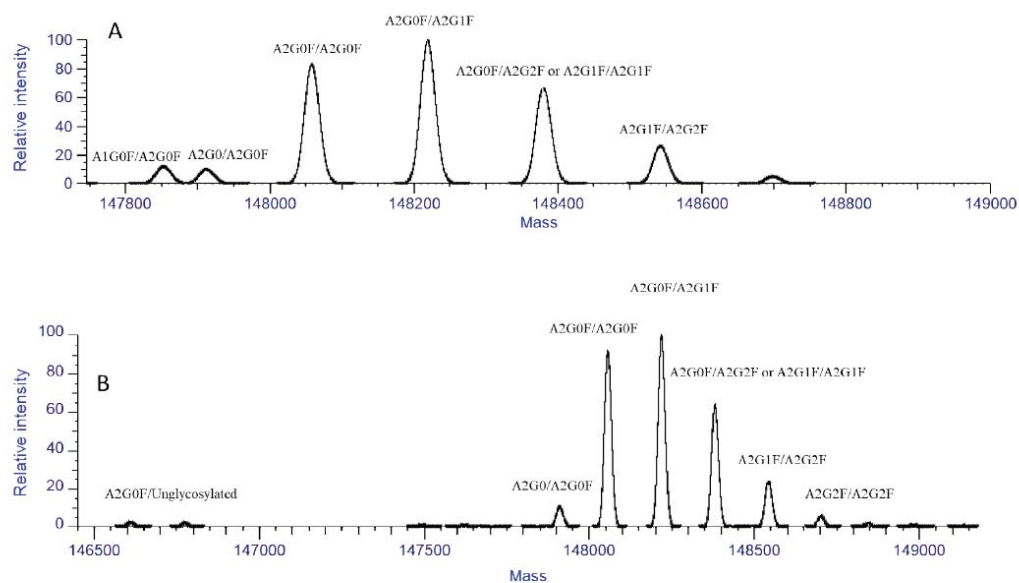


Figure S2: Deconvoluted mass spectra of intact trastuzumab drug product in denaturing (A) and native (B) mode.

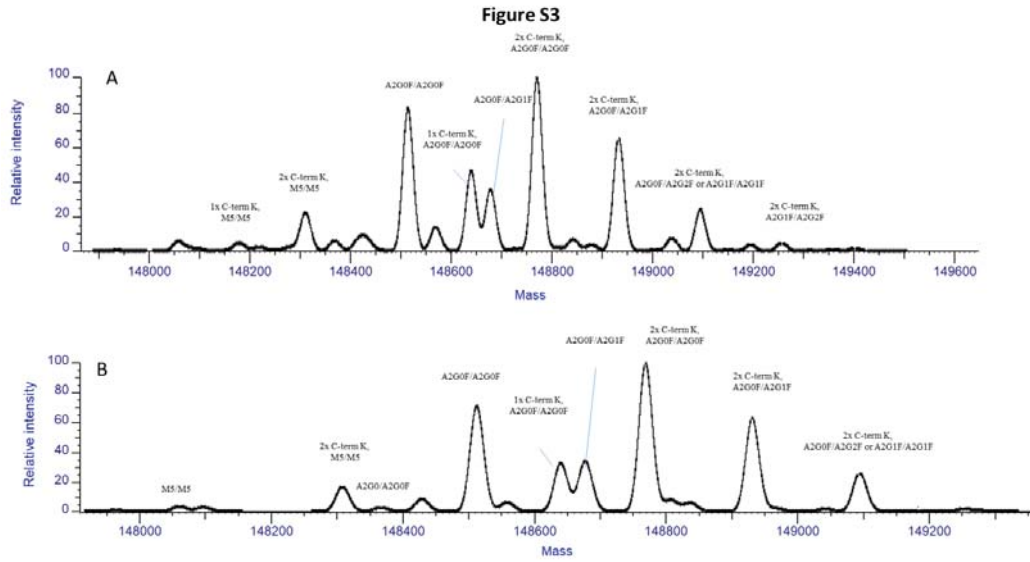


Figure S3: Deconvoluted mass spectra of intact infliximab drug product in denaturing (A) and native (B) mode.

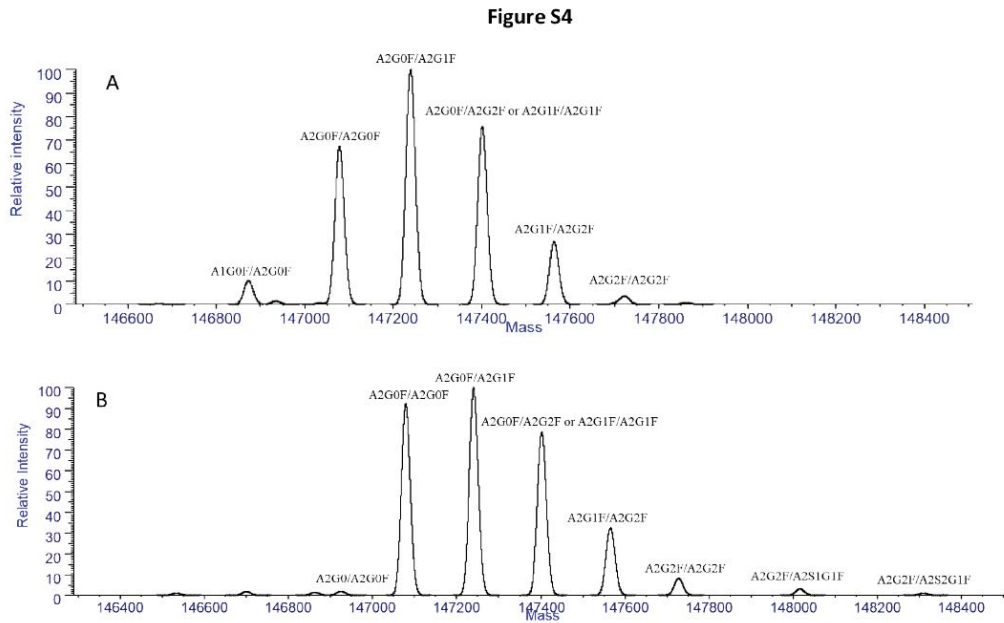


Figure S4: Deconvoluted mass spectra of intact rituximab drug product in denaturing (A) and native (B) mode.

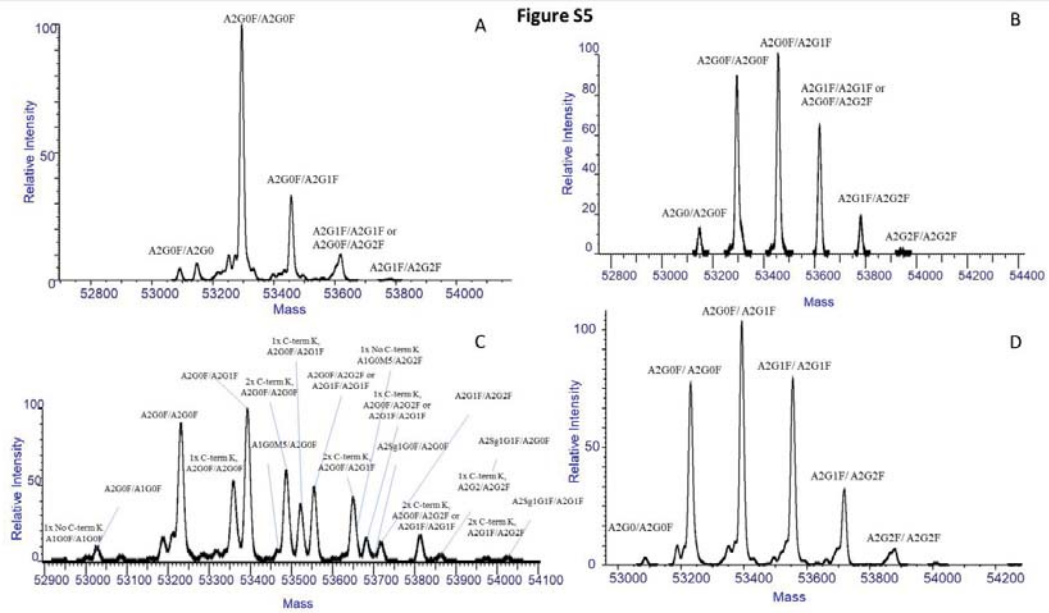


Figure S5: Deconvoluted mass spectra of the Fc region of bevacizumab (A), trastuzumab (B), infliximab (C) and rituximab (D) drug products after digestion with gingipain enzyme and RP-MS analysis.

Figure S6

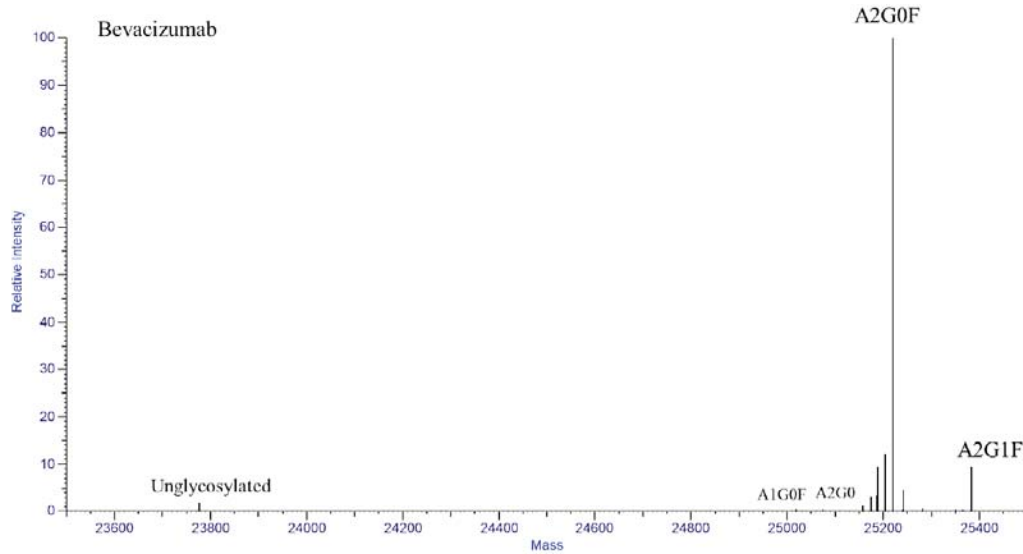


Figure S6: Deconvoluted mass spectrum of scFc region of bevacizumab drug product.

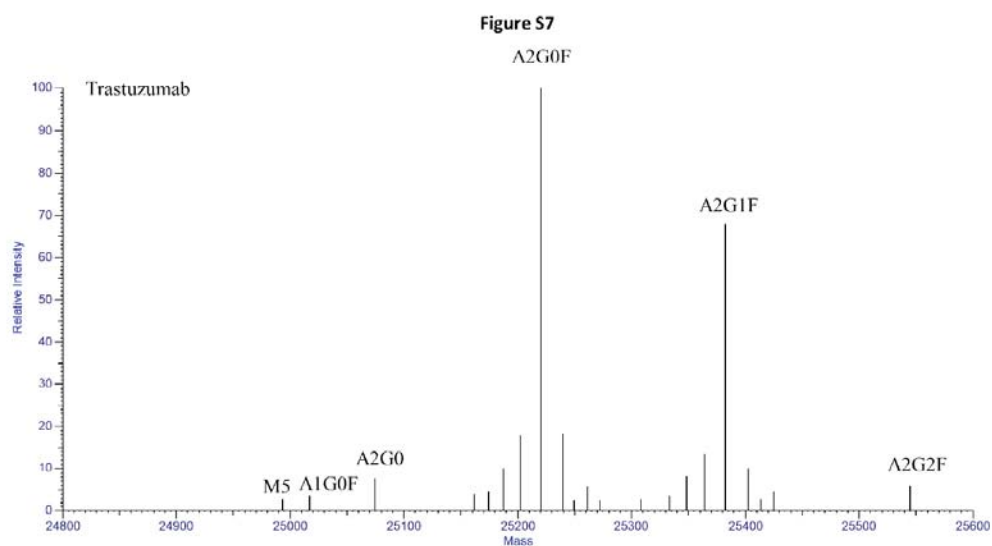


Figure S7: Deconvoluted mass spectrum of scFc region of trastuzumab drug product.

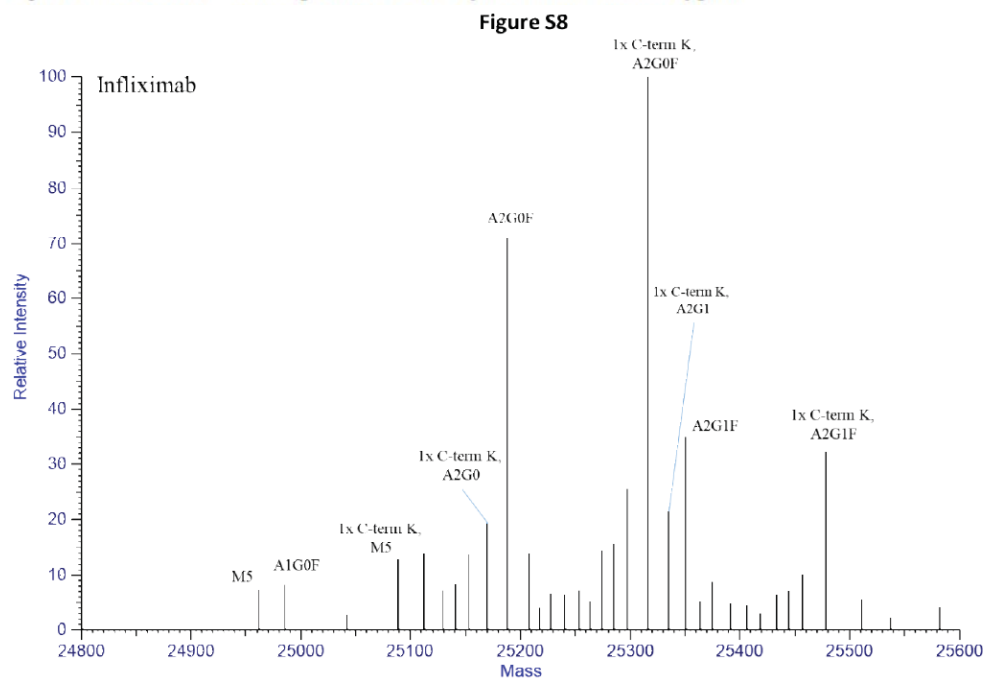


Figure S8: Deconvoluted mass spectrum of scFc region of infliximab drug product.

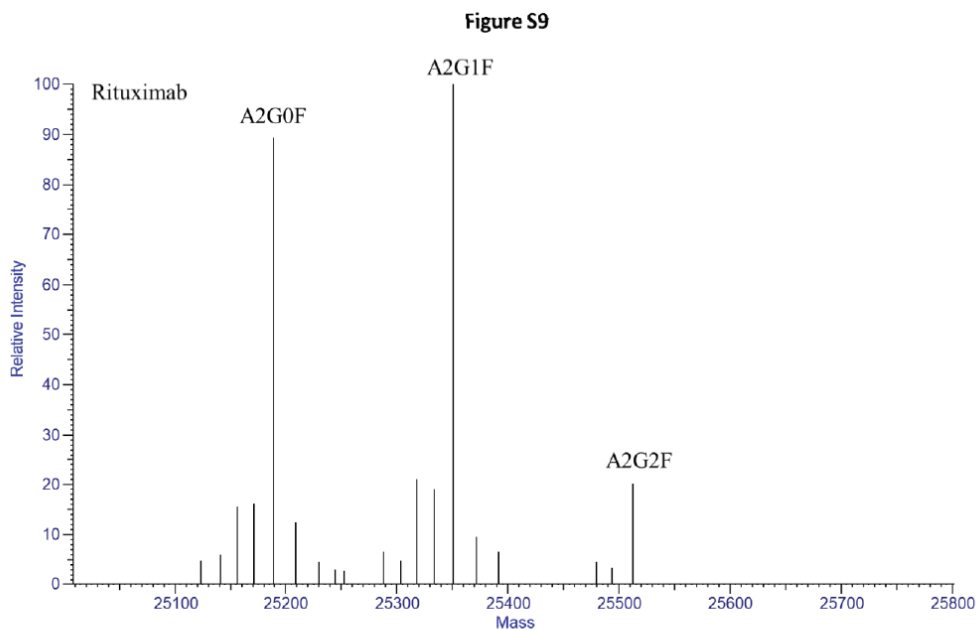


Figure S9: Deconvoluted mass spectrum of scFc region of rituximab drug product.

Supplementary Tables

Table S1: 96-well plate scheme for trypsin digestion

Lane	Content	Volume (μL)
A	SMART Digest buffer	150
	Sample (2 mg/mL)	50
B	Tip Comb	
C	Empty	
D	Magnetic SMART Beads	15
	Bead Buffer (SMART Digest buffer)	100
E	Bead Wash Buffer	200
	(SMART Digest buffer 1:4 (v/v))	
F	Waste Lane (Water)	250

Capítulo 3

Table S2: MS data processing settings for deconvolution of isotopically unresolved mass spectra using ReSpect algorithm.

Component Detection	Intact denaturing analysis	Intact native analysis	Intact reduced HC analysis	Gingipapain Fc analysis
Algorithm	ReSpect	ReSpect	ReSpect	ReSpect
m/z Range	1500 to 4500	2200 to 8000	600 to 2500	600 to 2400
Model mass range	10000 to 160000	10000 to 160000	10000 to 160000	10000 to 160000
Sliding window merge tolerance	20ppm	20ppm	20ppm	20ppm
Mass Tolerance	20 ppm	20 ppm	20 ppm	20 ppm
Charge State Range	10 to 100	20 to 30	10 to 100	10 to 100
Min. Adjacent Charge	6 to 10	3 to 3	3 to 10	6 to 10
Target Mass	150000 Da	150000 Da	50000 Da	55000 Da
Resolution at 400m/z	Raw File Specific	Raw File Specific	Raw File Specific	Raw File Specific
Noise Rejection	95% Confidence	95% Confidence	95% Confidence	95% Confidence
Rel. Abundance Threshold	0.00	0.00	0.00	0.00
Num. Interaction	3	3	3	3
Noise Compensation	yes	yes	yes	yes
Charge carrier	H ⁺	H ⁺	H ⁺	H ⁺
Minimum peak Significance	1.0	1.0	1.0	1.0
Base Line Correction	0	0	0	0
Number of peak Shape	Left 2.00 Right 2.00	Left 2.00 Right 2.00	Left 2.00 Right 2.00	Left 2.00 Right 2.00
Deconvolution Mass Tolerance	10.00ppm	10.00ppm	10.00ppm	10.00ppm
RT Tolerance	1.000 min	1.000 min	1.000 min	1.000 min
Min. Number of Required Occurrences	1	1	1	1

Table S3: MS data settings for deconvolution of isotopically unresolved spectra using Xtract algorithm.

Component Detection	Settings
Algorithm	Xtract
Output Mass Range	20,000 to 30,000
Output Mass	M
S/N Threshold	3.00
Rel. Abundance Threshold	0.00
Charge Range	5 to 50
Min. Num Detected Charge	3
Isotope Table	Protein
Fit Factor (%)	80
Remainder Threshold (%)	25
Consider Overlap	Yes
Resolution at 400m/z	Raw File Specific
Charge Carrier	H ⁺ (1.00727663)
Minimum Intensity	1
Expected Intensity Error	3
m/z Range	600.00 to 2,400.00
Chromatogram Trace Type	TIC
Sensitivity	High
Rel. Intensity Threshold (%)	1
Identification	
Sequence Matching Mass Tolerance	20.00ppm
Mass Tolerance	10.00ppm
RT Tolerance	1.000 mins
Min. Number of Required Occurrences	1

Capítulo 3

Table S4: Released N-glycan analysis performed *via* HILIC-MS. Relative abundancies were based on triplicate sample preparation and the integration of the extracted ion chromatogram for the most abundant charge state. Mass accuracies were calculated as average of the triplicate analysis.
























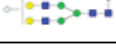
Structure	Nomencl	Δ (ppm)		% abund		Δ (ppm)		% abund		Δ (ppm)		% abund		Δ (ppm)		% abund	
		2AA	2AB	2AA	2AB	2AA	2AB	2AA	2AB	2AA	2AB	2AA	2AB	2AA	2AB	2AA	2AB
		Bevacizumab (n=3)				Trastuzumab (n=3)				Infliximab (n=3)				Rituximab (n=3)			
	M3F	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	6.2	-	-	-	-	-
	A1G0	0.5	-	0.1	-	0.3	16.3	3.1	0.2	0.8	14.6	1.2	6.4	0.8	-	1.6	-
	A1G0F	3.0	0.4	2.0	2.3	0.7	1.2	1.7	2.9	0.7	1.1	3.1	8.2	0.3	0.1	1.3	6.8
	A2G0	1.1	0.7	1.8	1.6	0.4	0.7	3.9	4.4	1.2	-	1.6	-	1.1	1.2	1.4	3.8
	A1G0M4	-	-	-	-	-	-	-	-	1.5	2.6	0.2	1.0	-	-	-	-
	A2G0F	1.3	1.3	83.1	82.2	0.8	0.3	51.0	51.5	1.3	2.1	41.5	44.5	2.5	1.8	47.7	49.0
	A1G1F	-	0.4	-	0.6	0.3	1.0	0.6	0.8	0.8	0.9	12.7	3.9	0.1	0.1	0.3	0.4
	A2G1	3.0	-	0.1	-	0.3	0.8	0.8	0.8	-	-	-	-	0.7	2.6	0.3	0.3
	M5	1.2	1.8	0.1	0.1	0.1	0.1	0.5	3.1	1.0	0.3	1.7	2.3	0.1	0.3	0.3	0.2
	A3G0F	-	0.8	-	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A2G1F	0.2	0.1	5.9	5.9	1.1	0.8	24.1	23.1	0.6	2.2	17.2	19.6	1.8	1.3	30.1	26.1
	A2G1F	0.2	0.1	5.2	5.2	0.3	0.8	9.6	8.4	0.7	1.3	6.7	4.5	1.1	5.1	11.0	8.2
	A1G1M4F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.8	-	0.9	-	-	-	-
	A1G0M5F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M5F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15.4	-	1.3	-	-	-	-
	A2G2F	0.3	0.7	1.7	1.7	0.4	0.4	3.7	3.7	0.9	0.0	3.6	3.4	2.5	1.5	5.1	4.9

Table S4 (continuation).

Structure	Nomencl	Δ (ppm)		% abund		Δ (ppm)		% abund		Δ (ppm)		% abund		Δ (ppm)		% abund	
		2AA	2AB	2AA	2AB	2AA	2AB	2AA	2AB	2AA	2AB	2AA	2AB	2AA	2AB	2AA	2AB
		Bevacizumab (n=3)				Trastuzumab (n=3)				Infliximab (n=3)				Rituximab (n=3)			
	A1G1M5F	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	1.7	0.7	0.5	-	-	-	-
	A1S1F	-	-	-	-	1.1	1.7	0.6	0.9	-	-	-	-	-	-	-	-
	A2S1G1F	-	-	-	-	0.5	0.4	0.4	0.2	-	-	-	-	9.8	1.2	0.9	0.3
	A1Sg1F	-	-	-	-	-	-	-	-	1.4	0.6	1.6	1.0	-	-	-	-
	A2Sg1G0F	-	-	-	-	-	-	-	-	1.8	1.6	0.6	1.5	-	-	-	-
	A2Sg1'G0F	-	-	-	-	-	-	-	-	1.4	1.5	0.6	0.5	-	-	-	-
	A1Sg1M4F	-	-	-	-	-	-	-	-	1.4	1.6	0.4	0.5	-	-	-	-
	A2Sg1G1F	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	-	0.4	-	-	-	-	-

Capítulo 3

Table S5. N-glycan analysis obtained via HILIC-FLR. Peaks were identified based on the MS information and FLR trace was integrated using Xcalibur QualBrowser as described in materials and methods. Quantitation was based on averaged results of triplicate sample preparation.

N-glycan	% Relative abundancies (n=3)							
	Bevacizumab		Trastuzumab		Infliximab		Rituximab	
	2AA	2AB	2AA	2AB	2AA	2AB	2AA	2AB
M3F	-	-	-	-	2.0	-	-	-
A1G0	2.7	-	2.1	1.3	1.9	1.5	0.8	-
A1G0F	2.8	3.8	2.3	3.1	5.4	4.7	0.6	1.1
A2G0	2.2	1.9	5.2	4.8	4.3	-	1.5	1.6
A1G0M4	-	-	-	-	0.5	1.3	-	-
A2G0F	80.7	81.1	46.9	47.6	41.6	45.5	46.9	48.3
A2G1 / M5 / A1G1F	0.8	-	4.8	-	-	-	2.3	-
A2G1 / A1G1F	-	0.5	-	2.6	4.1	3.1	-	1.3
M5	-	0.7	-	2.3	4.4	5.6	-	1.5
A3G0F	-	0.3	-	-	-	-	-	-
A2G1F	7.3	7.7	24.4	23.6	19.0	21.5	29.5	28.2
A2G1'F	3.0	3.0	8.9	8.9	6.1	6.1	10.9	10.8
A1G1M4F / A1G0M5F	-	-	-	-	0.5	1.1	-	-
M5F	-	-	-	-	-	0.3	-	-
A2G2F	0.4	0.7	5.1	5.0	4.2	4.9	7.2	6.6
A1G1M5	-	-	-	-	0.8	0.4	-	-
A1S1F	-	-	0.2	0.5	-	-	-	-
A1Sg1F	-	-	-	-	2.0	1.9	-	-
A2S1G1F	0.1	0.3	0.1	0.3	-	-	0.3	0.6
A2Sg1G0F	-	-	-	-	0.7	1.3	-	-
A2Sg1'G0F	-	-	-	-	1.1	0.4	-	-
A1Sg1M4F	-	-	-	-	0.7	0.4	-	-
A2Sg1G1F	-	-	-	-	0.7	-	-	-

Capítulo 3

Table S6: %RSD values for N-glycan quantitation after intact mass analysis as reported in Table 1.

mAbs	Analysis	Modifications/Glycoforms associated	%RSD	Relative Abundance (%)
BEV	Denatured conditions	A2G0F/unglycosylated	4.3	2.5
		A2G0F/A1G0F	3.0	8.2
		A2G0F/A2G0F	0.6	64.0
		A2G0F/A2G1F	2.6	19.5
		A2G0F/A2G2F or A2G1/A2G1F	1.7	5.5
BEV	Native conditions	A2G0F/unglycosylated	4.0	4.3
		A2G0F/A1G0F	4.7	2.9
		A2G0F/A2G0F	1.6	70.8
		A2G0F/A2G1F	7.5	17.2
		A2G0F/A2G2F or A2G1F/A2G1F	5.6	4.3
TRA	Denatured conditions	A2G1F/A2G2F	3.6	0.5
		A1G0F/A2G0F	3.5	4.0
		A2G0/A2G0F	5.9	3.4
		A2G0F/A2G0F	2.1	27.9
		A2G0F/A2G1F	0.5	33.7
		A2G0F/A2G2F or A2G1F/A2G1F	1.0	22.5
TRA	Native conditions	A2G1F/A2G2F	8.5	8.6
		A2G0F/unglycosylated	4.6	0.8
		A2G0/A2G0F	6.9	3.4
		A2G0F/A2G0F	12.3	31.8
		A2G0F/A2G1F	14.8	32.3
		A2G0F/A2G2F or A2G1F/A2G1F	3.3	22.1
		A2G1F/A2G2F	10.3	8.0
A2G2F/A2G2F	6.1	1.5		

Capítulo 3

Table S6 (continuation).

mAbs	Analysis	Modifications/Glycoforms associated	%RSD	Relative Abundance (%)
TRA	Denatured conditions	1x C-term K, M5/M5	31.3	1.4
		2x C-term K, M5/M5	5.3	5.6
		A2G0F/A2G0F	2.4	21.6
		1x C-term K, A2G0F/A2G0F	4.6	12.0
		A2G0F/A2G1F	4.7	5.7
		2x C-term K, A2G0F/A2G0F	2.3	27.7
		2x C-term K, A2G0F/A2G1F	1.3	17.8
		2x C-term K, A2G0F/A2G2F or A2G1F/A2G1F	3.7	6.6
		2x C-term K, A2G1F/A2G2F	13.1	1.6
INF	Native conditions	M5/M5	16.6	1.2
		2x C-term K, M5/M5	0.4	3.9
		A2G0/A2G0F	28.9	0.6
		A2G0F/A2G0F	4.1	19.1
		1x C-term K, A2G0F/A2G0F	5.4	10.0
		A2G0F/A2G1F	11.7	10.5
		2x C-term K, A2G0F/A2G0F	5.7	27.4
		2x C-term K, A2G0F/A2G1F	1.5	19.3
		2x C-term K, A2G0F/A2G2F or A2G1F/A2G1F	4.5	8.0
RIT	Denatured conditions	A1G0F/A2G0F	5.2	2.7
		A2G0F/A2G0F	1.5	24.3
		A2G0F/A2G1F	0.2	36.0
		A2G0F/A2G2F or A2G1F/A2G1F	1.2	26.4
		A2G1F/A2G2F	2.7	9.6
		A2G2F/A2G2F	18.3	1.0

Capítulo 3

Table S6 (continuation).

mAbs	Analysis	Modifications/Glycoforms associated	%RSD	Relative Abundance (%)
RIT	Native conditions	A2G0/A2G0F	24.2	0.3
		A2G0F/A2G0F	10.1	24.9
		A2G0F/A2G1F	15.4	36.7
		A2G0F/A2G2F or A2G1F/A2G1F	13.5	25.4
		A2G1F/A2G2F	8.5	9.8
		A2G2F/A2G2F	8.2	2.6
		A2G2F/A2S1G1F	23.1	0.2
		A2G2F/A2S2F	17.4	0.1

Capítulo 3

Table S7: %RSD values for proteoforms quantitation after heavy chain analysis as reported in Table 2.

mAbs	Modifications/Glycoforms	%RSD	Relative abundance (%)
BEV	Unglycosylated	13.8	1.5
	A1G0F	11.1	2.1
	A2G0	10.6	0.4
	A2G0F	0.3	82.0
	A2G1	17.6	1.4
	A2G1F	2.5	12.0
	A2G2F	26.7	0.4
	A2S1G1F	30.5	0.2
TRA	M5	47.1	0.7
	A1G0F	49.9	0.6
	A2G0	4.8	3.9
	A2G0F	3.4	51.0
	A2G1	25.8	0.6
	A2G1F	0.9	38.1
	A2G2F	2.8	5.1
	INF	M5	26.4
1x C-term lysine, M5		65.6	2.1
A1G0F		55.0	1.3
A2G0		26.5	1.1
A2G0F		2.0	17.8
1x C-term lysine, A2G0F		4.6	48.2
A2G1F		2.8	11.3
1x C-term lysine, A2G1F		6.5	16.2
A2G2F		43.8	0.8
RIT	Gln-->Pyro-Glu, A2G0F	1.3	46.2
	Gln-->Pyro-Glu, A2G1F	1.7	46.4
	Gln-->Pyro-Glu, A2G2F	3.5	7.4

Capítulo 3

Table S8: %RSD values for proteoforms quantitation after Fc region analysis as reported in Table 3.

mAbs	Modifications/Glycoforms	%RSD	Relative abundance (%, n=3)
BEV	A2G0F/A2G0	6.6	4.1
	A2G0F/A2G0F	4.2	61.7
	A2G0F/A2G1F	7.1	20.6
	A2G1F/A2G1F or A2G0F/A2G2F	33.2	11.2
	A2G1F/A2G2F	47.2	2.4
TRA	A2G0/A2G0F	3.8	6.4
	A2G0F/A2G0F	1.6	27.3
	A2G0F/A2G1F	2.5	33.1
	A2G1F/A2G1F or A2G0F/A2G2F	3.2	24.1
	A2G1F/A2G2F	5.0	8.9
	A2G2F/A2G2F	17.1	0.2
INF	1x No C-term K A1G0F/A1G0F	25.8	0.6
	A2G0F/A1G0F	17.7	0.2
	A2G0F/A2G0F	3.9	27.7
	1x C-term K, A2G0F/A2G0F	3.4	8.7
	A2G0F/A2G1F	1.5	21.9
	A1G0M5/A2G0F	22.2	0.3
	2x C-term K, A2G0F/A2G0F	4.8	9.7
	1x C-term K, A2G0F/A2G1F	6.4	7.2
	A2G0F/A2G2F or A2G1F/A2G1F	2.5	10.8
	2x C-term K, A2G0F/A2G1F	6.0	5.3
	1x No C-term K A1G0M5/A2G2F	17.2	0.1
	1x C-term K, A2G0F/A2G2F or A2G1F/A2G1F	5.4	2.7
	A2Sg1G0F/A2G0F	17.3	0.2
	A2G1F/A2G2F	11.8	1.0
	2x C-term K, A2G0F/A2G2F or A2G1F/A2G1F	6.1	1.3
	1x C-term K, A2G2/A2G2F	26.0	1.2
	A2Sg1G1F/A2G0F	32.7	0.7
2x C-term K, A2G1F/A2G2F	29.6	0.3	
A2Sg1G1F/A2G1F	99.7	0.1	
RIT	Gln-->Pyro-Glu, A2G0/A2G0F	16.2	0.4
	Gln-->Pyro-Glu, A2G1F/ A2G1F	1.8	27.5
	Gln-->Pyro-Glu, A2G1F/ A2G2F	5.1	11.3
	Gln-->Pyro-Glu, A2G0F/ A2G0F	1.0	25.3
	Gln-->Pyro-Glu, A2G2F/ A2G2F	87.7	1.0
	Gln-->Pyro-Glu, A2G0F/ A2G1F	3.1	34.5

Table S9: %RSD values for proteoforms quantitation after scFc region analysis as reported in Table 4.

mAbs	Modifications/Glycoforms	%RSD	Relative abundance (%, n=3)
BEV	Unglycosylated	5.3	1.4
	A2G0F	1.9	84.9
	A2G1F	2.7	10.3
	A1G0F	9.2	1.9
	A2G0	2.3	1.5
TRA	A2G0	11.6	4.3
	A2G0F	3.0	52.0
	A2G1F	2.6	36.2
	A1G0F	10.0	1.8
	M5	4.5	1.6
	A2G2F	0.5	4.1
INF	M5	12.4	1.6
	A1G0F	4.3	2.4
	1x C-term lysine, M5	2.1	1.8
	1x C-term lysine, A2G0F	0.9	38.6
	1x C-term lysine, A2G1	7.6	1.4
	1x C-term lysine, A2G0	3.1	3.0
	A2G0F	2.2	30.2
	A2G1F	1.5	10.9
	1x C-term lysine, A2G1F	5.3	10.1
RIT	A2G0F	7.0	44.2
	A2G1F	7.6	48.3
	A2G2F	4.0	7.5

Capítulo 3

Table S10: %RSD values for proteoforms quantitation after peptide mapping analysis as reported in Table 5.

Glycoform	% RSD (n=3)			
	Bevacizumab	Trastuzumab	Infliximab	Rituximab
A1G0	3.0	2.3	4.1	5.9
A1G0F	9.8	9.4	1.7	2.8
A1G0M4	-	-	5.0	-
A1G0M5	-	-	1.2	-
A1G0M5F	-	-	0.4	-
A1G1	-	1.4	-	-
A1G1F	4.0	6.7	0.2	11.9
A1G1M5	-	-	2.4	-
A1G1M5F	-	-	9.0	-
A1S1	-	5.1	-	-
A1S1F	-	2.8	-	1.1
A1S1M5 /A1Sg1M4F	-	-	2.1	-
A1Sg1	-	-	2.2	-
A1Sg1F	-	-	2.4	-
A2G0	3.8	1.7	6.3	3.8
A2G0F 9	0.6	0.6	1.2	0.8
A2G1	-	0.5	3.0	0.8
A2G1F	1.7	2.9	3.9	2.0
A2G2	-	1.9	-	-
A2G2F	0.6	3.1	3.1	2.2
A2S1G0F	-	10.1	-	8.9
A2S1G1F	-	1.8	-	11.1
A2S2F	-	6.7	-	10.1
A3G1F	-	4.5	-	3.3
A2Sg1G0F	-	-	1.1	-
M3	-	17.3	-	-
M4	-	0.5	9.9	-
M5	3.1	2.3	1.0	0.3
M6	-	3.8	2.4	7.1
Unglycosylated	1.2	-	2.9	17.5

Capítulo 3

Table S11: %RSD values for proteoforms quantitation after released N-glycan analysis via HILIC-MS as reported in Table S4.

	%RSD		% abun.		%RSD		% abun.		%RSD		% abun.		%RSD		% abun.	
	2AA	2AB	2AA	2AB	2AA	2AB	2AA	2AB	2AA	2AB	2AA	2AB	2AA	2AB	2AA	2AB
	Bevacizumab (n=3)				Trastuzumab (n=3)				Infliximab (n=3)				Rituximab (n=3)			
M3F	-	-	-	-	-	-	-	-	27.1	-	6.2	-	-	-	-	-
A1G0	70.3	-	0.1	-	56.5	5.8	3.1	0.2	35.6	15.5	1.2	6.4	45.1	-	1.6	-
A1G0F	16.3	13.3	2.0	2.3	4.5	13.9	1.7	2.9	32.1	2.7	3.1	8.2	44.6	15.9	1.3	6.8
A2G0	38.7	18.3	1.8	1.6	6.2	19.0	3.9	4.4	35.5	-	1.6	-	35.3	47.7	1.4	3.8
A1G0M4	-	-	-	-	-	-	-	-	38.0	5.9	0.2	1.0	-	-	-	-
A2G0F	0.6	0.9	83.1	82.2	3.6	0.6	51.0	51.5	1.9	1.4	41.5	44.5	0.7	4.8	47.7	49.0
A1G1F	-	61.7	-	0.6	1.7	18.7	0.6	0.8	77.2	0.6	12.7	3.9	5.7	14.6	0.3	0.4
A2G1	10.0	0.1	-	5.1	16.5	0.8	0.8	-	-	-	-	5.0	7.9	0.3	-	0.3
M5	7.4	11.1	0.1	0.1	9.5	28.9	0.5	3.1	22.6	6.0	1.7	2.3	3.5	6.8	0.3	0.2
A3G0F	-	6.6	-	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A2G1F	1.2	6.8	5.9	5.9	0.2	3.7	24.1	23.1	12.3	2.7	17.2	19.6	5.2	10.7	30.1	26.1
A2G1F	10.2	51.6	5.2	5.2	0.1	7.6	9.6	8.4	18.9	8.3	6.7	4.5	8.3	13.2	11.0	8.2
A1G1M4F/ A1G0M5F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14.1	-	0.9	-	-	-	-
M5F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.6	-	1.3	-	-	-	-
A2G2F	62.0	51.6	1.7	1.7	1.8	11.4	3.7	3.7	27.9	6.4	3.6	3.4	5.3	23.4	5.1	4.9
A1G1M5F	-	-	-	-	-	-	-	-	36.4	10.6	0.7	0.5	-	-	-	-
A1S1F	-	-	-	-	10.6	11.2	0.6	0.9	-	-	-	-	-	-	-	-
A2S1G1F	-	-	-	-	10.5	3.3	0.4	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-
A1Sg1F	-	-	-	-	-	-	-	-	30.0	9.5	1.6	1.0	-	-	-	-
A2Sg1G0F	-	-	-	-	-	-	-	-	53.0	13.3	0.6	1.5	-	-	-	-
A2Sg1'G0F	-	-	-	-	-	-	-	-	24.8	5.7	0.6	0.5	-	-	-	-
A1Sg1M4F	-	-	-	-	-	-	-	-	32.4	5.2	0.4	0.5	-	-	-	-
A2Sg1G1F	-	-	-	-	-	-	-	-	13.0	-	0.4	-	-	-	-	-

Capítulo 3

Table S12: %RSD values for proteoforms quantitation after released N-glycan analysis via HILIC-FLR as reported in Table S5.

	2AA	2AB	2AA	2AB	2AA	2AB	2AA	2AB
	Bevacizumab (n=3)		Trastuzumab (n=3)		Infliximab (n=3)		Rituximab (n=3)	
M3F	-	-	-	-	14.2	-	-	-
A1G0	33.3	-	23.3	12.3	8.6	8.0	68.5	-
A1G0F	17.8	13.3	1.4	10.7	7.1	7.0	14.6	15.1
A2G0	21.7	18.3	7.9	2.4	32.0	-	19.3	14.1
A1G0M4	-	-	-	-	7.0	13.7	-	-
A2G0F	1.5	0.9	1.2	1.4	4.4	4.6	0.2	4.3
A2G1/M5/ A1G1F	19.0	-	0.7	-	-	-	6.2	-
A2G1/A1G1F	-	8.5	-	5.0	3.3	1.7	-	2.8
M5	-	10.5	-	9.7	13.9	8.8	-	17.5
A3G0F	-	15.9	-	-	-	-	-	-
A2G1F	3.4	2.5	1.0	0.4	3.2	1.7	1.5	3.9
A2G1'F	4.3	2.4	0.1	2.3	6.2	1.0	2.8	1.7
A1G1M4F	-	-	-	-	2.0	7.0	-	-
A1G0M5F								
M5F	-	-	-	-	-	7.0	-	-
A2G2F	26.8	6.3	0.0	0.6	6.3	16.3	3.6	10.5
A1G1M5	-	-	-	-	4.6	0.7	-	-
A1S1F	-	-	0.5	1.1	-	-	-	-
A1Sg1F	-	-	-	-	8.6	12.3	-	-
A2S1G1F	-	-	25.7	10.9	-	-	40.1	43.2
A2Sg1G0F	-	-	-	-	15.6	6.0	-	-
A2Sg1'G0F	-	-	-	-	8.7	13.2	-	-
A1Sg1M4F	-	-	-	-	19.5	12.5	-	-
A2Sg1G1F	-	-	-	-	11.6	-	-	-

References

- [1] Z. Elgundi, M. Reslan, E. Cruz, V. Sifniotis, V. Kayser, The state-of-play and future of antibody therapeutics, *Adva Drug Deliv Rev*, 122 (2017) 2-19.
- [2] D.M. Ecker, S.D. Jones, H.L. Levine, The therapeutic monoclonal antibody market, *mAbs*, 7 (2015) 9-14.
- [3] H. Kaplon, J.M. Reichert, Antibodies to watch in 2018, *mAbs*, 10 (2018) 183-203.
- [4] A. Planinc, J. Bones, B. Dejaegher, P. Van Antwerpen, C. Delporte, Glycan characterization of biopharmaceuticals: Updates and perspectives, *Analytica chimica acta*, 921 (2016) 13-27.
- [5] J.Y. Kim, Y.-G. Kim, G.M. Lee, CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential, *Appl. Microbiol. and Biotechnol.*, 93 (2012) 917-930.
- [6] P. Hossler, S.F. Khattak, Z.J. Li, Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture, *Glycobiology*, 19 (2009) 936-949.
- [7] L. Liu, Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins, *J. of pharma. Sci.* 104 (2015) 1866-1884.
- [8] F. Higel, A. Seidl, F. Sorgel, et al., N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 100 (2016) 94-100.
- [9] K. Zheng, C. Bantog, R. Bayer, The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability, *mAbs*, 3 (2011) 568-576.
- [10] S. Matsumiya, Y. Yamaguchi, J. Saito, M. Nagano, H. Sasakawa, S. Otaki, M. Satoh, K. Shitara, K. Kato, Structural comparison of fucosylated and nonfucosylated Fc fragments of human immunoglobulin G1, *Journal of molecular biology*, 368 (2007) 767-779.
- [11] R. Upton, L. Bell, C. Guy, P. Caldwell, S. Estdale, P.E. Barran, D. Firth, Orthogonal Assessment of Biotherapeutic Glycosylation: A Case Study Correlating N-glycan Core a Afucosylation of Herceptin with Mechanism of Action, *Anal. Chem.*, 88 (2016) 10259-10265.
- [12] Y. Kaneko, F. Nimmerjahn, J.V. Ravetch, Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation, *Science*, 313 (2006) 670-673.
- [13] A. Epp, J. Hobusch, Y.C. Bartsch, et al., Sialylation of IgG antibodies inhibits IgG-mediated allergic reactions, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 141 (2018) 399-402 e398.
- [14] T.S. Raju, R.E. Jordan, Galactosylation variations in marketed therapeutic antibodies, *mAbs*, 4 (2012) 385-391.
- [15] M. Thomann, K. Reckermann, D. Reusch, J. Prasser, M.L. Tejada, Fc-galactosylation modulates antibody-dependent cellular cytotoxicity of therapeutic antibodies, *Mol. Immunol.*, 73 (2016) 69-75.
- [16] C.M. Karsten, M.K. Pandey, J. Figge, et al., Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1, *Nat. Med.*, 18 (2012) 1401-1406
- [17] T.A. Bowden, K. Baruah, C.H. Coles, D.J. Harvey, X. Yu, B.D. Song, D.I. Stuart, A.R. Aricescu, C.N. Scanlan, E.Y. Jones, M. Crispin, Chemical and structural analysis of an antibody folding intermediate trapped during glycan biosynthesis, *Journal of the J. Am. Chem. Soc.*, 134 (2012) 17554-17563.
- [18] A.M. Goetze, Y.D. Liu, Z. Zhang, B. Shah, E. Lee, P.V. Bondarenko, G.C. Flynn, High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies increase serum clearance in humans, *Glycobiology*, 21 (2011) 949-959.

- [19] Y.D. Liu, G.C. Flynn, Effect of high mannose glycan pairing on IgG antibody clearance, *Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization*, 44 (2016) 163-169.
- [20] S. Sha, C. Agarabi, K. Brorson, D.Y. Lee, S. Yoon, N-Glycosylation Design and Control of Therapeutic Monoclonal Antibodies, *Trends in biotechnol.*, 34 (2016) 835-846.
- [21] B.L. Duivelshof, W. Jiskoot, A. Beck, et al., Glycosylation of biosimilars: Recent advances in analytical characterization and clinical implications, *Anal. Chim. Acta*, (2019).
- [22] A. Beck, E. Wagner-Rousset, D. Ayoub, et al., Characterization of Therapeutic Antibodies and Related Products, *Anal. Chem.*, 85 (2013) 715-736.
- [23] X. Yang, M.G. Bartlett, Glycan analysis for protein therapeutics, *J. of Chrom. B*, 1120 (2019) 29-40.
- [24] P. Liu, X. Zhu, W. Wu, et al., Subunit mass analysis for monitoring multiple attributes of monoclonal antibodies, *Rapid Commun. in Mass Spectrom.*, 33(2019) 31-40.
- [25] E. Largy, F. Cantais, G. Van Vyncht, et al., Orthogonal liquid chromatography-massspectrometry methods for the comprehensive characterization of therapeutic glycoproteins, from released glycans to intact protein level, *J. Chrom. A*, 1498 (2017) 128-146
- [26] T. Wohlschlager, K. Scheffler, I.C. Forstenlehner, et al., Native mass spectrometry combined with enzymatic dissection unravels glycoform heterogeneity of biopharmaceuticals, *Nat. Commun.*, 9 (2018) 1713.
- [27] V. D'Atri, L. Nováková, S. Fekete, et al., Orthogonal middle-up approaches for characterization of the glycan heterogeneity of etanercept by hydrophilic interaction chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 91 (2019) 873-880
- [28] D. Reusch, M. Haberberger, D. Falck, et al., Comparison of methods for the analysis of therapeutic immunoglobulin G Fc-glycosylation profiles-Part 2: Mass spectrometric methods, *MAbs*, 7 (2015) 732-742.
- [29] D. Reusch, M. Haberberger, B. Maier, et al., Comparison of methods for the analysis of therapeutic immunoglobulin G Fc-glycosylation profiles--part 1: separation-based methods, *MAbs*, 7 (2015) 167-179.
- [30] S. Carillo, S. Mittermayr, A. Farrell, et al., Glycosylation analysis of therapeutic glycoproteins produced in CHO cells, in: P. Meleady (Ed.) *Heterologous Protein Production in CHO Cells: Methods and Protocols*, Springer New York, New York, NY, 2017, pp. 227- 241.
- [31] M. Tassi, J. De Vos, S. Chatterjee, et al., Advances in native high-performance liquid chromatography and intact mass spectrometry for the characterization of biopharmaceutical products, *J. Sep. Sci.*, 41 (2018) 125-144.
- [32] A. Farrell, S. Carillo, K. Scheffler, et al., Monoclonal antibody sequence assessment using a hybrid quadrupole-Orbitrap mass spectrometer, *Anal. Methods*, 10 (2018) 3100- 3109.
- [33] R.S. Rogers, M. Abernathy, D.D. Richardson, et al., A view on the importance of "Multi-Attribute Method" for measuring purity of biopharmaceuticals and improving overall control strategy, *The AAPS Journal*, 20 (2017) 7.
- [34] S. Iida, R. Kuni-Kamochi, K. Mori, et al., Two mechanisms of the enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) efficacy of non-fucosylated therapeutic antibodies in human blood, *BMC Cancer*, 9 (2009) 58.
- [35] T.T. Wang, IgG Fc glycosylation in human immunity, in: J.V. Ravetch, F. Nimmerjah (Eds.) *Fc Mediated Activity of Antibodies: Structural and Functional Diversity*, Springer International Publishing, Cham, 2019, pp. 63-75.

- [36] M.L.A. De Leoz, D.L. Duewer, A. Fung, et al., NIST interlaboratory study on glycosylation analysis of monoclonal antibodies: comparison of results from diverse analytical methods, *Mol. Cell. Proteom.*, (2019) In press, <https://doi.org/10.1074/mcp.RA119.001677>.

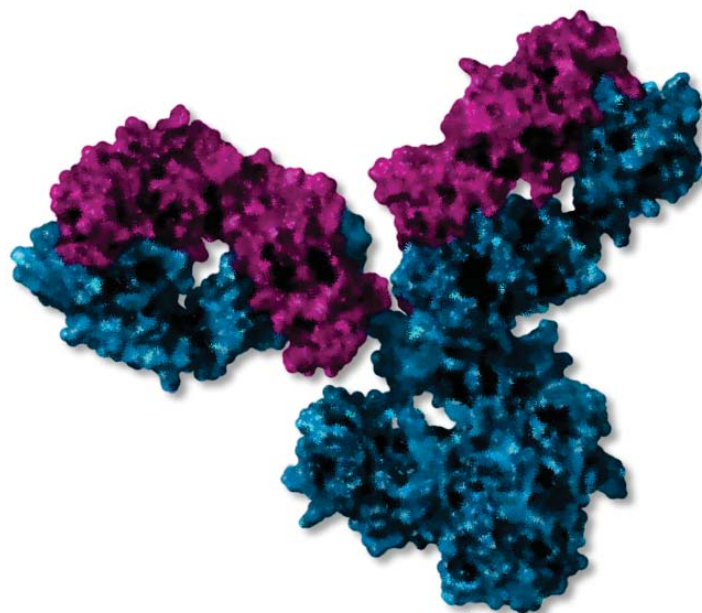
3.3. Conclusiones

En este capítulo se han estudiado varios dominios de análisis para la determinación del perfil de N-glicosilación mediante espectrometría de masas y haciendo uso de la cromatografía de líquidos de ultra altas prestaciones. Se puede concluir que cualquiera de los métodos usados es idóneo para el análisis de N-glicanos en mAb ya que con todos se pueden detectar numerosas isoformas. Este trabajo constituye una guía para la elección del mejor procedimiento en las determinaciones de N-glicanos en mAb, ya que se reúnen los resultados de diversos métodos de forma comparativa en un mismo trabajo.

Varios son los factores que pueden influir en la elección de un método de análisis u otro, en este trabajo se han discutido varios de ellos: (i) el tiempo de análisis desde el tratamiento de muestra hasta la obtención de los datos; (ii) la profundidad en la identificación estructural; (iii) la calidad de los datos; (iv) la exactitud y robustez de los resultados; (v) la sensibilidad de la técnica; (vi) la cantidad de muestra requerida; y (vii) experiencia del operador para realizar el análisis. En función del factor que se desee optimizar será más conveniente el uso de una metodología u otra.

El análisis intacto o de subunidades requiere muy poco tratamiento de datos, haciéndolo ideal para el análisis de rutina, sin embargo la información es limitada por la obtención de las glicoformas más abundantes y no se puede obtener detalles de la estructura. Otro de los problemas que presenta es la ambigüedad en la detección de isómeros de glicanos cuando se analizan las dos cadenas pesadas al mismo tiempo. En el caso de que haya numerosas modificaciones postraduccionales que pueden complicar el espectro de masas, es recomendable el análisis de las subunidades para así poder simplificar y obtener buena resolución en el espectro de masas.

El mapeo peptídico y el análisis de los N-glicanos liberados requieren un mayor tiempo de preparación de muestra y de análisis. Estos métodos son menos robustos ya que se necesitan numerosos pasos para el tratamiento de muestra, se requiere que el analista tenga una mayor experiencia para el análisis de datos. Por otro lado son las técnicas que mayor detalle aportan en el análisis de los N-glicanos.



CAPÍTULO 4

**Charge variant analysis of Ziv-aflibercept by
cationic exchange liquid chromatography:
comparison between volatile and non-volatile
salts in the mobile phase**

4.1. Introducción al capítulo 4

En este capítulo se exponen los resultados obtenidos en el análisis de las variantes de carga de la proteína de fusión ziv-aflibercept (ziv-AFL) mediante cromatografía de líquidos de intercambio catiónico con el empleo de sales volátiles y no volátiles en las fases móviles, es decir, con acoplamiento y sin acoplamiento a detección de masas.

En este capítulo se presenta el trabajo recogido en el artículo científico enviado para su publicación en la revista Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Es un trabajo enviado por invitación de la revista para su número especial sobre “Biopharmaceuticals”:

- ➔ R. Pérez-Robles, L. Cuadros-Rodríguez, A. Salmerón-García, J. Cabeza-Barrera, N. Navas. Charge variant analysis of Ziv-aflibercept by cationic exchange liquid chromatography: comparison between volatile and non-volatile salts in the mobile phase, Enviado a Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis el 8 de noviembre de 2019. En revisión.

Las proteínas de fusión, al igual que los mAb, son moléculas complejas y muy heterogéneas. Esta heterogeneidad viene dada por las PTM que generalmente ocurren durante el proceso de síntesis de estos biofármacos. Estas PTM deben de ser controladas para asegurar la óptima calidad del fármaco, ya que pueden producir cambios en la funcionalidad del mismo. Determinadas PTM como la truncación de las lisinas terminales, la formación de piroglutamato, la sialización presente en el patrón de glicosilación y la deamidación de la asparagina o glutamina, dan lugar a cambios en las cargas superficiales (y por lo tanto en el punto isoeléctrico) de la molécula, lo cual conlleva a la modificación de las diferentes variantes de carga (ácidas y básicas).

Los perfiles de las variantes de carga en un mAb han sido tradicionalmente obtenidos mediante cromatografía de líquidos de intercambio catiónico. Este tipo de cromatografía se basa en la separación de variantes de carga en función de su carga eléctrica neta. La fase estacionaria muestra en su superficie grupos funcionales aniónicos que interactúan con grupos funcionales catiónicos del analito. Las moléculas cargadas positivamente se unen a la fase estacionaria de forma reversible, de modo que dichas moléculas pueden ser asociadas o disociadas cambiando el ambiente iónico. La separación se realiza por lo general, en dos etapas: en la primera, las sustancias a separar se unen a la fase estacionaria utilizando condiciones que originan una unión fuerte; a continuación, para la elución en el caso de las proteínas complejas, se emplea o bien un gradiente de fuerza iónica o un gradiente de pH o una combinación de ambos.

Tradicionalmente en cromatografía de intercambio catiónico se han usado sales no volátiles en las fases móviles para la separación de las variantes de carga, este hecho ha impedido el acoplamiento directo a detección mediante espectrometría de masas. Muy recientemente se han desarrollado métodos que usan sales volátiles en las fases móviles de manera que permiten dicho acoplamiento, con la consiguiente ventaja de poder analizar la masa de las diferentes variantes de carga. No obstante, presentan dificultades de aplicación en proteínas complejas.

En este trabajo se ha llevado a cabo la separación de las variantes de carga de la proteína de fusión ziv-AFL mediante cromatografía de intercambio catiónico. Se ha realizado un estudio comparativo para determinar el método más adecuado para la detección de cambios y modificaciones en las variantes de carga: con el empleo de fases móviles volátiles (método LC-UV-MS) o con el empleo de fases móviles no volátiles (método LC-UV). Se ha aplicado diseño de experimentos para ajustar las condiciones cromatográficas del primer método publicado (2018) de cromatografía de intercambio catiónico acoplado a espectrometría de masas -desarrollado por otros autores- en el que se usan sales volátiles en las fases móviles. Por otro lado se ha desarrollado y optimizado un segundo método de cromatografía de intercambio catiónico en el que se usan sales no volátiles clásicas. Paralelamente, se ha llevado a cabo un estudio de degradación controlada de ziv-AFL, sometiendo muestras de medicamento a condiciones tales como aumento de temperatura, exposición a luz visible, y a ciclos de congelación/descongelación, con el objetivo de evaluar la capacidad de separación de las variantes de carga de los métodos estudiados, así como para conocer el comportamiento de esta importante proteína de fusión cuando se manipula fuera de sus condiciones recomendadas por el fabricante.

4.2. Recursos

En este apartado se detallan los recursos usados para la realización del trabajo que se recoge en este capítulo, tanto disolventes y reactivos, instrumentación y muestras usadas.

4.2.1. Disolventes y reactivos

Los disolventes empleados son de pureza LC-MS. En la Tabla 4.1 se recogen todos los disolventes y reactivos empleados.

Tabla 4.1. Disolventes y reactivos usados.

Disolventes y reactivos	Casa comercial
Agua de ósmosis inversa, purificada con una estación Milli-RO Milli-Q	Merck Millipore (Darmstadt, Alemania)
Ácido acético ($\geq 99.7\%$)	Panreac (Barcelona, España)
Hidrógeno fosfato de sodio anhidro	Panreac (Barcelona, España)
Hidróxido sódico	Sigma Aldrich (Saint Louis, EE.UU)
Bicarbonato amónico ($\geq 99.5\%$)	Sigma Aldrich (Saint Louis, EE.UU)
Hidrógeno fosfato de sodio monohidratado	Sigma Aldrich (Saint Louis, EE.UU)
Ácido morfolinetanosulfónico (MES)	Sigma Aldrich (Saint Louis, EE.UU)
Cloruro sódico	Labkem (Barcelona, España)

4.2.2. Muestras

Todas las muestras del medicamento Zaltrap[®] (ziv-AFL) utilizadas en este trabajo han sido cedidas por el Servicio de Farmacia Hospitalaria del Hospital Universitario San Cecilio (Granada, España). Estas muestras se recogen justo después del momento de apertura del medicamento y/o preparación, para ser empleadas en los correspondientes estudios experimentales siempre dentro del periodo de caducidad establecido por el fabricante. Las muestras suministradas de ziv-AFL en su medicamento original Zaltrap[®] (25mg/ml).

4.2.3. Instrumentación analítica

Se ha hecho uso de la plataforma analítica que se detalla en el capítulo 2.

Se ha usado una columna de intercambio catiónico fuerte MabPac SCX-10 RS (2.1 mm × 5 mm column, 5µm particles) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Charge variant analysis of Ziv-aflibercept by cationic exchange liquid chromatography: comparison between volatile and non-volatile salts in the mobile phase

Raquel Pérez-Robles ^a, Luis Cuadros-Rodríguez ^a, Antonio Salmerón-García ^b, José Cabeza-Barrera^b, Natalia Navas ^{a,*}

^a Department of Analytical Chemistry / Biohealth Research Institute (ibs.GRANADA), University of Granada, E-18071 Granada, Spain.

^b Department of Clinical Pharmacy, San Cecilio University Hospital, Institute for Biomedical Research, (ibs.GRANADA) 18016 Granada, Spain

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

Submitted: 8 October 2019 to be considered for publication for the special issue on “Biopharmaceuticals”. Under revision.

Manuscript Details

Manuscript number	JPBA_2019_2565
Title	Charge variant analysis of ziv-aflibercept by cationic exchange liquid chromatography: comparison between volatile and non-volatile salts in the mobile phase
Article type	Full length article

Abstract

Ziv-aflibercept (ziv-AFL) is a complex fusion protein which is widely used in hospitals for the treatment of colorectal metastatic cancer. Charge variants are critical attributes for assessing post-translational modifications (PMTs) that have to be controlled during the development and manufacture of these proteins and until their administration to patients. Cation ion exchange chromatography (CXC) is a charge-sensitive analytical method that is well suited for analysing charge variants in proteins. The aim of this paper is to analyse the charge variants of ziv-AFL in the medicine (Zaltrap®) when fresh and when degraded. Two CXC methods were compared for this purpose. The former was an adaptation of the method used in the first published study in which charge variants were analysed via pH gradient elution using volatile, low ionic strength buffers with direct coupling to high-resolution Orbitrap mass spectrometry. The second method was developed and optimized during our research using the salt-mediated pH gradient mode and classical non-volatile, high ionic strength buffers which were incompatible with direct coupling with mass detection. Fresh and controlled degraded samples were used to evaluate the capacity of both CXC strategies for detecting charge variants in ziv-AFL. In the controlled degradation study the samples of the medicine were subjected to three stress factors: a temperature of 60°C for three hours, a freeze/thaw process -two cycles-, and exposure to light for twelve hours. CXC with non-volatile salts in the mobile phase enabled better detection of charge variants in both fresh and degraded ziv-AFL samples than the method using volatile salts with lower ionic strength. In addition, the complexity of the mass spectra data generated made it impossible to identify the multicharge variant species of ziv-AFL. Our results indicate that the CXC method with non-volatile salts in the mobile phase could be used to characterize and track changes in the charge variant profile of ziv-AFL in fresh samples of the medicine Zaltrap®, even though it cannot be coupled to a mass detector and there is therefore no information about mass. Basic charge variants were the most important degradation pattern in ziv-AFL (Zaltrap®).

Keywords

Biodrugs analysis, Ion exchange chromatography, Isoforms, Stress study, Fusion protein, Aflibercept.

Introduction

Fc-fusion proteins are homodimers in which an Fc domain of an antibody is covalently linked to a particular protein [1]. Although the top-selling biotherapeutics are monoclonal antibodies (mAbs), therapeutic Fc-fusion proteins are also increasingly used in current medical practice [2]. One of these proteins is aflibercept (AFL), which consists of the Fc portion of human immunoglobulin IgG1 and the extracellular domains of vascular endothelial growth factor receptors (VEGFR-2 and VEGFR-1). AFL binds to circulating vascular endothelial growth factor (VEGF), thus acting as a decoy receptor [3]. The formulation of AFL varies depending on the disease to be treated, i.e. for the treatment of macular degeneration (AFL, Eylea®, Bayer Healthcare, Leverkusen, Germany) or for the treatment of metastatic colorectal carcinoma resistant to an oxiplatin-containing regimen (ziv-AFL, Zaltrap®, Sanofi-Aventis US, LLC, Bridgewater, New Jersey, USA). AFL and ziv-AFL are manufactured by the same company (Regeneron, Tarrytown, New York, USA). AFL, also known as VEGF TRAP, is a dimeric glycoprotein with a protein molecular weight of 97 kDa and with glycosylation representing 15 % of the total molecular mass, resulting in a molecular weight of 115 kDa [4]. This high level of glycosylation, which is higher than in mAbs, makes the already complex analytical characterization of this therapeutic protein even more difficult.

Several different critical attributes have to be controlled during the development, manufacturing and administration to patients of therapeutic proteins (mAbs and fusion proteins). One of the most important is charge variant analysis, which allows us to assess post-translational modifications (PMTs) in glycosylation, deamidation and oxidation amongst others. These PMTs can alter the isoelectric pH (pI) values, with the resulting changes in the stability and biological activity of the drug [5]. Cation exchange chromatography (CXC) is the gold standard method for charge variant analysis in therapeutic proteins since the parameters it uses are strongly associated with the individual characteristics of the protein, as ion exchange is dependent on the reversible adsorption of the charged protein molecules to immobilized ion exchange groups [6]. The result of the analysis is a chromatographic charge variant profile that characterizes the charge stages of the protein. Charge variants in mAbs have been extensively studied [7,8,9,10] by CXC. Nevertheless, to the best of our knowledge few studies of Fc-fusion proteins have been published [11], and no studies of either AFL or ziv-AFL were found in the bibliography we consulted.

CXC can be run in three different separation modes, i.e. salt gradient, pH gradient, or a combination of the previous two known as salt-mediated pH gradient. Two interesting papers have recently been published which focus on improving selectivity in CXC for mAbs analysis by checking different buffer systems [12] and new stationary phases [13]. Salt-mediated pH gradients achieved the best results highlighting that efficacy depends significantly on the salt concentration in the mobile phase [12], while the retention, efficiency and selectivity of the different columns studied were strongly dependent on the elution mode (i.e. salt gradient, pH gradient or combined salt/pH gradient mode) [13]. Although the use of volatile salts was not the main objective of these two studies, the best results were obtained when non-volatile salts such as NaCl were used.

The limitation of the standard form of CXC is that it requires high ionic strength, which prevents direct coupling of the mobile phase to a mass spectrometer detector. When CXC-separated fraction samples were collected and analysed by reverse phase (RP) LC/MS, mass spectra were recorded but proved too complex to be useful [14]. The complex mass spectra obtained are probably due to the loss of the tertiary structure of the protein that occurs when further analysed by RP chromatographic (RPC) mode. To avoid this denaturalization of the protein, recent researchers have proposed using CXC with volatile salts in the mobile phase [15,16,17,18]. This approach has the great advantage of allowing direct coupling to the MS detector so enabling the analysis to be performed on the native stage of the protein (or mAb). In this way the tertiary structure is conserved so enabling the MS to observe the charge states on the surface of the protein in solution; although more research is required to enhance the sensitivity of this approach, it has already proved very useful for charge variant analysis in mAbs.

In this research, charge variant analysis of ziv-AFL (Zaltrap®) was performed by strong CXC. A comparative study was conducted of two methods: a) LC-UV-MS using volatile salts in the mobile phase and b) LC-UV using non-volatile salts in the mobile phase. The aim of this study was to determine which method was most suitable for detecting charge variants in the protein as and when they occur. With this in mind, a controlled degradation study was conducted as part of the development of the method. Degradation factors were also applied in order to evaluate the impact of mishandling of this medicine (for example in hospital) on the CXC charge variant profile of this complex Fc-fusion protein.

Materials and methods

Chemical and reagents

Reverse-osmosis-quality water was purified with a Milli-Q station from Merck Millipore (Darmstadt, Germany). Acetic acid ($\geq 99.7\%$) and disodium hydrogen phosphate anhydrous (for molecular biology) were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Ammonium hydroxide solution (Bioultra, 1M in water), ammonium bicarbonate (Bioultra, $\geq 99.5\%$) and sodium phosphate monobasic monohydrate (4-morpholineethanesulfonic acid (MES hydrate) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO). Sodium chloride was obtained from Labkem (Barcelona, Spain).

Ziv-AFL samples

Zaltrap® (Sanofi-Aventis, US, LLC, Bridgewater, New Jersey, USA and Regeneron Pharmaceuticals, Inc, Tarrytown, New York, USA) is the trade name of ziv-AFL, a medicine which is presented as a solution in water for injection containing 25 mg/mL. The resulting medicine solutions were kindly supplied by the Pharmacy Unit of the San Cecilio University Hospital (Granada, Spain) and used throughout this study. Medicine samples were diluted when necessary.

Strong cation exchange (SCX)/UHPLC-UV-(HESI/orbitrap)-MS charge variant analysis with volatile salts

The method was performed using a proper analytical platform (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Chromatographic separation was carried out using a Dionex UltiMate 3000 chromatograph (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), equipped with two ternary bombs, a degasser, an autosampler, a thermostatted column compartment, and a multiple-wavelength detector (MWD-3000Vis-UV detector). The chromatograph was coupled in line to a Q-Exactive Plus mass spectrometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The ionization was performed using a heated electrospray ionization (HESI) source.

The column used for the separation was a MabPac SCX-10 RS 2.1 mm X 5 mm column, 5 μ m particles (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The flow rate was 0.3 ml /min and 1 μ L of sample (25 mg/mL) was injected into the column for the analysis. The eluent system consists of 25 mM ammonium bicarbonate in 30 mM acetic acid at pH 5.0 as buffer A and 10

mM ammonium hydroxide in 2 mM acetic acid at pH 10.1 as buffer B. The binary gradient was performed in the following conditions: the column was equilibrated with 40% of buffer B for 6 min. The percentage of buffer B was increased slightly from 40% to 45% in 0.5 min, and then a linear gradient was applied from 45% to 65% in 13.5 min. This was followed by a further increase in buffer B to 100% in 3 min with 2 min of isocratic hold. Initial conditions were restored in 2 min. The total analysis run time was therefore 21 min. The column temperature was maintained at 25°C. The mass spectrometer was operated in positive ion mode with full MS scans ranging from 2500 to 6000 m/z with a resolution setting of 17500. MS instrumental parameters were as follows: spray voltage 3.6 kV, sheath gas flow rate 20 AU, auxiliary gas flow rate 5 AU, capillary temperature 275°C, in-source CID 10 EV, AGC target value 3×10^6 , S-Lens RF Level 100, max injection time 200ms and number of microscans 10.

SCX/(UHPLC-UV) charge variant analysis with non-volatile salts

The analysis was performed by liquid chromatography using the same chromatograph described above.

The chromatographic separation was carried out in a MabPac SCX-10 RS 2.1 mm \times 5 mm column, 5 μ m particles (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The column temperature was 30°C. The flow rate was 0.4 ml/min and 1 μ l of *ziv*-AFL was injected into the column. The eluent system was composed of 10 mM of Na_2HPO_4 at pH 5.0 (mobile phase A) and 10 mM of Na_2HPO_4 and 300 mM of NaCl at pH 10.0 (mobile phase B). The column was equilibrated with 10% of mobile phase B for 9 min. A linear gradient was applied when the percentage of mobile phase B was increased from 10% to 40% in 15 min. The percentage of mobile phase B was then increased again to 100% in 1 min and was then maintained for 4 min. The initial conditions were restored in 1 min. The UV chromatograms were registered at 214 nm, using 360 ± 10 nm as the reference wavelength.

Table 1 shows the chromatographic conditions used in both methods (volatile salt and non-volatile salts).

Table 1. Chromatographic parameters of the two methods used in the analysis of ziv-AFL (volatile and non-volatile salts used in the composition of the mobile phases).

	<i>SCX/UHPLC-UV-(HESI/orbitrap)MS method with volatile salts</i>	<i>SCX/UHPLC-UV method with non-volatile salts</i>
Cation exchange mode	pH gradient elution	Salt-mediated pH gradient mode
Column	MabPac SCX-10 RS 2.1 mm X 5 mm column, 5 µm particles. (Thermo Fisher Scientific)	MabPac SCX-10 RS 2.1 mm X 5 mm column, 5 µm particles. (Thermo Fisher Scientific)
Temperature column	25°C	30°C
Flow rate	0.3 ml/min	0.4 ml/min
Eluent system	Mobile phase A: 25 mM ammonium bicarbonate in 30 mM acetic acid at pH 5.0 Mobile phase B: 10 mM ammonium hydroxide in 2 mM acetic acid at pH 10.1	Mobile phase: A:10 mM of Na ₂ HPO ₄ at pH 5.0 Mobile phase B: 10 mM of Na ₂ HPO ₄ and 300 mM of NaCl at pH 10.0
Gradient	Linear gradient from 10% to 40 % of mobile phase B for 15 min	Linear gradient from 10% to 40 % of mobile phase B for 15 min

Forced degradation studies

Forced degradation studies were performed on the medicine Zaltrap® (25 mg/ml). Aliquots of 200 µl of the medicine were placed in 2 ml dark glass vials and then subjected to different physical stresses: a temperature of 60°C for 3 hours (Thermomixer, Eppendorff), light irradiation (250 W/m²) in an aging chamber for 12 hours (Solarbox 3000e RH, Cofomegra) and two freeze-thaw cycles (-18°C to ambient temperature).

All the samples (fresh and stressed) were analysed undiluted, i.e. in ziv-AFL medicine format (25 mg/mL). This was to make sure that the protein conditions were the same as in the medicine and were not altered by dilution.

Results and discussion

SCX/UHPLC-UV-(HESI/Orbitrap)MS with the volatile salts method

In our first attempt to study charge variant in ziv-AFL medicine, an LC-MS method was used to identify the particular isoforms by their mass. A method using volatile salts in the mobile phase (low ionic strength method) was required to enable the chromatographic system to be coupled directly to the mass detector. For our study we selected the first published method that met this condition. This method was originally proposed for the analysis of marketed therapeutic mAbs and used a pH gradient CXC that was directly coupled to high-resolution native MS [15]. In this method a low capacity column (MAbPac SCX-10 RS column with 5 μm particle size and small dimensions) was used to prevent the column itself from buffering against the changes that might take place in pH during pH gradient elution, since the volatile salts have a much lower buffer capacity than non-volatile salts. A linear pH-gradient was applied from 40% to 50% of mobile phase B, using a system composed of 25 mM ammonium bicarbonate and 30 mM acetic acid as the buffer in mobile phase A (pH 5.3) and of 10 mM ammonium hydroxide in 2 mM acetic acid as the buffer in mobile phase B (pH 10.18). All the conditions checked for the analysis of ziv-AFL, chromatographic separations and mass detector parameters were the same, except for the flow of the mobile phase which was changed to 0.3 mL/min instead of 0.4 mL/min, as 0.3 ml/min was the maximum flow allowed by the technical specification of the mass spectrometer detector used in the present study. The resulting chromatogram showed a single wider chromatographic peak with no clear mass spectra, which prevented us from applying deconvolution; this made it impossible to obtain the specific mass analysis of the ziv-AFL charge variants (Fig. 1 A). As indicated in the introduction section, Ziv-AFL is a high glycosylated fusion protein (15% of the total mass [4]) with a probable high proportion of sialic acid. This produces numerous states of charge which complicate the mass spectra. In fact, the patent indicated 5 N-glycosylated sites [19]. The next step involved the optimization of these chromatographic parameters, particularly for the separation of the charge variants of ziv-AFL, in order to produce clearer mass spectra that could be correctly deconvoluted. Statistical design of experiments (DoE) was applied for this purpose. The signal recorded by the UV detector was used since the signal from the mass detector was not clear.

The selected design was a fractional factorial two-level design (2^{5-2}) for five factors of chromatographic variables. The following chromatographic variables were selected: the temperature of the column ($^{\circ}\text{C}$), the gradient of the mobile phase expressed as the slope of

the ramp (in % min), the initial percentage of buffer B in the mobile phase (in %), the flow rate (in ml/min) and the concentration of the buffers in the mobile phases (mM). It is important to highlight that the ionic strength, which is closely associated with separation in CXC, is defined in this case by two of these five factors (variables), i.e. the initial percentage of buffer B in the mobile phase and the concentration of the two buffers. The experimental domain is detailed in Table 2. The central values of the studied factors were those used in the reference method [15], except for the concentration of the buffers in the mobile phase in which higher buffer concentrations were used in order to maintain the minimum level of ionic strength indicated in the technical specifications of the column [20]. In all the experiments, the pH window set by the pH of buffers A and B was between 5.0 and 10.1 and therefore included the isoelectric point (pI) of ziv-AFL, i.e. 8.2 [21]. The experimental matrix was composed of 8 experimental runs plus 3 central points, making a total of 11 chromatographic runs for the whole experimental study. The response used was the full width at half maximum (FWHM); the retention time of the peaks was not considered since the objective of this optimization was to obtain charge variants separated in a wide chromatographic peak (or ideally in two or more separate peaks) in order to obtain mass spectra with fewer signals that could be deconvoluted properly.

Table 2. The chromatographic factors and corresponding level settings in 2⁵⁻² design.

Level	Column temperature (°C)	Gradient (%/min)	Initial percentage of buffer B (%)	Flow rate (ml/min)	Conc. of buffer (mM)	
					A: NH ₄ HCO ₃ /CH ₃ COOH;	B: NH ₃ /CH ₃ COOH
-1	25	0.6	65	0.1	25/30; 10/2	
0	30	1.0	75	0.2	37.5/45; 15/3	
+1	35	1.4	85	0.3	50/60; 20/4	

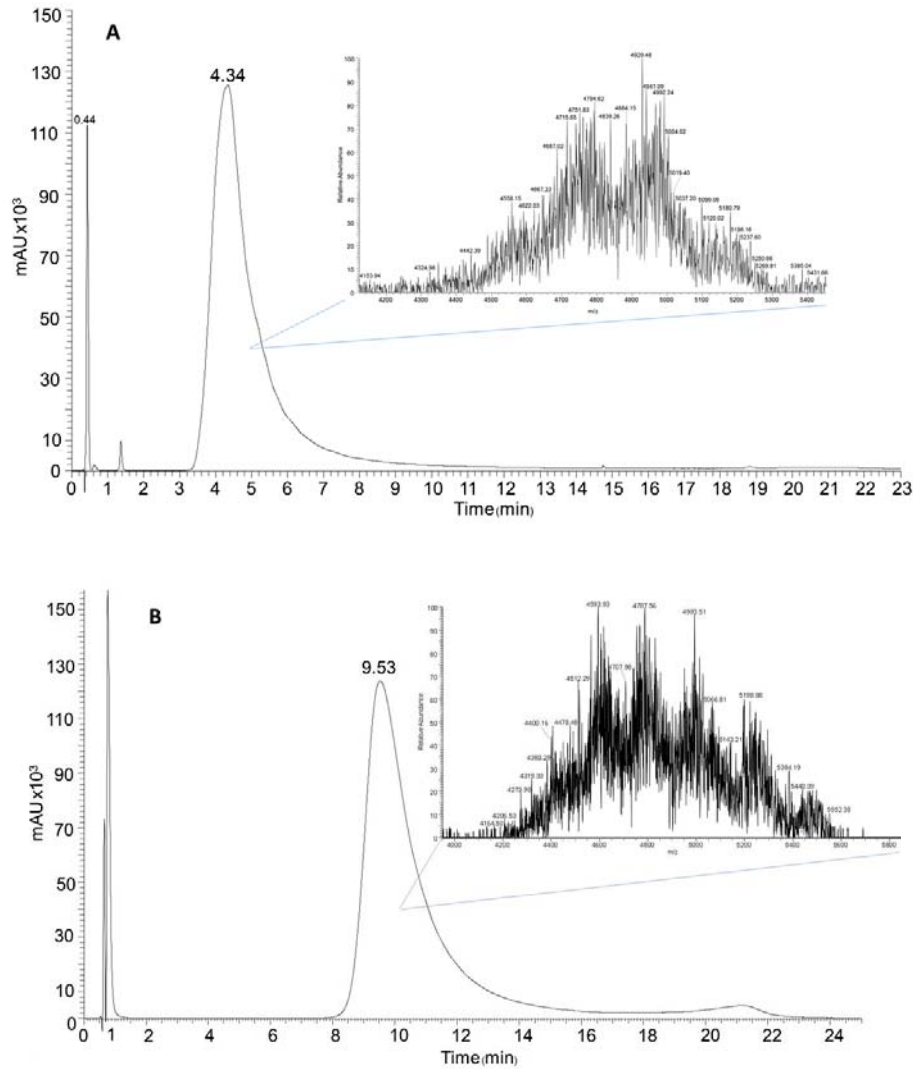


Figure 1: Representative SCX/UHPLC-UV-(HESI/Orbitrap)MS chromatograms of ziv-AFL using volatile salts in the mobile phases. A) UV chromatogram and mass spectra recorded with the method developed in [15]; B) UV chromatogram and mass spectra recorded with the method optimized here by statistical design of experiment.

The DoE results, obtained through the analysis of variance (ANOVA) of each factor, indicated that the significant factors were temperature (P-value = 0.026), flow (P-value = 0.145) and buffer composition (P-value = 0.023). The slope of the ramp (P-value = 0.422) and the initial percentage of buffer B (P-value = 0.599) were not significant, which meant that any value (within the domain) could be assigned to obtain the optimal conditions. Based on the P-value of the ANOVA analysis, these conditions were: flow rate 0.3 ml/min, temperature 25°C,

slope of the ramp 1.4%/min, initial percentage of buffer B 65% and the concentration of buffer A: 25 mM NH_4HCO_3 /30 mM CH_3COOH and buffer B 10 mM NH_3 /2 mM of CH_3COOH . These results were similar to those already optimized in the reference method [15], except for the initial percentage of buffer B. There was no reference value for the slope of the ramp applied in the mobile phase because different slopes were used in the reference method for analysing the different mAbs. Fig. 1 B shows the chromatogram obtained with these optimized experimental conditions, from which it is clear that this intact approach failed to separate the charge variants, since the only chromatographic peak obtained corresponded to multicharge variant species which complicated interpretation of the mass spectra.

Controlled degradation study: charge variant chromatographic profiles obtained from SCX/UHPLC-UV-(HESI/Orbitrap)MS using the volatile salts method

Although no charge variants were clearly separated and no clear mass spectra were obtained in the analysis of intact ziv-AFL using CXC with volatile salts, it was decided to check the optimized SCX/UHPLC-UV-(HESI/Orbitrap)MS method for the analyses of the medicine samples submitted to stress. The aim was to evaluate whether new charge variants produced by stress-related degradation could be chromatographically separated and detected using mass spectrometry. Chromatograms registered by the UV signal of ziv-AFL medicine exposed to heat (60°C during 3 hours), light stress (12 hours) and F/T cycles (2 cycles) are shown in Fig. 2 B, C and D respectively. The chromatogram for the fresh (control) ziv-AFL medicine samples is shown in Fig. 2 A so as to compare the chromatographic profiles. Although new chromatographic peaks were detected when the samples were subjected to 60°C heat for three hours, mass spectra were still unclear and no information about the charge variant could be obtained. The area under the peak remained constant except in the samples subjected to heat stress. The peak at 21.20 min corresponded to changes in the mobile phases given that the blank samples had similar profiles. These results suggest that, with the exception of heat stress, these stress factors did not induce any changes in the charge variant profile, a finding that is highly unlikely.

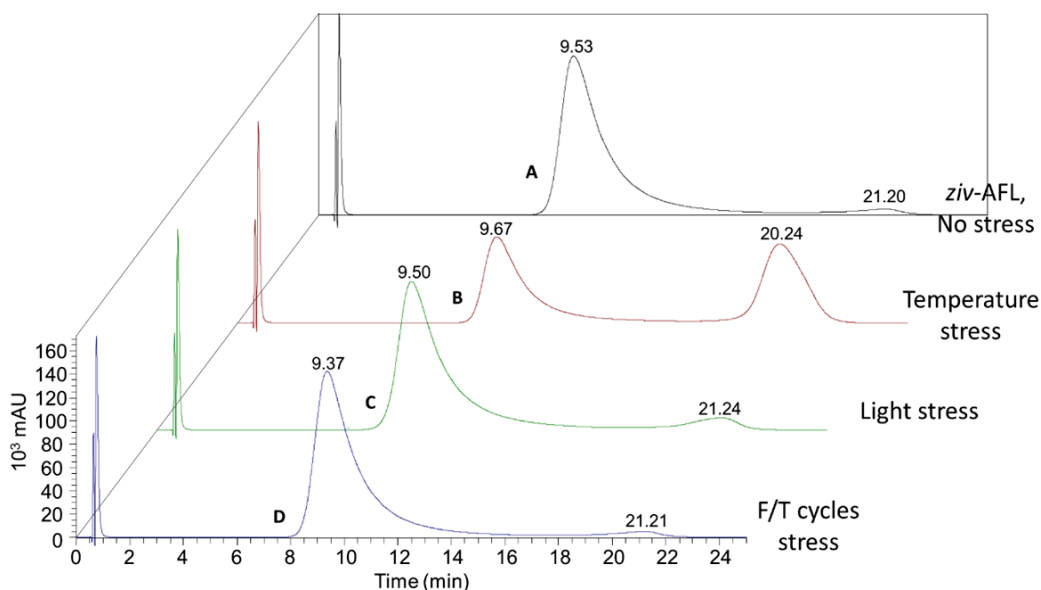


Figure 2. Controlled degradation study of ziv-AFL 25 mg/mL (Zaltrap®) using the SCX/UHPLC-UV-(HESI/Orbitrap)MS (volatile salts) method adapted and optimized from ref [15]. Representative chromatograms of: (A) fresh/control sample; (B) heat stress 60°C; (C) light stress and (D) F/T cycles stress. The chromatograms are displayed normalized from the main peak.

The following three approaches for separation in SCX were tested: a salt gradient, a pH gradient and a combined salt and pH gradient. The variables were optimized, i.e. the pH of the mobile phases, the slope of the gradient, the concentration of the buffer in the mobile phase and the type of buffer.

The first experiments were carried out by applying a salt gradient (using 300 mM NaCl) at a constant pH of 5 (as the pI of ziv-AFL is 8.2). The charge variant profile showed a wide peak eluting from 5 min to 35 min (supplementary data, Fig. S1). Therefore, in the second set of experiments a pH gradient (pH window from 5 to 10) was applied at constant salt concentration (300 mM of NaCl, the highest in the previous gradient) during the separation of the charge variants. Mobile phase A was composed of 10 mM of Na₂HPO₄ and 300 mM of NaCl at pH 5 and mobile phase B of 10 mM of Na₂HPO₄ and 300 mM of NaCl at pH 10. A flow of 0.4 ml/min and a linear gradient was applied as follows: the percentage of mobile phase B was increased from 20% to 50% in 15 min, followed by a further increase in mobile phase B to 100% in 1 min, where it was then maintained for 4 min. Results indicated that under these conditions ziv-AFL eluted at shorter retention times, from 5 to 12 min, in a single chromatographic peak (supplementary data, Fig. S2). As expected, when the starting pH in

the mobile phase was increased, ziv-AFL eluted at shorter retention times (at pH 6 instead of pH 5, supplementary data, Fig. S3).

As the separate application of the salt gradient and the pH gradient modes had proved insufficient for separating the charge variants of ziv-AFL, a simultaneous salt and pH gradient was applied. Based on the previous results, a pH window from 5 (mobile phase A) to 10 (mobile phase B) was selected. Also based on the previous results, a linear gradient applied from 0 to 15 min starting from 20% to 50% B was tested, using 300 mM NaCl in mobile phase B and no NaCl in mobile phase A. Ziv-AFL also eluted at a short retention time (5 min) under these conditions. The pH value of the mobile phase was then reduced in order to increase the retention time by increasing the number of positive charges on the surface of the protein. This was achieved by reducing the initial value of mobile phase B to 10% and the end value to 40%. After applying the gradient (i.e. after the elution of ziv-AFL), the percentage of mobile phase B was increased to 100% in 1 min and was maintained for 4 min (to ensure the elution of the protein); after that, the initial conditions were restored in 1 min. Fig. 3 A shows the chromatographic variant profile obtained under these conditions, highlighting the detection of different charge variants that had never been detected prior to this experiment. The main peak (around 71% of the total chromatographic area) at 9.81 min could be assigned, in line with accepted terminology, to neutral variants. This peak is wide and eluted from around 7 to 15 min, indicating once again that there are an important number of different charge variants, i.e. multicharge variant species. A new peak was also detected at a higher retention time (basic variants) of 17.65 min, which had not been detected in any of the previous experiments. In the controlled stress studies described below, this peak was corroborated as a charge variant of ziv-AFL, unlike the peak at 21.88 min which proved to be an artefact from the mobile phase.

On the basis of the above results, several parameters affecting CXC separation were investigated by decreasing the ionic strength of the mobile phase so as to enable separation of the charge variants. The ionic strength was reduced by using a lower concentration of the Na_2HPO_4 buffer (5 mM instead of 10 mM) and by using two different buffers at the same concentration as in the previous results (10 mM) but with lower ionic strength, i.e. NaH_2PO_4 and MES. We decided to use MES because it is often used in CXC studies of mAbs to assist salt gradient separations and to stabilize the pH of the mobile phase around 6. As far as we know, MES has never been used in pH gradients, even though it is a good candidate for the most acidic buffer [22]. Also, due to the fact that ziv-AFL and mAbs have very similar

structures, we decided to study the effectiveness of MES in the separation of the charge variants. In all the analyses, buffers were mediated with a linear salt gradient from 0 to 300 mM NaCl. Results are shown in Fig. 3 B,C,D. The results of the previous experiment are displayed in Fig. 3 A for comparison purposes. No improvements were detected and similar chromatographic profiles were obtained. The basic charge variant was detected with lesser intensity and the peaks eluted later, as expected. Identical results were obtained for two of the buffers i.e. Na_2HPO_4 or NaH_2PO_4 as they had similar ionic strength (Fig. 3 B and Fig. 3 C). The most unclear results were obtained when MES was used as a buffer (Fig. 3 D).

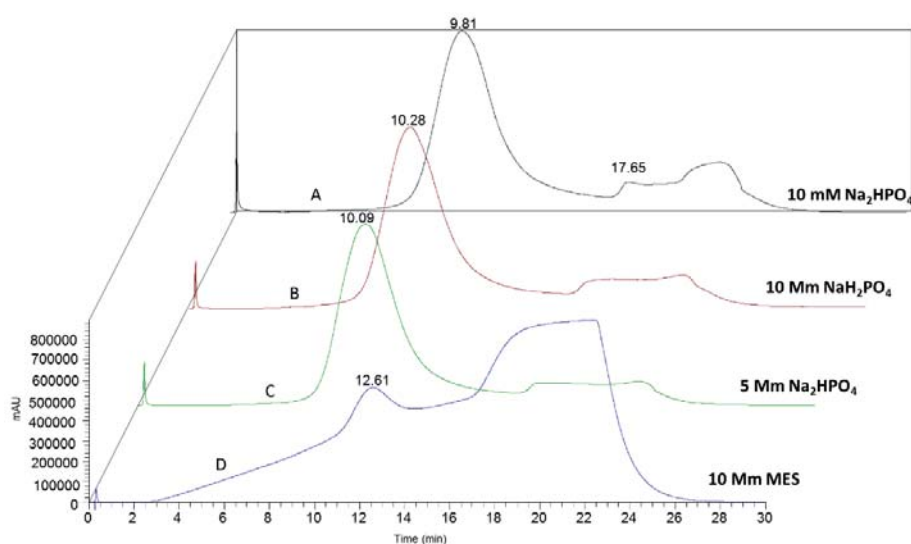


Figure 3. SCX/UHPLC-UV (non-volatile salts) chromatograms of ziv-AFL 25 mg/mL (Zaltrap®) samples obtained with different buffers and concentrations in the mobile phases: (A) 10 mM Na_2HPO_4 ; (B) 10 mM NaH_2PO_4 ; (C) 5 mM Na_2HPO_4 ; and (D) 10 mM MES. The chromatograms are displayed normalized from the main peak.

Controlled degradation study: chromatographic profiles for charge variants from SCX/UHPLC-UV with the non-volatile salts method

Although the 10 mM Na_2HPO_4 buffer in the mobile phase seemed to obtain the best results for detecting the charge variant in ziv-AFL medicine, we decided to test the same conditions for the different buffers studied above on stressed ziv-AFL medicine samples. As indicated above, CXC is commonly used to assess the stability of biopharmaceutical proteins as manifested in charge variants. The ability of a particular CXC method to detect changes in

degraded samples should therefore be an important step for method validation and for evaluating changes in the medicine, for example when handled in hospital prior to administration to the patients, a situation in which rapid, easy methods for detecting any changes would be extremely useful.

With this in mind, aliquots of the medicine Zaltrap® were subjected to accelerated degradation treatment and then analysed. Results are shown in Fig. 4 and 5 in which the control and stressed samples were normalized with the main peak.

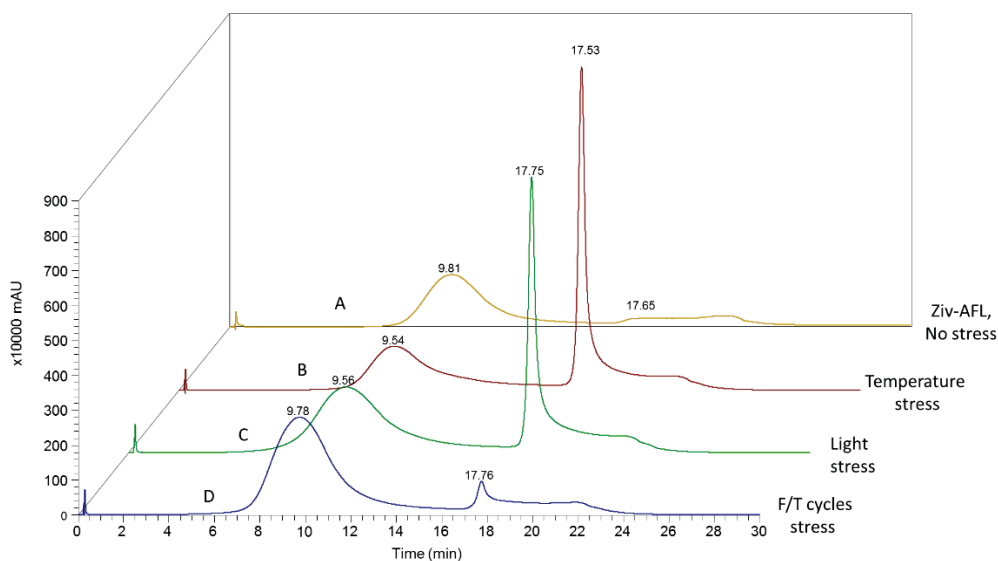


Figure 4. Controlled degradation study using 10 mM Na₂HPO₄ as buffer. Representative SCX/UHPLC-UV (non-volatile salts) chromatograms of ziv-AFL 25 mg/mL (Zaltrap®): (A) fresh/control sample; (B) ziv-AFL heat stress 60°C (C) ziv-AFL light stress and (D) ziv-AFL F/T cycles stress. The chromatograms are displayed normalized from the main peak.

Fig.4 shows the results for the method using 10 mM Na₂HPO₄ buffer in which the charge variant profile clearly changed after application of the stress factors, such that heat, light and F/T cycles induced an increase in the basic variant. A huge, well-defined peak was detected in the basic variants zone at 17.53 min. Therefore stress-induced changes promoted an increase in the positive charges on the surface of this complex Fc-fusion protein structure. Clearly, the percentage of the neutral (main) peak decreased from 72% to 41% in the samples subjected to heat stress, to 53% in those stressed by light and to 65% when submitted to two F/T cycles. At the same time, the basic variant peak increased in all the stressed samples. The basic form probably came from cumulative post-translational

modifications (PTMs) resulting in supplementary positive charges on the surface such as oxidation in the methionines, cysteines, lysines and tryptophans, changes in the disulphides bond and succinimide formation [23]. In particular, it has been widely demonstrated that exposure to light produces oxidation in proteins [24,25]. Under the chromatographic conditions applied in our study, basic variants were detected in all the Zalptrap® samples subjected to controlled degradation, so indicating that these stress factors cause degradation in this medicine and therefore affect its stability.

As regards the other buffer conditions tested (Fig. 5), the worst results were achieved with a 10 mM MES buffer in which there was a strong deviation in the background signal which produced an unclear charge variant chromatographic profile (Fig.5 III). Results were almost identical when 5 mM Na₂HPO₄ or 10 mM NaH₂PO₄ were used, a fact explained by the similar ionic strength in both mobile phases induced by the Na cations. The slight differences in the background signal could be attributed to the different phosphate ions concentration. In both chromatographic profiles, the intensities of the signal of the different variants were smaller than when 10 mM Na₂HPO₄ was used as a buffer in the mobile phase.

Therefore, results indicated that the best method for detecting charge variants between fresh and degraded ziv-AFL medicine (Zalptrap®) samples involved the use of the selected CXC chromatographic conditions together with a 10 mM Na₂HPO₄ buffer.

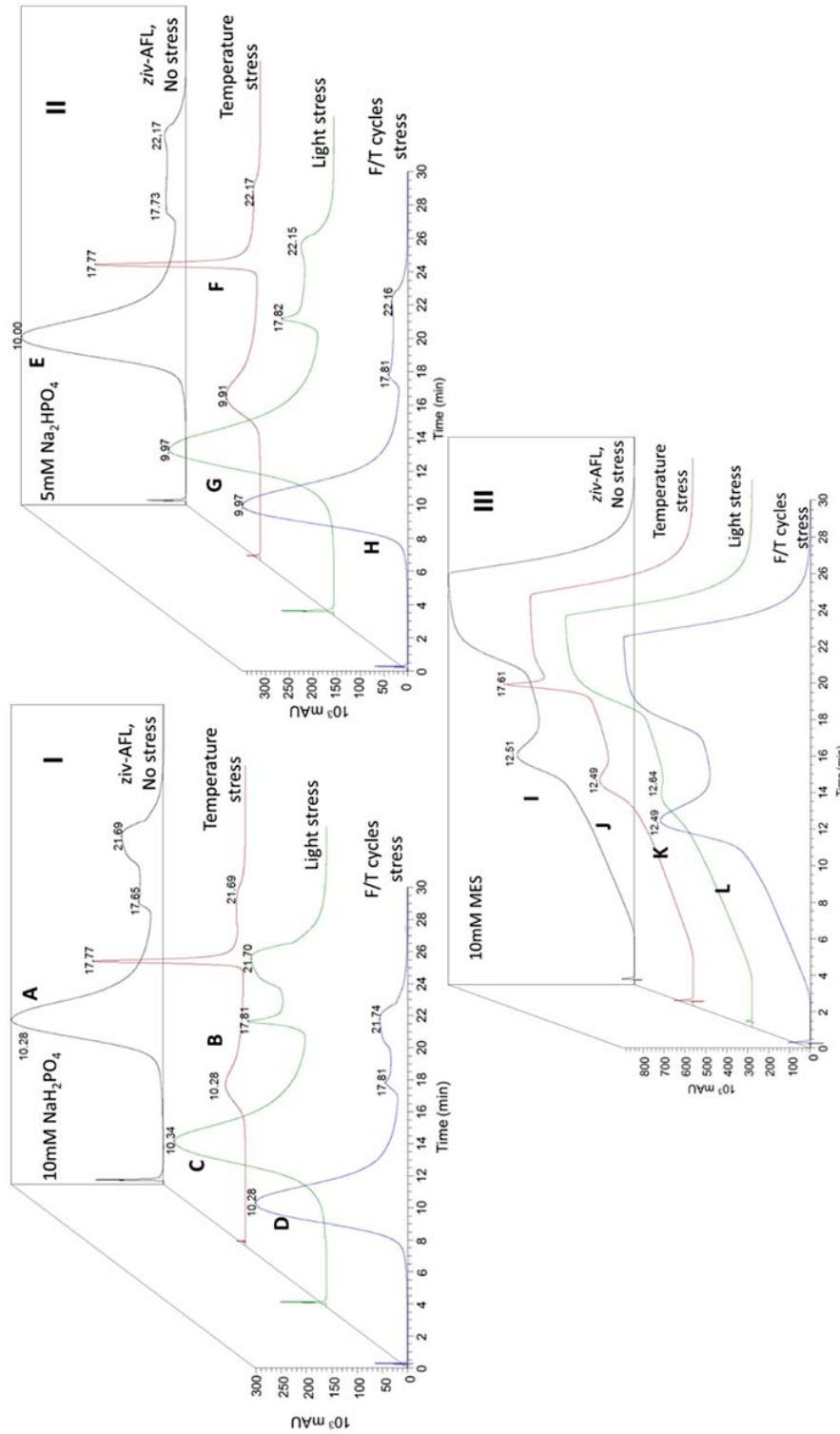


Figure 5. Controlled degradation study using (i) 10 mM NaH₂PO₄; (ii) 5 mM Na₂HPO₄ and (iii) 10 mM MES as buffer. Representative SCX/UHPLC-UV (non-volatile salts) chromatograms of ziv-AFL 25 mg/mL (Zaltrap®); (A) fresh/control sample; (B) heat stress 60°C; (C) light stress and (D) F/T cycles. The chromatograms are displayed normalized from the main peak.

Conclusions

Ziv-AFL is a complex fusion protein with a high degree of glycosylation, and probably a high silylation pattern, which makes it more difficult to analyse its charge variants using CXC. Analysis of the intact protein by mass spectrometry is even more complex. In this research we tried to optimize a SCX/UHPLC-UV-(HESI/Orbitrap)MS method for the analysis of the charge variant species of ziv-AFL in the medicine Zalptrap®, immediately after opening the vial (fresh or control samples) and after controlled degradation. To this end, the first published method for the analysis of charge variants of intact marketed therapeutic mAbs was adapted to the analysis of ziv-AFL, applying statistical design of experiment to achieve the optimal chromatographic conditions for separation of the charge variants. The method made use of volatile salts in order to allow for direct coupling with the high-resolution Orbitrap mass detector. The disadvantage of this method for analysing complex Fc-proteins like ziv-AFL is that the salts must have low ionic strength so as to enable the chromatographic eluent system to be coupled to the high-resolution mass detector. Although the charge variants chromatographic profiles recorded included a single wide peak, the MS data generated by the multiple charge variant species was unclear and no information about the intact isoforms could be obtained. Nevertheless, the chromatograms recorded using the UV signal were able to detect the charge variant when samples of the medicine were subjected to heat at 60°C for three hours, but not when exposed to light and F/T cycles, in which degradation and changes in the charge variant species of the Fc-fusion protein were also expected. None of the MS data proved useful as they contained a huge number of signals from multicharged species of intact ziv-AFL.

In order to improve the results, the method was adapted to use non-volatile salts in the mobile phase. This increased the ionic strength so enabling better resolution of the charge variant species, even though this method was not compatible with coupling to the mass detector. Chromatographic conditions were optimized on the basis of previous experiments and the salt-mediate pH gradient mode achieved the best results when using NaCl (300 mM as highest concentration) and 10 mM Na₂HPO₄ as the buffer, with a pH window from 5 (mobile phase A) to 10 (mobile phase B). Under these conditions, neutral and basic variants were chromatographically separated, although the presence of multicharge variants also seems likely given the wide peak obtained on fresh samples for the neutral species. Nevertheless, this CXC method with non-volatile salts in the mobile phase proved very useful for tracking the controlled degradation of the ziv-AFL samples, as it clearly separated

and detected the basic variant species in a well-defined chromatographic peak, which increased in size with all the different stress factors while the main peak of the neutral variant species decreased.

Therefore, of the two different methods tested for analysing the charge variants in the complex Fc-fusion protein ziv-AFL in the medicine Zaltrap® the most effective was the LC method with non-volatile salts in the mobile phase. The method involving volatile salts was less successful due to its lower ionic strength. Although the high-resolution mass detector is incompatible with non-volatile salts, when volatile salts were used, the complexity of the mass spectra data it generated prevented identification of the multicharge variant species of ziv-AFL. The LC method with non-volatile salts in the mobile phase can therefore be used to characterize the charge variant profile of ziv-AFL in fresh samples of the medicine Zaltrap® and to track any changes that take place when degraded, as demonstrated in the stress study we conducted. An important increase in the basic species is promoted by exposure to heat (60°C for three hours), to light, and to a lesser degree by subjecting the sample to two F/T cycles, factors that should be taken into account for example when handling the medicine in hospital prior to administration to patients. A rapid easy CX-LC-UV method for tracking charge variants in intact ziv-AFL medicine Zaltrap® is also proposed.

This study is part of a wider ongoing research project, in which ziv-AFL (Zaltrap®) is being characterized so as to understand more about its stability in hospital conditions of use. In addition to the present intact analysis of ziv-AFL, top-down and bottom-up strategies are currently being conducted so as to gain a better understanding of the particular isoform charge variants in ziv-AFL and the changes they undergo when subjected to controlled degradation.

Acknowledgement. This study was entirely funded by Project FIS: PI-17/00547 (Instituto Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Spain), which means that it was also partially supported by European Regional Development Funds (ERDF).

Conflict of interests. All authors declare that they have no conflict of interest related to the contents of this article that might influence the results of the investigation.

Data availability. The datasets generated and/or analysed during this research are available from the corresponding author on reasonable request.

Supplementary data

Non-volatile salt gradient method

Composition of mobile phase A: 10 mM of Na₂HPO₄ at pH 5, composition of mobile phase B: 10 mM of Na₂HPO₄ and 300 mM of NaCl at pH 5, flow 0.3 ml/min and a linear gradient 20% to 50% of eluent B for 15 min. A further increase to 100% of eluent B was done in 1 min and then was maintained during 4 min. The initial conditions were restored in 1 min. The UV chromatograms were registered at 214 nm, using 360 ± 10 nm as the reference wavelength.

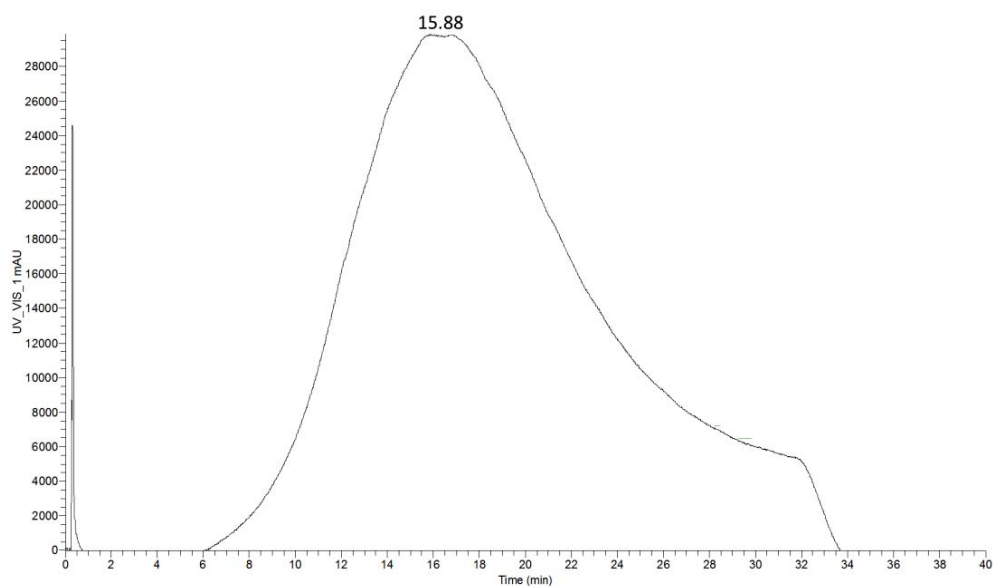


Figure S1. SCX/UHPLC-UV Chromatogram obtained during the method optimization applying salt gradient approach.

Non-volatile pH gradient method

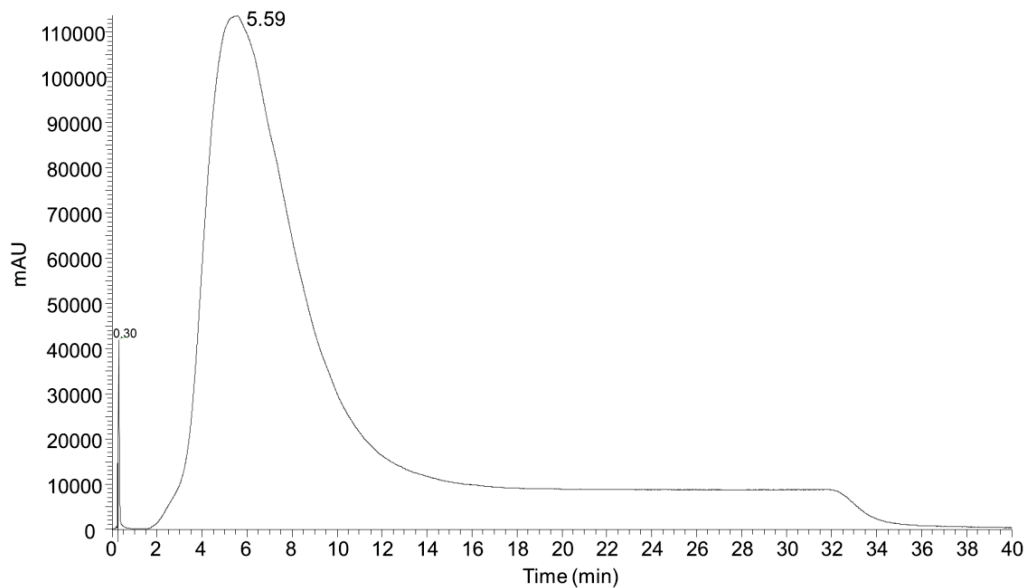


Fig. S2. SCX/UHPLC-UV Chromatogram obtained during the method optimization applying pH gradient approach (pH window 5 to 10).

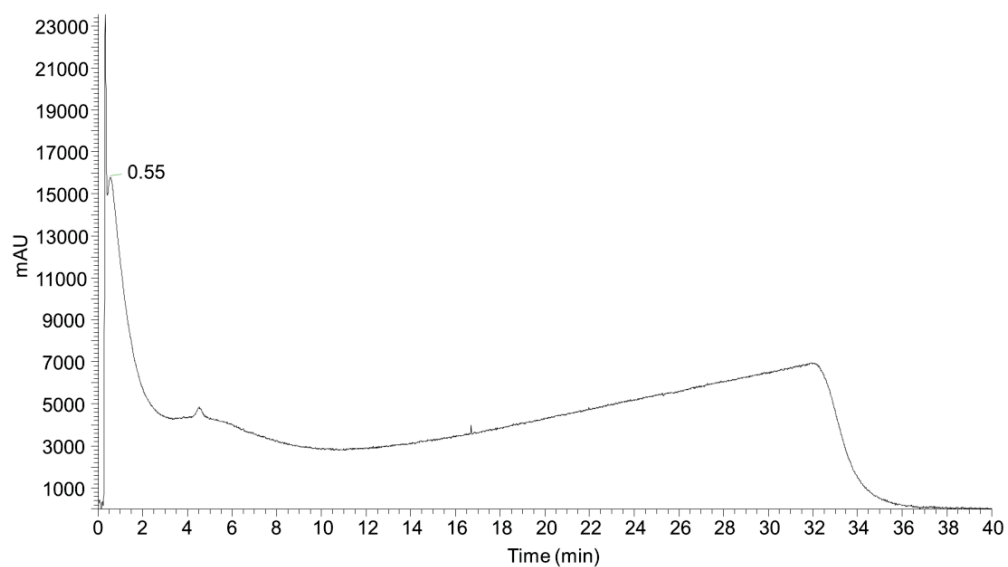


Fig. S3. SCX/UHPLC-UV Chromatogram obtained during the method optimization applying pH gradient approach (pH window 6 to 10).

References

- [1] D.M. Czajkowsky, J. Hu, Z. Shao, R.J. Pleass, Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives, *EMBO Mol. Med.* 4 (2012) 1015–1028.
- [2] R. Jafari, N. M. Zolbanin, H. Rafatpanah, J. Majidi, T. Kazemi, Fc-fusion Proteins in therapy: an updated view, *Curr. Med. Chem.* 24 (2017) 24–1228.
- [3] S. Takahashi, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy, *Biol. Pharm. Bull.* 34 (2011) 1785–1788.
- [4] EMEA/H/C/002532, European Public Assessment Report (EPAR) Summary for Zaltrap, Annex I: Summary of Product Characteristics, European Medicines Agency (EMA), London (UK) (2017).
- [5] Y. He, C. Isele, W. Hou, M. Ruesch, Rapid analysis of charge variants of monoclonal antibodies with capillary zone electrophoresis in dynamically coated fused-silica capillary, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 548–555.
- [6] M. Sundaram-Palaniswamy, High-resolution analysis of charge heterogeneity in monoclonal antibodies using pH-gradient cation exchange chromatography, Agilent application note, (2017).
- [7] S. Fekete, A. Beck, J. Veuthey, D. Guillarme, Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 113 (2015) 43–55.
- [8] S. Fekete, A. Beck, J. Fekete, D. Guillarme, Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography, Part II: pH gradient approach, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 102 (2015) 282–289.
- [9] S. Fekete, A. Beck, J. Fekete, D. Guillarme, Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography, Part I: salt gradient approach, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 102 (2015) 33–44.
- [10] H. Liu, W. Ren, L. Zong, J. Zhang, Y. Wang, Characterization of recombinant monoclonal antibody charge variants using WCX chromatography, icIEF and LC-MS/MS, *Anal. Biochem.* 564–565 (2019) 1–12.
- [11] Q. Tan, Q. Guo, C. Fang, C. Wang, B. Li, H. Wang, J. Li, Y. Guo, Characterization and comparison of commercially available TNF receptor 2-Fc fusion protein products, *MAbs* 4 (2012) 761–774.
- [12] E. Farsang, A. Murisier, K. Horváth, A. Beck, R. Kormány, D. Guillarme, S. Fekete, Tuning selectivity in cation-exchange chromatography applied for monoclonal antibody separations,

- Part 1: alternative mobile phases and fine tuning of the separation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 168 (2019) 138–147.
- [13] A. Murisier, E. Farsang, K. Horváth, M. Lauber, A. Beck, D. Guillarme, S. Fekete, Tuning selectivity in cation-exchange chromatography applied for monoclonal antibody separations, Part 2: evaluation of recent stationary phases, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 172 (2019) 320–328.
- [14] F. Griaud, B. Denefeld, M. Lang, H. Hensinger, P. Haberl, M. Berg, Unbiased in-depth characterization of CEX fractions from a stressed monoclonal antibody by mass spectrometry, *MAbs* 9 (2017) 820–830.
- [15] F. Füssl, K. Cook, K. Scheffler, A. Farrell, S. Mittermayr, J. Bones, Charge variant analysis of monoclonal antibodies using direct coupled pH gradient cation exchange chromatography to high-resolution native mass spectrometry, *Anal. Chem.* 90 (2018) 4669–4676.
- [16] A.O. Bailey, G. Han, W. Phung, P. Gazis, J. Sutton, J.L. Josephs, W. Sandoval, Charge variant native mass spectrometry benefits mass precision and dynamic range of monoclonal antibody intact mass analysis, *MAbs* 10 (2018) 1214–1225.
- [17] Y. Leblanc, C. Ramon, N. Bihoreau, G. Chevreux, Charge variants characterization of a monoclonal antibody by ion exchange chromatography coupled on-line to native mass spectrometry: Case study after a long-term storage at +5 °C, *J. Chromatogr. B.* 1048 (2017) 130–139.
- [18] Y. Leblanc, V. Faid, M.A. Lauber, Q. Wang, N. Bihoreau, G. Chevreux, A generic method for intact and subunit level characterization of mAb charge variants by native mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* (2019) In press.
- [19] N.J. Papadopoulos, S. Davis, G.D. Yancopoulos, Modified chimeric polypeptides with improved pharmacokinetic properties and methods of using thereof. US patent 7,374,758 B2. 2008 may 20
- [20] Specification of MabPac SCX-10 Columns, Thermo Scientific, rev 09, (2015).
- [21] L.M. Hirvonen, G.O. Fruhwirth, N. Srikantha, M.J. Barber, J.E. Neffendorf, K. Suhling, T.L. Jackson, hydrodynamic radii of ranibizumab, aflibercept and bevacizumab measured by time-resolved phosphorescence anisotropy, *Pharm. Res.* 33 (2016) 2025–2032.
- [22] E. Farsang, A. Murisier, K. Horváth, A. Beck, R. Kormány, D. Guillarme, S. Fekete, Tuning selectivity in cation-exchange chromatography applied for monoclonal antibody separations, Part 1: Alternative mobile phases and fine tuning of the separation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 168 (2019) 138–147.
- [23] L.A. Khawli, S. Goswami, R. Hutchinson, Z.W. Kwong, J. Yang, X. Wang, Z. Yao, A. Sreedhara, T. Cano, D. Tesar, I. Nijem, D.E. Allison, P.Y. Wong, Y. Kao, C. Quan, A. Joshi, R.J. Harris, P.

Motchnik, Charge variants in IgG1: isolation, characterization, in vitro binding properties and pharmacokinetics in rats, *MAbs* (2010) 613–624.

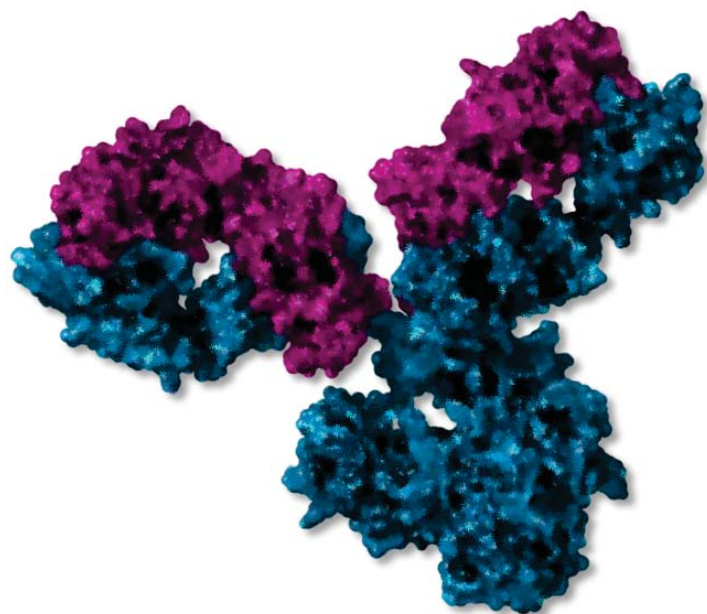
- [24] D.D. Shah, J. Zhang, H. Maity, K.M.G. Mallela, Effect of photo-degradation on the structure, stability, aggregation, and function of an IgG1 monoclonal antibody, *Int. J. Pharm.* 547 (2018).
- [25] A. Sreedhara, J. Yin, M. Joyce, K. Lau, A.T. Wecksler, G. Deperalta, L. Yi, Y.J. Wang, B. Kabakoff, R.S.K. Kishore, Effect of ambient light on IgG1 monoclonal antibodies during drug product processing and development, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 100 (2016) 38–46.

4.3. Conclusiones

En vista de los resultados obtenidos se puede concluir con que se ha desarrollado un método de cromatografía de líquidos de intercambio catiónico usando sales no volátiles y mediante detección UV que permite separar variantes de carga de la proteína de fusión Ziv-AFL. Con estas condiciones pudieron ser separadas variantes de carga neutras y básicas del medicamento Zaltrap®. El análisis de las muestras sometidas a estrés ha permitido demostrar la capacidad de separación de variantes de carga del método desarrollado ya que se ha podido detectar un aumento en la variante de carga básica para los estreses llevados a cabo. La temperatura es el factor de estrés que más ha producido cambio en el perfil de variantes de carga.

La alta complejidad estructural que posee esta proteína de fusión no ha permitido su detección en modo intacto mediante este modo cromatográfico acoplado directamente a detección por espectrometría de masas. En este trabajo se ha intentado optimizar un método de SCX/UHPLC-UV-(HESI/Orbitrap)MS mediante DoE para el análisis de variantes de carga mediante el uso de sales no volátiles en las fases móviles. No se ha podido obtener buenos resultados en el análisis mediante espectrometría de masas ya que el espectro obtenido no es claro y no se obtiene buena resolución entre señales, además los perfiles cromatográficos fueron menos sensibles a la detección de las variantes de carga. La desventaja de este tipo de métodos cuando se analizan proteínas muy complejas como es el caso de ziv-AFL radica en el uso de sales con baja fuerza iónica (las cuales son requeridas para el acoplamiento del sistema cromatográfico a espectrometría de masas). Mediante este método no se consiguieron detectar cambios en el perfil de variantes de carga de ziv-AFL, a excepción del análisis de muestras sometidas a estrés de temperatura a 60°C durante 3 horas.

Con este trabajo se pone de manifiesto que el análisis de variantes de carga de proteínas complejas intactas no ha sido posible realizarlo usando sales no volátiles en las fases móviles, ya que estas tienen menor capacidad de separación que las sales volátiles (como por ejemplo NaCl y el Na₂HPO₄), y porque además requieren del empleo de columnas de intercambio catiónico fuerte para que no contribuyan a la modificación del pH de la fase móvil.



**Comunicaciones a congresos derivadas de la
Tesis Doctoral / Congress presentations derived
from the Doctoral Thesis**

Presentaciones orales / Oral presentations

- Espectrometría de masas de alta resolución en la caracterización del perfil de isoformas del medicamento de origen biotecnológico bevacizumab. R. Pérez-Robles, L. Cuadros-Rodríguez, N. Navas. IV Workshop de jóvenes biotecnólogos, Granada (España).

- Statistical design of experiments to study the robustness of the chromatographic separation and quantification of therapeutic monoclonal antibodies. R. Pérez-Robles, N. Navas, L. Cuadros-Rodríguez. IX Colloquium Chemiometricum Mediterraneum (CCM IX), Arles (Francia).

Presentaciones en Póster / poster presentations

- Índices de similitud para la comparación de espectros de masas en la caracterización de medicamentos de origen biotecnológico. R. Pérez-Robles, L. Cuadros-Rodríguez, N. Navas-Iglesias. III Workshop de jóvenes biotecnólogos, Granada (España).

- Estudio de la estabilidad de anticuerpos monoclonales mediante técnicas multivariantes. R. Pérez-Robles, L. Cuadros-Rodríguez, N. Navas. I Jornadas de investigadores en formación (JIFFI), Granada (España).

- Methodology for the comparison of complex MALDI-TOF mass spectra. A case of study: Stability of Infliximab. R. Pérez-Robles, L. Cuadros-Rodríguez, S. Medina-Rodríguez, N. Navas. XVI Chemometrics in Analytical Chemistry (CAC 2016), Barcelona (España).

- Evaluación de la estabilidad de infliximab mediante la comparación de la “huella dactilar de masas peptídicas. R. Pérez-Robles, L. Cuadros-Rodríguez, A. Salmerón-García, N. Navas. XV Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica (GRASEQA), Almería (España).

**Comunicaciones a congresos/
Congress presentations**

- Caracterización del perfil de isoformas del anticuerpo monoclonal rituximab mediante UHPLC-(Orbitrap)MS. R. Pérez-Robles, L. Cuadros-Rodríguez, N. Navas. II Jornadas de investigadores en formación (JIFFI II), Granada (España).

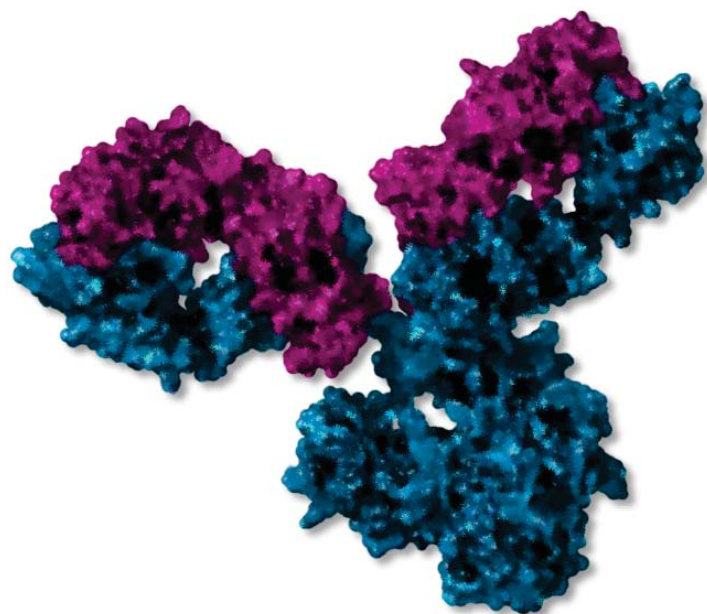
- Enfoque quimiométrico en la comparación de espectros de masas complejos: índices de similitud. R. Pérez-Robles, N. Navas, A. Salmerón-García, L. Cuadros-Rodríguez. XXI Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica (SEQA 2017), Valencia (España).

- Comparing the analytical features of denatured or native LC-MS conditions to obtain the isoform profile of intact therapeutic monoclonal antibodies. R. Pérez-Robles, S. Carillo, A. Farrell, N. Navas, L. Cuadros-Rodríguez, J. Bones. 11th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Granada (España).

- How accurate is N-glycan quantitation in monoclonal antibodies? A comparison across different domains of analysis. S. Carillo, R. Pérez-Robles, A. Farrell, N. Navas, J. Bones. Analytical Technologies Europe: Symposium on the practical Applications including CE, LC and MS in the Biopharmaceutical Industry (AT Europe 2018), Barcelona (España).

- Separation and identification by (RP)UHPLC-UV-MS of four therapeutical monoclonal antibodies. R. Pérez-Robles, L. Cuadros-Rodríguez, A. Salmerón-García, N. Navas. XVIII Reunión de la Sociedad Española de cromatográfica y técnicas afines (SECyTA 2018), Granada (España).

- Caracterización estructural en estudios de estabilidad mediante LC (HR)MS de anticuerpos monoclonales terapéuticos. R. Pérez-Robles, L. Cuadros-Rodríguez, A. Salmerón-García, N. Navas. XVI Reunión del Grupo Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica (GRASEQA 2018), Granada (España).



**Estudios complementarios a la Tesis doctoral /
Complementary studies**

Artículos científicos / Publications

➤ 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 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *BioDrugs* 33, 193–205 (2019).

➤ J. Hermosilla, R. Pérez-Robles, S. Casares, A. Salmerón, J. Cabeza, N. Navas. Comprehensive biophysical characterization and forced degradation study of ziv-aflibercept. Enviado a *Scientific Reports (Nature)* el 5 de noviembre de 2019.

Presentaciones orales / Oral presentations

➤ Caracterización de la heterogeneidad en anticuerpos monoclonales terapéuticos por cromatografía de intercambio iónico fuerte acoplada a espectrometría de masas de alta resolución en modo nativo (SCX)UHPLC-(NATIVE)HRMS: adalimumab como caso de estudio. R. Pérez-Robles, L. Cuadros-Rodríguez, A. Salmerón-García, J. Cabeza, N. Navas. I Congreso de Investigadores del PTS, Granada (España).

Presentaciones en Póster / Poster presentations

➤ Estudios preliminares de caracterización estructural de la proteína de fusión Romiplostim. R. Pérez-Robles, S. González-Suarez, A. Salmerón-García, J. Cabeza-Barrera, N. Navas. XV Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica (GRASEQA), Almería (España).

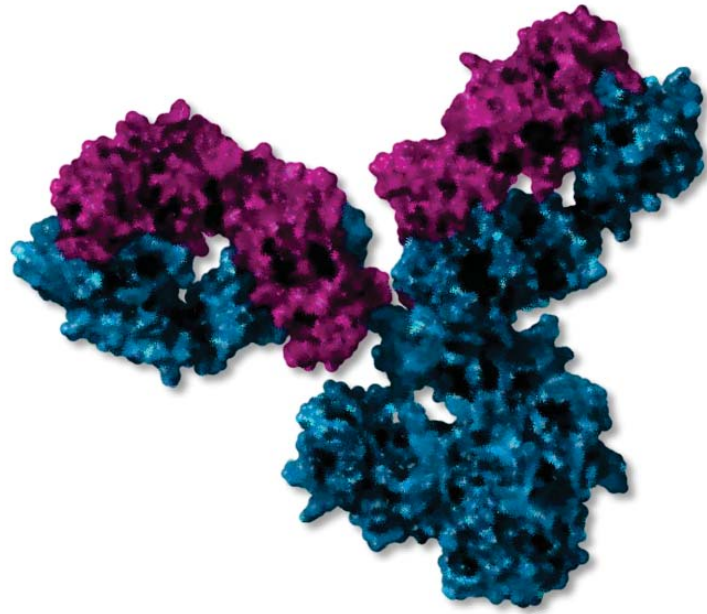
➤ Caracterización de la proteína de fusión intacta Romiplostim por espectrometría de masas. S. González-Suarez, R. Pérez-Robles, A. salmerón-García, L. Cuadros-Rodríguez, J. Cabeza, N. Navas. III Workshop de jóvenes biotecnólogos, Granada (España).

- Native mass spectrometric size exclusion liquid chromatographic analysis of the monoclonal antibodies infliximab and biosimilar Ct-P13: aggregates and intact isoforms profiles. R. Pérez-Robles, L. Cuadros-Rodríguez, A. Salmerón-García, J. Cabeza, N. Navas. XVIII Reunión de la Sociedad Española de cromatográfica y técnicas afines (SECyTA 2018), Granada (España).

- Caracterización del perfil de agregados en anticuerpos monoclonales terapéuticos por cromatografía exclusión molecular acoplada a espectrometría de masas de alta resolución en modo nativo (SEC)UHPLC-(NATIVE)HRMS: adalimumab como caso de estudio. R. Pérez-Robles, L. Cuadros-Rodríguez, A. Salmerón-García, J. Cabeza, N. Navas. I Congreso de Investigadores del PTS, Granada (España).

- Perfil de agregación mediante cromatografía de exclusión molecular –(SE)HPLC-DAD– de la proteína de fusión aflibercept, R. Pérez-Robles, L. Cuadros-Rodríguez, A. Salmerón-García, J. Cabeza, N. Navas. XXII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica, Valladolid (España).

- Impact of high temperature and shaking on charge variants of adalimumab (Humira®) assessed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. R. Pérez-Robles, A. Salmerón-García, L. Cuadros-Rodríguez, J. Cabeza, N. Navas. 24th European Association of Hospital Pharmacist, Gothenburg (Suecia).



**Conclusiones finales y perspectivas futuras /
Final conclusions and future prospects**

CONCLUSIONES FINALES

A partir de la hipótesis que inicialmente se planteó en el Plan de Investigación de esta Tesis Doctoral: *El empleo de tecnologías avanzadas de análisis basadas en la espectrometría de masas de alta resolución junto con la cromatografía de líquidos de ultra altas prestaciones permitirá estudiar los mAb y proteínas de fusión. El estudio de estos cambios permitirá valorar la calidad como fármaco. Además, el empleo de técnicas de análisis de datos multivariantes permitirá un estudio de datos complejos procedentes de los análisis de mAb y proteínas de fusión,* se pueden establecer las siguientes conclusiones generales que se detallan a continuación.

➔ La aplicación de la espectrometría de masas al estudio de mAb y proteínas de fusión han permitido concluir los siguientes aspectos:

I. Se han desarrollado y validado diferentes metodologías de análisis basadas en la medida experimental de señales mediante espectrometría de masas de alta resolución que han demostrado ser útiles para los fines que han sido desarrolladas. La espectrometría de masas es una técnica de detección que ha permitido

FINAL CONCLUSIONS

In the Research Plan for this PhD Thesis, the following initial hypothesis was proposed: *The quality of monoclonal antibodies and fusion proteins can be studied using advanced analytical technologies based on high-resolution mass spectrometry coupled with ultra-high-performance liquid chromatography. The complex data produced by the analysis of the monoclonal antibodies and fusion proteins can be studied using multivariate data analysis techniques.* On the basis of this initial hypothesis several general conclusions can be reached.

➔ The application of mass spectrometry to the study of mAbs and fusion proteins enabled us to reach the following conclusions:

I. Different methodologies based on high-resolution mass spectrometry detection were developed and validated. These methodologies have proved useful for the purposes for which they were developed. The mass spectrometry detection technique was used to determine the exact mass of the mAb isoform

Conclusiones finales / Final conclusions

determinar la masa exacta de cada una de las isoformas de los mAb. Existen varias estrategias para el análisis de mAb mediante espectrometría de masas, que se simbolizan por: 'top-down', 'middle-down' y 'bottom up'. En función de la complejidad estructural del mAb o de la proteína de fusión, la elección de la estrategia de análisis más adecuada es una etapa crítica. Cuanto más complejo sea la proteína terapéutica, es decir, más modificaciones postraduccionales posea, habrá que rechazar el enfoque top-down y hacer uso de los otros dos para así poder acceder en más profundidad a estas modificaciones mediante el análisis de espectrometría de masas.

II. Se han estudiado varios dominios de análisis de mAb para la determinación del perfil de N-glicosilación mediante espectrometría de masas. Este estudio ha permitido estudiar cuales son las ventajas y desventajas del uso de cada metodología empleada.

➔ De la misma forma, la aplicación de cromatografía de líquidos al estudio de mAb y proteínas de fusión han permitido concluir los siguientes aspectos:

III. La cromatografía de líquidos ha permitido la separación de varios mAb. Debido a la alta similitud que existe

profile. There are several strategies for mass spectrometry mAbs analysis i.e. 'top-down', 'middle-down' and 'bottom-up'. The choice of strategy depends on the complexity of the mAbs or fusion protein. This is a critical step. For the most complex therapeutic proteins, i.e. those that have undergone most post-translational modifications, the top-down approach should be discarded. These post-translational modifications can be studied in greater detail using 'middle-down' and 'bottom-up' mass spectrometry analysis.

II. Several domains of analysis were studied for the determination of the N-glycosylation profile using mass spectrometry analysis. The advantages and disadvantages of the different methodologies were discussed.

➔ The application of liquid chromatography to the study of mAbs and fusion proteins enabled us to reach the following conclusions:

III. Several mAbs were separated using liquid chromatography. Separation by reverse phase liquid chromatography was difficult due to

Conclusiones finales / Final conclusions

entre la estructura de los mAb, hasta la fecha no había sido posible su separación mediante cromatografía de líquidos en fase inversa. El uso de una columna monolítica específica ha podido resolver este problema. La metodología ha sido validada en función de guías internacionales de validación por lo que se ha demostrado que es idónea para la cuantificación de mAb terapéuticos aislados o en mezclas.

IV. Se ha estudiado el perfil de variantes de carga de la proteína de fusión ziv-aflibercept (Zaltrap®) mediante cromatografía de intercambio catiónico. Se han detectado cambios en el perfil de variantes de carga cuando se han analizado muestras del medicamento Zaltrap® sometidas a un proceso de degradación controlada. Esta metodología es adecuada para ser aplicada en estudios de estabilidad en el tiempo de esta proteína terapéutica en condiciones de uso hospitalario.

➔ Y por último, la aplicación de metodología de tratamiento de datos multivariantes aplicada al estudio de mAb ha permitido concluir los siguientes aspectos:

V. Se ha desarrollado una nueva metodología que ha permitido comparar espectros de masas complejos y se ha puesto de manifiesto la diferencia entre

the fact that the mAbs have very similar structures. This problem was solved using a specific monolithic chromatographic column. The methodology was validated according to international validation guidelines and is therefore considered suitable for the quantification of mAbs (single or in mixtures).

IV. The charge variants profile of the fusion protein ziv-AFL (Zaltrap®) was studied using cation exchange liquid chromatography. Changes in the charge variants profile were detected when controlled degradation of ziv-AFL was induced in the medicine Zaptrap®. This methodology is suitable to be applied in long-term stability studies of this therapeutic protein in hospital conditions of use.

➔ The application of multivariate data processing methods to the study of mAbs and fusion proteins enabled us to reach the following conclusions:

V. A new methodology for comparing complex mass spectra was developed, which highlights the differences between them. The use of multivariate statistical techniques such as principal component

Conclusiones finales / Final conclusions

ellos. La aplicación de técnicas de análisis de datos multivariantes como son el análisis de componentes principales, el análisis multivariante de la varianza y el análisis de la similitud han ayudado a poner de manifiesto las diferencias entre los espectros de masas procedentes de huellas peptídicas de anticuerpos monoclonales. Se ha desarrollado un índice de similitud que ha demostrado ser más efectivo que otros índices comúnmente usados para la comparación de espectros complejos.

Paralelamente, se han obtenido conclusiones específicas que son detalladas al final de cada capítulo de esta Tesis Doctoral, pero que se resumen a continuación.

I. Capítulo 1

El estudio de similitud de las huellas peptídicas de una misma proteína terapéutica en función del tiempo permite verificar que hay cambios en la estructura primaria de los mAb estudiados, sin embargo no se puede decir que hay cambios en la funcionalidad de estos.

II. Capítulo 2

La validación del método cromatográfico de separación de mAb muestra unos buenos valores de linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión, veracidad y robustez. Esta separación se

analysis, multivariate analysis of variance and similarity analysis revealed the differences between the mAbs peptide mapping fingerprints. During the course of this research, we developed a new similarity index, which shows better results than other similarity indexes commonly used to compare complex mass spectra.

Specific conclusions are detailed below.

I. Chapter 1

The study of the similarity of peptide mass fingerprints over time verified that changes take place in the primary structure of the mAbs. However, this does not allow us to conclude that their functionality has been affected in any way.

II. Chapter 2

The validation of the chromatographic method for separation of the mAbs shows good values for linearity, limits of detection and quantification, precision, trueness and robustness. Chromatographic separation was achieved using a monolithic divinylbenzene-based column and the application of statistical design of experiments. It was not possible to separate RTX and TRA due to the fact that they have very similar structures, which gives them similar

Conclusiones finales / Final conclusions

ha realizado gracias a la aplicación de la metodología de diseño de experimentos y a la alta especificidad de la columna monolítica de divinilbenceno usada. No ha sido posible la separación de los mAb RTX y TRA debido a la alta similitud que poseen en sus estructuras, las cuales le confieren una hidrofobicidad parecida. El nuevo desarrollo de la "función de heterocedasticidad" permite estimar el error como desviación estándar asociado a cualquier mAb estudiado y a cualquier concentración de estudio. Se ha comprobado que el ácido fórmico es mejor agente ionizador de mAb en espectrometría de masas que el ácido trifluoroacético.

III. Capítulo 3

El trabajo desarrollado en este capítulo constituye una guía para la elección de la mejor estrategia en futuras determinaciones de N-glicanos en mAb, ya que se reúnen múltiples métodos en un mismo trabajo. El análisis intacto o de subunidades requiere muy poco tratamiento de datos, haciéndolo ideal para el análisis de rutina, sin embargo la información es limitada por la obtención de las glicoformas más abundantes y no se puede obtener detalles de la estructura. El mapeo peptídico y el análisis de los N-glicanos liberados requieren un mayor tiempo de preparación de muestra y de análisis. Por otro lado son las estrategias

hydrophobicity. A novel approach was successfully applied to obtain a model called the "heteroscedasticity function", which allows us to estimate the error as standard deviation associated with any mAb and at any concentration. Formic acid proved to be a better mAb ionizing agent in mass spectrometry than trifluoroacetic acid.

III. Chapter 3

This chapter offers a guide for choosing the best strategy for determining N-glycans in mAbs. The analysis of intact mAbs or subunits require little or no sample preparation, making it ideal for routine analysis to ensure the robustness of the analysis; nevertheless, the structural details obtained in this way are limited to the most abundant glycoforms and they do not provide structural details about the glycans. Peptide mapping and the analysis of released N-glycans require more time for the preparation and analysis of samples. These methods also allow us to study the N-glycan profile in more detail.

IV. Chapter 4

Ziv-AFL (Zaltrap®) has demonstrated to be a complex Fc-fusion protein. Multicharge variant species of ziv-AFL when analysed by CXC coupled to high resolution mass spectrometric

**Conclusiones finales /
Final conclusions**

que mayor detalle aportan en el análisis de los N-glicanos.

IV. Capítulo 4

Ziv-AFL (Zaltrap®) ha demostrado ser una proteína de fusión compleja. Ha generado espectros de masas complejos que no han podido ser interpretados cuando ziv-AFL fue analizada mediante CXC acoplada a detección de espectrometría de masas de alta resolución. El uso de sales no volátiles en las fases móviles del método CXC con detección ultravioleta ha permitido obtener mejores perfiles cromatográficos, con la detección de variantes básicas en muestras frescas del medicamento. Sin embargo, este enfoque posee la desventaja de que no se puede acoplar a detección mediante espectrometría de masas. Se ha sometido al medicamento a condiciones de degradación controlada y se ha observado que el perfil de variantes de carga se ha alterado significativamente cuando la muestra fue sometida a 60 °C y a exposición de luz. El perfil de variantes de carga se ha visto modificado en menor medida cuando se sometió la muestra a ciclos de congelación/ descongelación.

detection generated complex mass spectra that could not be interpreted; therefore mass intact analysis of the isoform was not achieved. Using non-volatile salts in the mobile phase of the CXC method (ultraviolet detection) allowed for a better chromatographic profiles, with the detection of basic variants even in fresh samples of the medicines; however this approach has the disadvantage of preventing mass spectrometry detection. By submitting the medicine to controlled degraded conditions, it could be proposed that the charge variants profile is significantly altered when the medicine is subject to heating at 60 °C and when light exposure and slightly modified when subject to freeze/ thaw cycles.

PERSPECTIVAS FUTURAS

La investigación realizada en esta Tesis Doctoral ha supuesto un avance en la línea de investigación iniciada en los dos proyectos de investigación financiados por el Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades; Fondos de Investigación en Salud, proyectos FIS PI010-00201 "Estudio formal y propuesta de validación del perfil indicador de la estabilidad de medicamentos de naturaleza biotecnológica (y química) en condiciones normales de uso fondo de investigación sanitaria" y FIS PI17-00547 "Estudios de estabilidad en el tiempo de sobrantes de medicamentos biotecnológicos - anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión-. Estudios conformacionales comprensivos"), mediante los cuales se está estudiando la estabilidad de sobrantes hospitalarios de anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión terapéuticas cuyo impacto económico en el Sistema Sanitario es elevado. Sin embargo los trabajos desarrollados en esta Tesis Doctoral no cumplen con todos los objetivos propuestos en estos proyectos.

Es necesario seguir investigando en la misma línea de investigación en la que se enmarca esta Tesis Doctoral. Además de los medicamentos estudiados en esta

FUTURE PROSPECTS

This PhD Thesis provides a significant advance in the line of research followed by two projects funded by the Institute of Health 'Carlos III'. (Ministry of Science, Innovation and Universities; Health Research Funds, projects FIS PI010-00201 "Study and proposal of validation of the stability indicating profile for biotechnological medicines" and FIS PI17-00547 "Long-term stability studies of the surplus of biotechnological medicines - monoclonal antibodies and fusion proteins-. Comprehensive conformational studies". These projects study the stability of surplus therapeutic monoclonal antibodies and fusion proteins, which are very costly for the Public Health System, to evaluate re-used them. Nevertheless, the work conducted in this PhD Thesis does not meet all the objectives proposed in these projects.

Further investigation is needed in the same line of research as this Thesis. In addition to the medicines studied here, there are other mAbs and Fc-fusion proteins which create a significant economic burden for the Health System due to the surplus drugs produced, e.g. pembrolizumab, adalimumab,

Perspectivas futuras / Future prospects

Tesis Doctoral existen otros fármacos que suponen un alto gasto al Sistema Sanitario por la gran cantidad de sobrantes que se generan. Las investigaciones futuras están encaminadas en el desarrollo de metodología que permita estudiar la estabilidad en condiciones hospitalarias de los medicamentos biotecnológicos pembrolizumab, adalimumab, nivolumab etanercept y romiplostim. Las investigaciones en curso ya se están centrando en el estudio en condiciones hospitalarias de sobrantes de estas proteínas terapéuticas en estudios de estabilidad en el tiempo.

Teniendo en cuenta los resultados presentados en esta Tesis, se están llevando a cabo estudios más detallados de la estructura de la proteína de fusión ziv-AFL. El alto grado de glicosilación que contiene su estructura evita estudiarla mediante espectrometría de masas en modo intacto. De manera que se están usando los enfoques 'middle down' y 'bottom-up' para estudiar los diferentes dominios de la proteína usando espectrometría de masas de alta resolución.

nivolumab etacernet or romiplostim. Ongoing researches already focus on the long-term stability studies of surplus of these therapeutic proteins, stored as used in hospital conditions.

Regarding the results presented in this Thesis, more detailed research is already conducted on the structure of the Fc-fusion protein ziv-AFL. The high degree of glycosylation of the protein hinders the study of the intact structure using mass spectrometry. Therefore, middle-down and bottom-up approaches are currently being used to study the different domains of the protein using high resolution mass spectrometry.

