

# TESIS DOCTORAL



**UNIVERSIDAD  
DE GRANADA**

**ANÁLISIS ESTRUCTURALES COMPRENSIVOS DE ANTICUERPOS  
MONOCLONALES Y PROTEÍNAS DE FUSIÓN TERAPÉUTICOS.  
APLICACIONES EN ESTUDIOS DE ESTABILIDAD EN CONDICIONES  
REALES DE USO HOSPITALARIO**

---

Programa de Doctorado en Farmacia

Universidad de Granada

Jesús Hermosilla Fernández

Granada, 2021

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Jesús Hermosilla Fernández  
ISBN: 978-84-1117-044-4  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/70712>







## Agradecimientos

El trabajo expuesto en la presente Tesis Doctoral ha sido desarrollado en los laboratorios del departamento de Química Analítica. Se ha hecho uso, además, de los laboratorios del departamento de Química Física y del Centro de Instrumentación Científica (CIC), así como de las dependencias del Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Clínico San Cecilio de Granada. El presente trabajo ha sido desarrollado en el marco de los proyectos de investigación financiados por el Instituto de Salud Carlos III **FIS PI010-00201** y **FIS PI17-00547**.

Mi proyecto de Tesis Doctoral no hubiera sido posible sin la ayuda de mi familia. Siempre han insistido en que realizara un doctorado, aun cuando no entraba en mis planes. Por su confianza y apoyo incondicional, mis agradecimientos se dirigen, ante todo, a ellos.

Agradecer a la profesora Natalia África Navas Iglesias, directora de la presente Tesis Doctoral, que me permitiera formar parte de su línea de investigación por medio de diversos contratos a través de Fundación General Universidad de Granada-Empresa y Fundación para la Investigación Biosanitaria de Andalucía Oriental-Alejandro Otero (FIBAO). Agradecerle el extensísimo conocimiento que he adquirido gracias a ella y todo el apoyo que me ha brindado. Al Dr. Antonio Salmerón García, Farmacéutico especialista de Área de la Unidad de Farmacia del Hospital Universitario Clínico San Cecilio y codirector de la presente Tesis Doctoral, y a José Cabeza Barrera, Jefe del Servicio de Farmacia de dicho hospital. Por supuesto, sin ellos y sin el resto del equipo no hubiera sido posible este trabajo. Agradecerles el conocimiento adquirido sobre la realidad hospitalaria en relación al uso de medicamentos biotecnológicos.

Dar las gracias a los departamentos de Química Analítica, Química Física y al CIC por la ayuda prestada. Al profesor Salvador Casares Atienza, por su ayuda y por compartir conmigo su profundo conocimiento de proteínas. A mis compañeros de laboratorio José, Raquel, Ricardo y Anabel entre otros. Un gran equipo multidisciplinar en el que cada uno ha aportado una visión científica única.

Por último, agradecer a todos los profesores que me han formado a lo largo de mi vida de estudiante y a aquellas personas que de manera indirecta han estado presentes a lo largo de esta etapa.



# Índice

RESUMEN .....	13
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	17
INTRODUCCIÓN.....	21
1. Medicamentos biotecnológicos .....	23
1.1. Características de los biofármacos vs fármacos de síntesis química .....	24
2. Anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión-Fc terapéuticos.....	27
2.1. Aspectos estructurales de los anticuerpos monoclonales: IgG y subtipos .....	27
2.2. Infliximab y biosimilar CT-P13 .....	33
2.3. Aspectos estructurales de las proteínas de fusión-Fc.....	33
2.4. Ziv-aflibercept .....	36
3. El uso de los medicamentos biotecnológicos en hospitales: la práctica clínica .....	37
3.1. Impacto de la manipulación sobre la estabilidad de los medicamentos biotecnológicos .....	37
3.2. Estabilidad en el tiempo de los sobrantes de los medicamentos biotecnológicos: estudios de estabilidad .....	42
4. Caracterización fisicoquímica y funcional comprensiva de biofármacos: atributos críticos de la calidad .....	44
4.1. Cromatografía líquida de altas y ultra altas prestaciones (HPLC/UHPLC).....	45
4.1.1. Cromatografía de exclusión molecular (SEC) .....	45
4.1.2. Cromatografía de intercambio iónico (IXC).....	46
4.1.3. Cromatografía en fase reversa (RP) .....	47
4.2. Técnicas espectroscópicas .....	48
4.2.1. Dispersión de la luz dinámica (DLS).....	48
4.2.2. Espectropolarimetría de Dicroísmo Circular (DC) en el UV lejano.....	49
4.2.3. Espectroscopia de fluorescencia intrínseca de triptófanos .....	50
4.3. Inmunoensayos .....	52
4.3.1. ELISA indirecto.....	52
5. Estructura de la Tesis Doctoral y coherencia entre las publicaciones .....	54
CAPÍTULO I .....	59
Comparative stability studies of different infliximab and biosimilar CT-P13 clinical solutions by combined use of physicochemical analytical techniques and ELISA.....	59
Resumen.....	61
Publicación .....	63

Material suplementario .....	79
CAPÍTULO II .....	99
Comprehensive biophysical and functional study of ziv-aflibercept: Characterization and forced degradation .....	99
Resumen.....	101
Publicación .....	103
Material suplementario .....	119
CAPÍTULO III .....	127
Stability study over time of clinical solutions of ziv-aflibercept prepared in infusion bags using a proper combination of physicochemical and functional strategies.....	127
Resumen.....	129
Publicación .....	131
Material suplementario .....	145
CONCLUSIONES .....	153
PERSPECTIVAS FUTURAS .....	157
ANEXO. LECTURAS SUGERIDAS .....	161
BIBLIOGRAFÍA.....	189

## RESUMEN

En la presente Tesis Doctoral, se han desarrollado y puesto a punto estrategias analíticas comprensivas para evaluar distintos atributos críticos de la calidad de proteínas terapéuticas comerciales de naturaleza biotecnológica: anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión-Fc, que posteriormente han sido empleadas en estudios de caracterización y estabilidad de las mismas en condiciones de uso hospitalario. Las proteínas estudiadas han sido: dos anticuerpos monoclonales, uno innovador u original, el infliximab, en su medicamento Remicade® (Janssen Biologics B.V) y otro biosimilar de este, el CT-P13, en dos medicamentos bioidénticos entre ellos, Inflectra™ (Pfizer Europe MA EEIG) y Remsima (Celltrion Healthcare Hungary Kft); y una proteína de fusión-Fc, el ziv-aflibercept, en su medicamento innovador Zaltrap® (Bayer AG). Estos medicamentos se encuentran entre los más usados a nivel mundial, y en particular, en los hospitales españoles, por lo que fueron seleccionados para llevar a cabo la investigación presentada en esta Tesis Doctoral.

En el Capítulo I, se ha establecido un perfil indicador de la estabilidad fisicoquímica y funcional del anticuerpo monoclonal infliximab (Remicade®, medicamento innovador) y de su biosimilar CT-P13 (Remsima™ e Inflectra™, medicamentos bioidénticos), haciendo uso de un conjunto de técnicas analíticas: cromatografía de exclusión molecular con detección ultravioleta acoplada a espectrometría de masas en modo nativo (SE/UHPLC-UV(native)MS(Orbitrap)), para estudiar el perfil de oligómeros y de isoformas en estado nativo; dispersión dinámica de la luz (DLS), para estudiar el particulado de las disoluciones; espectropolarimetría de dicroísmo circular (DC) en el UV lejano, para estudiar las estructuras secundarias, incluido el porcentaje presente de las mismas; espectroscopia de fluorescencia intrínseca de triptófanos, para estudiar la estructura terciaria, el plegamiento o desplegamiento de la proteína; cromatografía líquida en fase reversa con detección ultravioleta (RP/UHPLC-UV), para cuantificar las proteínas, y ELISA indirecto, para estudiar la funcionalidad. Esta metodología fue puesta a punto y validada sometiendo las disoluciones de los medicamentos a distintas condiciones de degradación acelerada y controlada como temperatura elevada, luz visible, ciclos de congelación/descongelación, dilución en medio hipertónico de NaCl y dilución en

## RESUMEN

disolución desnaturizante fuerte como control negativo (cloruro de guanidinio). Los objetivos de dicho estudio fueron comparar la estabilidad frente a la degradación y la estabilidad de disoluciones clínicas de los medicamentos, así como validar los propios métodos como indicadores de la estabilidad, al ser capaces de detectar las modificaciones provocadas en las proteínas y sus disoluciones. Los resultados del presente trabajo demostraron que infliximab y CT-P13 se degradan de manera muy similar, presentando, ambos, niveles similares en cuanto a formación de agregados, variación estructural, y modificaciones químicas. Las disoluciones clínicas de ambos anticuerpos monoclonales demostraron estabilidad fisicoquímica y funcional durante un periodo mínimo de 14 días (el periodo de tiempo estudiado) independientemente de la concentración: 10.0, 2.0 y 0.4 mg/mL, y el material de almacenamiento (viales de vidrio o bolsas de poliolefina). En el caso de los estudios mediante ELISA, la funcionalidad de infliximab y CT-P13 se mantuvo durante 60 días.

En el capítulo II, se muestran los resultados de un estudio conformacional comprensivo llevado a cabo en la proteína de fusión-Fc ziv-aflibercept (Zaltrap®, medicamento innovador). El objetivo aquí, fue evaluar el impacto de la manipulación hospitalaria sobre su estabilidad fisicoquímica y funcional, además de la propia caracterización de la proteína, hecho en sí mismo de interés, ya que no hay prácticamente datos analíticos publicados sobre esta compleja proteína. Para ello, disoluciones del medicamento fueron sometidas a distintas condiciones de degradación acelerada y controlada como temperatura elevada, ciclos de congelación/descongelación, exposición a luz visible, variación del pH de la disolución, dilución en un medio hipertónico de NaCl y dilución en un medio desnaturizante fuerte, empleado este como control negativo (cloruro de guanidinio). Posteriormente, se llevó a cabo una caracterización fisicoquímica y funcional, que ha permitido evaluar la formación de oligómeros y particulado (cromatografía de exclusión molecular con detección ultravioleta (SE/HPLC-DAD) y dispersión dinámica de la luz (DLS), detectar cambios en las estructuras secundarias y terciarias (espectropolarimetría de dicroísmo circular (DC) en el UV lejano y espectroscopia de fluorescencia intrínseca de triptófanos, así como detectar alteraciones en la funcionalidad (mediante ELISA indirecto). De esta investigación se extrae que la agregación es la vía de degradación más importante en esta proteína,

habiéndose detectado en la mayor parte de las disoluciones sometidas a estreses controlados. Se han detectado dímeros (muestras sometidas a la acción de la luz visible) y agregados de alto peso molecular (detectados principalmente en las muestras sometidas a un aumento de la temperatura). A estos últimos se les ha atribuido estructuras de tipo  $\beta$ -amiloide, hecho que fue confirmado por técnicas complementarias como distintos ensayos de unión (ensayo de tioflavina T y Congo Red) y microscopia de transmisión de electrones (TEM, Transmission Electron Microscopy). Este tipo de estructura ha sido puesta de manifiesto por vez primera en este trabajo, y es distintiva de esta proteína de fusión, ya que no se ha detectado en otras proteínas terapéuticas basadas en IgG. En cuanto a las estructuras secundarias, estas se mantuvieron inalteradas salvo en las muestras sometidas a la acción del cloruro de guanidinio. Las estructuras terciarias se vieron afectadas en distinto grado (principalmente por aumento de la temperatura, exposición a la luz visible y acción del cloruro de guanidinio, salvo en las muestras sometidas a ciclos de congelación/descongelación. Por último, la funcionalidad se mantuvo en general, observándose sólo una disminución significativa en muestras estresadas por luz.

En el capítulo III, se muestran los resultados de un estudio de estabilidad en el tiempo de disoluciones clínicas de ziv-aflibercept (Zaltrap<sup>®</sup>, medicamento innovador). El objetivo fue evaluar la estabilidad fisicoquímica y funcional de disoluciones clínicas del mismo, preparadas y almacenadas en condiciones de uso hospitalario, esto es, en bolsas de poliolefina a las concentraciones intermedia (4mg/mL) y baja (0,6 mg/mL), que vienen indicadas en su correspondiente ficha técnica para ser administradas por vía intravenosa a los pacientes. El estudio de estabilidad se llevó a cabo en condiciones de oscuridad durante 14 días, almacenadas las muestras refrigeradas a 2-8°C. En esta investigación, quedó demostrada la estabilidad fisicoquímica y funcional de dichas disoluciones durante el periodo de tiempo estudiado, en cuanto a formación de oligómeros y particulado (mediante cromatografía de exclusión molecular con detección ultravioleta (SE/HPLC-DAD) y dispersión dinámica de la luz (DLS); cambios en las estructuras secundarias y terciarias (espectropolarimetría de dicroísmo circular (DC) en el UV lejano y espectroscopia de fluorescencia intrínseca de triptófanos); cambios en el perfil de variantes de carga (cromatografía líquida de intercambio catiónico fuerte con

## RESUMEN

detección ultravioleta (SCX/UHPLC-UV), y funcionalidad (mediante evaluación de la actividad biológica por ELISA indirecto).



# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## Hipótesis

Los anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión-Fc terapéuticos se presentan como una clase de biofármacos novedosa y eficaz, con unas características singulares y diferentes a las de los fármacos de síntesis química. Su naturaleza proteica, así como sus métodos de producción, los convierten en agentes terapéuticos frágiles y costosos. A pesar de estar actualmente bien establecidos en el tratamiento de enfermedades graves y de amplia difusión como el cáncer o distintos trastornos autoinmunes entre otras, sigue habiendo una gran preocupación en cuanto a su estabilidad, la cual es fundamental para que el biofármaco sea seguro y eficaz. Estas macromoléculas terapéuticas son muy sensibles a la degradación física y química, pudiendo sufrir modificaciones durante su desarrollo, producción, transporte, almacenamiento y administración al paciente. En general, los laboratorios farmacéuticos no suelen garantizar a las preparaciones hospitalarias estabilidades superiores a 24 h. Debido al elevado coste de estos medicamentos, y al excedente diario -ya que muchos de ellos se administran por peso de paciente- que es desechado debido al corto periodo de uso indicado por el laboratorio fabricante para las preparaciones farmacéuticas de uso clínico, así como para el sobrante del propio medicamento, se plantea que una extensión en el uso de las preparaciones farmacéuticas y de los propios sobrantes supondría un ahorro significativo a los sistemas sanitarios, consiguiendo una mayor eficiencia de los tratamientos.

Por tanto, el disponer de datos rigurosos sobre la estabilidad de los sobrantes de estos medicamentos y de sus preparaciones farmacéuticas en condiciones de uso clínico, tanto del impacto de su manipulación hospitalaria así como de su posibilidad de extender el tiempo de uso indicado por el laboratorio farmacéutico, beneficiaría a la sostenibilidad de los Sistemas Sanitarios Públicos, ya que mejoraría la eficiencia de los tratamientos que emplean estos medicamentos de gran impacto en las facturas farmacéuticas nacionales.

En base a esta hipótesis se plantean los siguientes objetivos.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### Objetivos

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es desarrollar estrategias analíticas comprensivas, esto es, determinar el perfil indicador de la estabilidad de medicamentos biotecnológicos (anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión-Fc), que permita evaluar su estabilidad fisicoquímica y funcional para resolver problemas reales en ámbito hospitalario, como es evaluar la extensión de uso de los sobrantes y de sus preparaciones farmacéuticas, además de evaluar el impacto de la manipulación hospitalaria sobre los mismos. Se han seleccionado tres proteínas terapéuticas comerciales para su estudio: el anticuerpo monoclonal infliximab (Remicade<sup>®</sup>, medicamento innovador), su biosimilar CT-P13 (Remsima<sup>™</sup> e Inflectra<sup>™</sup>, medicamentos bioidénticos) y la proteína de fusión-Fc ziv-aflibercept (Zaltrap<sup>®</sup>, medicamento innovador). Estas proteínas terapéuticas han sido seleccionadas en base a su amplio consumo a nivel hospitalario, por lo que son ampliamente manipuladas y generan importantes sobrantes.

Para la consecución del objetivo general se han planteado una serie de objetivos específicos que se satisfacen en los capítulos descritos en la Tesis Doctoral:

- Puesta a punto y validación de métodos de espectropolarimetría de Dicroísmo Circular (DC) en el UV lejano para caracterizar las estructuras secundarias de infliximab, CT-P13 y ziv-aflibercept en sus disoluciones acuosas de uso hospitalario.
- Puesta a punto y validación de métodos de Espectroscopia de Fluorescencia Intrínseca de Triptófanos (IT-FS) para caracterizar las estructuras terciarias de infliximab, CT-P13 y ziv-aflibercept en sus disoluciones acuosas de uso hospitalario.
- Puesta a punto y validación de métodos de Dispersión Dinámica de la Luz (DLS) para caracterizar el particulado de las disoluciones acuosas de infliximab, CT-P13 y ziv-aflibercept.
- Puesta a punto y validación de métodos de cromatografía líquida analítica (HPLC-DAD) y UHPLC-(UV)-ESI(MS(Orbitrap)) para caracterizar el perfil de isoformas (Size Exclusion, SE), oligómeros (SE), variantes de carga (Strong Cation Exchange,

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

SCX) y para cuantificar disoluciones acuosas de infliximab, CT-P13 y ziv-aflibercept (RP y SE).

- Puesta a punto y validación de métodos ELISA para caracterizar la funcionalidad de infliximab, CT-P13 y ziv-aflibercept en sus disoluciones acuosas de uso hospitalario.
- Evaluar y comparar la estabilidad fisicoquímica frente a la degradación de infliximab innovador (Remicade®) y CT-P13, su biosimilar (Inflectra™/Remsima™).
- Evaluar la estabilidad fisicoquímica y funcional de disoluciones de infliximab innovador (Remicade®) almacenadas en condiciones de uso hospitalario.
- Evaluar la estabilidad fisicoquímica y funcional de disoluciones del biosimilar CT-P13 (Inflectra™/Remsima™) almacenadas en condiciones de uso hospitalario.
- Comparar la estabilidad fisicoquímica y funcional de disoluciones de infliximab (Remicade®, medicamento innovador) y su biosimilar CT-P13 (Remsima™ e Inflectra™, medicamentos bioidénticos), preparadas y almacenadas en condiciones de uso hospitalario.
- Caracterizar comprensivamente la proteína ziv-aflibercept mediante la obtención de datos analíticos de sus atributos críticos de la calidad.
- Evaluar el impacto de la manipulación hospitalaria de ziv-aflibercept (Zaltrap®) sobre su estabilidad fisicoquímica y funcional mediante estudios de degradación controlada.
- Evaluar la estabilidad fisicoquímica y funcional de disoluciones de ziv-aflibercept (Zaltrap®), preparadas y almacenadas en condiciones de uso hospitalario.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

# INTRODUCCIÓN

---

## INTRODUCCIÓN

## 1. Medicamentos biotecnológicos

Tradicionalmente, la mayoría de los fármacos que se usaban para tratar enfermedades humanas eran pequeñas moléculas sintetizadas químicamente por empresas farmacéuticas, en general, bien establecidas (Evens & Kaitin, 2015). A principios de los años 80, pequeñas empresas biotecnológicas empezaron a investigar sobre moléculas grandes, habiéndose dado un aumento exponencial en el desarrollo y uso de fármacos biológicos en el ámbito médico, y sustituyendo de manera paulatina a los medicamentos convencionales (Waters & Urquhart, 2019). Esto vino acompañado de la creación de más de 4000 empresas biotecnológicas, unas ventas globales asociadas al sector superiores a 175 mil millones de dólares en 2013 (Evens & Kaitin, 2015) y 228 mil millones de dólares en 2016 (Moorkens, Meuwissen, et al., 2017). Se estima que en 2020 se hayan generado unas ganancias de 290 mil millones de dólares. Según estimaciones de EvaluatePharma (Waters & Urquhart, 2019), las ventas del sector biofarmacéutico pasarán de representar un 28% en 2018 a un 32% en 2024.

Un medicamento biológico es aquel cuyo principio activo es un compuesto biológico, es decir, sintetizado por o extraído de una fuente biológica y que requiere para su caracterización y determinación de la calidad, ensayos fisicoquímicos y biológicos, así como el control de su proceso de producción (*DIRECTIVA 2001/83/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 6 de Noviembre de 2001 Por La Que Se Establece Un Código Comunitario Sobre Medicamentos Para Uso Humano*, 2001). Esta definición también engloba a los medicamentos biotecnológicos. Se habla de medicamentos biológicos al hacer referencia a principios activos obtenidos a partir de material biológico como: fluidos, tejidos animales, tejidos humanos o microorganismos (Rodríguez Cumplido & Asensio Ostos, 2018). Los hemoderivados, productos inmunológicos como sueros o vacunas y alérgenos son ejemplos de medicamentos biológicos.

Por tanto, un subgrupo dentro de los medicamentos biológicos, son los medicamentos biotecnológicos. El reglamento nº726/2004 de la Unión Europea define medicamento biotecnológico (Matar, 2008) como aquel obtenido mediante la tecnología del ADN recombinante o de la expresión controlada de genes que codifican proteínas biológicamente activas en procariotas o eucariotas, incluyendo células de

## INTRODUCCIÓN

mamífero transformadas u obtenidas a partir de hibridomas o que emplean anticuerpos monoclonales durante su producción. Se denomina biofármaco al principio activo de un medicamento biotecnológico, y generalmente a día de hoy, es una proteína.

### 1.1. Características de los biofármacos vs fármacos de síntesis química

El proceso de producción de los biofármacos -entendido este como el principio activo de un medicamento biotecnológico- es complejo, lo que da lugar a productos cuyas características y propiedades están estrechamente ligadas al proceso de producción: “el producto es el proceso” (Vulto & Jaquez, 2017). Esto hace que su análisis, caracterización, y producción, sean mucho más complejos que en el caso de los fármacos de síntesis química.

Al tratarse de macromoléculas, estos fármacos presentan propiedades fisicoquímicas diferentes a las de las moléculas pequeñas sintetizadas químicamente. La complejidad de los biofármacos reside en sus propiedades físicas, químicas, biológicas y microbiológicas. Estas propiedades son definidas como atributos de la calidad, presentando estos numerosos atributos. Un gran número de ellos puedan llegar a afectar a la seguridad y eficacia de los mismos, los **atributos críticos de la calidad** (Rathore & Winkle, 2009). Entre ellos se encuentran: la estructura primaria, secundarias y terciaria de la proteína; agregados proteicos; modificaciones post traduccionales como las variantes de carga o el perfil de glicosilación, etc.; concentración final de proteína, unión a receptores Fc neonatales (FcRn) y receptores Fc gamma (FcRγ); unión a la proteína C1q del complemento; activación de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); activación de la citotoxicidad mediada por complemento (CDC), o la presencia de impurezas del proceso de producción como proteínas y ADN de las células productoras (impurezas procedentes del hospedador).

Frente a los fármacos de síntesis química, los biofármacos presentan diferencias a 5 niveles principalmente: estructura, tamaño, proceso de fabricación, farmacocinética y mecanismo de acción.



- **Diferencias asociadas al tamaño.** Un mayor peso molecular en el caso de los biofármacos frente al tamaño mucho menor de los fármacos de síntesis química. Así, un anticuerpo monoclonal y la hormona de crecimiento humano tienen un peso respectivo aproximado de 146 y 22 KiloDalton (KDa), mientras que la penicilina G o el paracetamol tienen un tamaño de 0,3 y 0,15 KDa respectivamente (Strohl & Strohl, 2012a).
- **Diferencias asociadas a la composición.** Los biofármacos son en su mayoría proteínas, mientras que los de síntesis química son generalmente compuestos orgánicos.
- **Diferencias asociadas a la estructura.** Los biofármacos presentan estructuras más complejas, siendo sus principios activos heterogéneos frente a la homogeneidad de los principios activos obtenidos por síntesis química. Como ejemplo más representativo, está el caso de las microheterogeneidades presentes en los anticuerpos monoclonales (H. Liu et al., 2008), resultado de modificaciones postraduccionales procedentes del proceso de producción, que da lugar a distintas variantes del mismo principio activo. La mayor complejidad estructural se traduce en una mayor dificultad para ser caracterizados estructuralmente. Se requiere de métodos analíticos complejos para el análisis de los distintos atributos críticos de la calidad. Su naturaleza proteica -en una gran mayoría de casos-, los convierte en macromoléculas frágiles e inestables que requieren de condiciones especiales de transporte y almacenamiento.
- **Diferencias asociadas a la vía de administración.** Los biofármacos suelen administrarse por vía intravenosa o subcutánea debido a que, por su naturaleza proteica, la vía oral repercutiría negativamente en su biodisponibilidad. Los fármacos de síntesis química, en cambio, suelen administrarse por vía oral. En consecuencia, los biofármacos suelen administrarse en los hospitales por personal formado y especializado.
- **Diferencias asociadas a la farmacocinética.** La distribución por el organismo es diferente: en el caso de los fármacos de síntesis química, su distribución es prácticamente cualquier combinación “tejido/órgano”; en el caso de los biofármacos, su distribución se limita al plasma y líquido intersticial

## INTRODUCCIÓN

(Samanen, 2013). El metabolismo también varía: los fármacos de síntesis química se metabolizan en el hígado e intestino por los citocromos a metabolitos no activos y activos, mientras que los biofármacos son degradados por proteasas a péptidos y aminoácidos. Sus vidas medias en el torrente sanguíneo varían: los biofármacos presentan unas vidas medias que van desde horas a semanas, mientras que los de síntesis química de horas a días (Carton & Strohl, 2013).

- **Diferencias asociadas a la farmacodinamia.** Los fármacos de síntesis química tienden a imitar o interrumpir la unión del ligando a su receptor o enzima. Los biofármacos pueden interactuar con el receptor, pueden ser el ligando (terapia de reemplazamiento hormonal), unirse al ligando, pueden ser un receptor soluble (terapia señuelo) o también pueden ser enzimas (Samanen, 2013).
- **Diferencias asociadas al modo de producción.** Para producir biofármacos, se precisa de material biológico: células vivas, mientras que los químicos se producen por síntesis orgánica. La fragilidad de las macromoléculas biológicas y la sensibilidad de las células que las producen exigen unos seguimientos estrictos y complejos durante etapas como la fermentación, procesamiento aséptico, almacenamiento y análisis (Morrow & Felcone, 2004). Los biofármacos son sensibles a pequeños cambios en el proceso de producción, mientras que los químicos no suelen verse afectados. Además, el proceso de purificación es sencillo en el caso de los fármacos de síntesis química y complejo y laborioso en el caso de los biofármacos. Las impurezas presentes en los fármacos de síntesis química son generalmente evitables y se pueden detectar y eliminar con facilidad. Sin embargo, esto no ocurre en el caso de los biofármacos: las impurezas son frecuentes y difíciles de detectar y eliminar (Sekhon & Saluja, 2011).
- **Diferencias asociadas a sus versiones copia.** Se pueden generar versiones idénticas de los fármacos de síntesis química: los genéricos. En cambio, no se pueden obtener copias idénticas de los biofármacos, solamente puede lograrse cierta similitud, de ahí que se denominen biosimilares. Los genéricos son rápidamente intercambiables por sus medicamentos de referencia, en

cambio, esto no ocurre con los biosimilares; no podrían ser intercambiables de forma inmediata, pues se requerirían estudios adicionales. A pesar de esto, la experiencia indica que el cambio entre un medicamento de referencia por su biosimilar es improbable que genere o aumente inmunogenicidad y/o cambios en el perfil de eficacia y seguridad (Kurki et al., 2017).

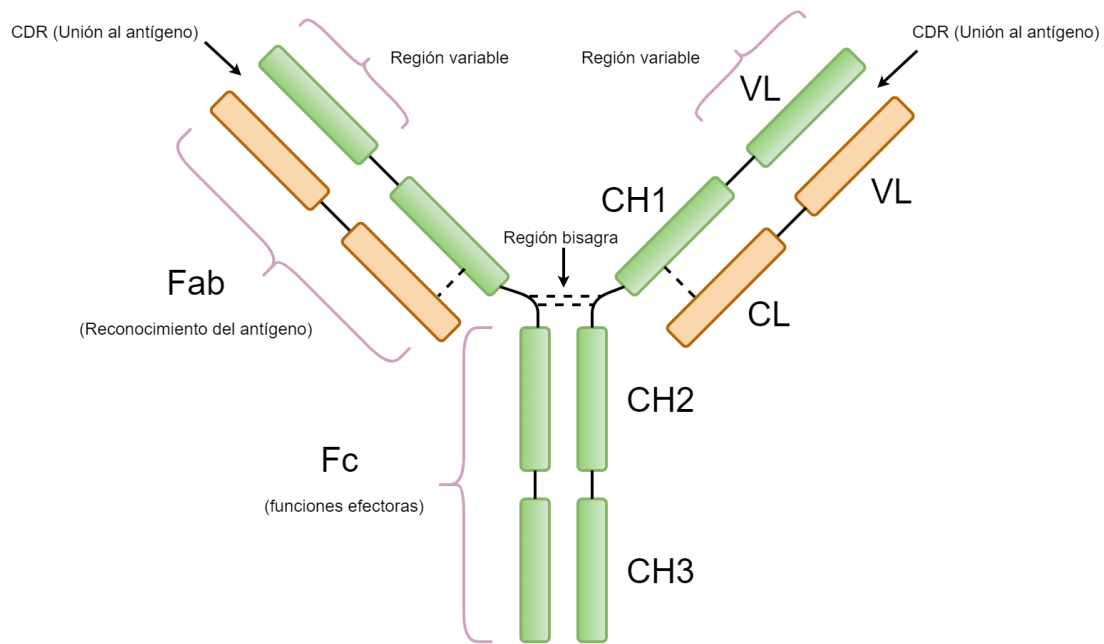
Los biofármacos presentan ciertas ventajas y desventajas frente a los de síntesis química. Como ventajas pueden destacarse el no presentar interacciones con otros fármacos, no ser carcinógenos, poseer mejores predicciones farmacocinéticas o presentar mayores tasas de éxito durante etapas de desarrollo clínico I-III entre otras. Sin embargo, también conllevan ciertas desventajas como son el elevado coste de producción, el elevado riesgo de generar inmunogenicidad o el limitado número de moléculas diana frente a las que pueden ir dirigidos (Ltd, 2008).

## **2. Anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión-Fc terapéuticos**

### **2.1. Aspectos estructurales de los anticuerpos monoclonales: IgG y subtipos**

Una inmunoglobulina (Ig) es una glicoproteína formada por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras idénticas entre ellas y unidas mediante puentes disulfuro, adquiriendo forma característica de Y, tal y como se representa en la figura 1.

## INTRODUCCIÓN



**Figura 1.** Estructura de una molécula de inmunoglobulina. **CH**, dominio constante pesado; **CL**, dominio constante ligero; **VL**, dominio variable ligero; **CDR**, región determinante de la complementariedad; **Fab**, fragmento de unión al antígeno; **Fc**, fragmento cristalizable.

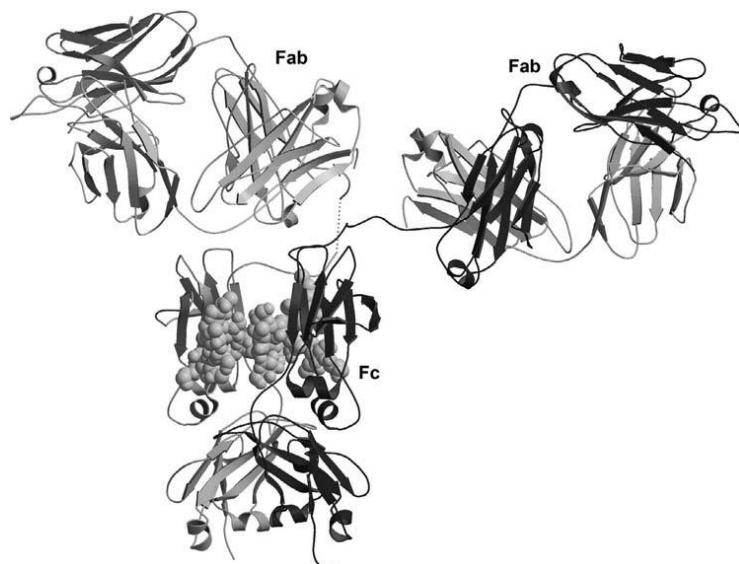
Las inmunoglobulinas ejercen dos funciones fundamentales: por un lado, de reconocimiento y unión a antígenos, que es realizado por las regiones amino terminales de las cadenas, Fab (Fragment antibody binding); y por otro lado, una función efectora, realizada por los extremos carboxilo terminales de las cadenas pesadas, Fc (Fragment crystallizable).

Las cadenas poseen regiones variables y constantes. Así, las cadenas ligeras poseen porciones variables implicadas en la especificidad, y porciones constantes que son diferentes en función del tipo de cadena, kappa o lambda. Las pesadas poseen, igualmente, regiones variables y constantes, habiendo de estas últimas 5 tipos:  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ , que formarán respectivamente las inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas están yuxtapuestas para formar el sitio de unión al antígeno. De esta manera, cada inmunoglobulina posee dos sitios de unión al antígeno; se trata de moléculas homodiméricas.

Las inmunoglobulinas se subdividen en dominios de aproximadamente 110 aminoácidos, habiendo un total de 12 dominios en cada una. El fragmento Fab está

## INTRODUCCIÓN

subdividido en ocho dominios: dos variables de la cadena ligera VL, dos dominios variables de la cadena pesada VH, dos constantes de la cadena ligera CL y dos constantes de la cadena pesada CH. Los dominios variables, como su propio nombre indica, poseen una gran diversidad de secuencias, mientras que los dominios constantes están altamente conservados. La fracción Fc, a su vez, posee cuatro dominios constantes, dos CH2 y dos CH3. Cada dominio de inmunoglobulina está formado por 7 o 9 cadenas  $\beta$  formando dos hojas  $\beta$  que forman un motivo de “llave griega” formando un barril  $\beta$ , con un enlace disulfuro altamente conservado conectando ambas hojas en el núcleo del barril. Un dominio constante posee siete láminas  $\beta$ , mientras que un dominio variable posee nueve tal como se muestra en la figura 2. Las regiones Fab y Fc están unidas por una región bisagra que le aporta flexibilidad a la molécula y permite un acoplamiento espacial adaptable. También hay cierta flexibilidad entre los dominios de la región Fab, los dominios constantes y variables pueden moverse el uno con respecto del otro, habiéndose determinado un ángulo de entre 117 y 227 grados (Stanfield & Wilson, 2009).



**Figura 2.** Estructura de una inmunoglobulina IgG obtenida por cristalografía de rayos X (Stanfield & Wilson, 2009).

## INTRODUCCIÓN

La porción Fab reconoce al antígeno en un sitio formado por seis segmentos polipeptídicos siendo denominado región determinante de la complementariedad (CDR), que forman bucles. Tres de ellos están contribuidos por el dominio VH (H1, H2 y H3) y los tres restantes por el dominio VL (L1, L2 y L3).

Mientras que los bucles CDR son las regiones más variables de la región Fab (tanto en secuencia como en estructura), se ha demostrado que cinco de los 6 bucles tienen un número limitado de conformaciones, las denominadas conformaciones canónicas, que pueden determinarse con precisión. De entre todos los bucles, H3 es el más variable de los seis en secuencia y longitud, siendo el más variable en estructura y el más flexible.

La mayoría de las inmunoglobulinas encontradas en el suero son de tipo G, siendo estas las que se describen en este apartado. Las inmunoglobulinas G son unas de las proteínas más abundantes en el suero, representando entre el 10-20% del total de proteínas plasmáticas. Las IgG están involucradas en diversas funciones de la inmunidad humoral como neutralización de antígenos, activación del complemento, CDC, opsonización para activar la fagocitosis, ADCC y reacciones de hipersensibilidad (Gudelj et al., 2018). Las IgG pueden, a su vez, dividirse en varios tipos: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Se diferencian en aspectos como: estructura, vida media, cantidad en el suero, abundancia relativa, respuesta a antígenos, activación del complemento o unión a receptores entre otras. Estructuralmente, se hallan diferencias principalmente en la región bisagra y en los residuos de superficie de los dominios CH1, CH2 y CH3. Las grandes diferencias asociadas a esta región son las responsables de las distintas propiedades de cada una tales como su estabilidad o flexibilidad. Por ejemplo, IgG3 es la que menor vida media presenta (7 días) frente a las demás (21 días). Presentan también diferencias en cuanto a la respuesta frente a antígenos: la IgG2 es la que principalmente se une a polisacáridos bacterianos, mientras que la IgG4 es activada fuertemente por alérgenos. IgG1 e IgG3 inducen una alta activación de las funciones efectoras: complemento y/o unión a receptores Fc, mientras que IgG4 no activa el complemento (Muhammed, 2020). En la tabla 1 quedan resumidas algunas de las propiedades de los distintos subtipos de IgG.

Tabla 1. Características de los 4 tipos de inmunoglobulinas G.

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Masa molecular	146	146	170	146
Aminoácidos en la región bisagra	15	12	62	12
Puentes disulfuro inter catenarios de la cadena pesada	2	4	11	2
Activación del complemento por C1q	++	+	+++	-
FcγRI	650	-	610	340
FcγRIIa-H131	52	4.5	8.9	1.7
FcγRIIa-R131	35	1	9.1	2.1
FcγRIIb	1.2	0.2	1.7	2
FcγRIIIa-V158	20	0.7	98	2.5
FcγRIIIa-F158	11.7	0.3	77	2

La mayoría de los anticuerpos monoclonales terapéuticos aprobados son de tipo IgG1, seguidos por IgG2 e IgG4. La preferencia de una u otra depende de si determinadas funciones efectoras son requeridas en el anticuerpo monoclonal, de aspectos estructurales, así como también de la disponibilidad de la compañía farmacéutica. Los subtipos 1, 2 y 4 se usan para tratar enfermedades crónicas debido a su mayor vida media con respecto a 3. La IgG3 posee una región bisagra muy inestable lo cual la hace muy proclive a la agregación.

La IgG1 es la que con mayor frecuencia se utiliza debido a la mayor estabilidad frente a IgG2 en la región bisagra, en cambio similar a IgG4. La preferencia de IgG1 frente a IgG4 es su mayor concentración en el plasma. Además, la IgG1 tiene poca tendencia a

## INTRODUCCIÓN

la agregación, lo cual la convierte en una opción preferente. La IgG1 es también una opción preferente debido a que su región Fc es capaz de desencadenar fuertemente funciones efectoras por unión a receptores Fc y a la proteína C1q del complemento (tabla 1). Por otro lado, IgG2 es seleccionada cuando se desea neutralizar antígenos solubles con funciones efectoras disminuidas. IgG4 no se une a C1q, lo cual se convierte en una alternativa terapéutica útil cuando no se requiere el reclutamiento de las funciones efectoras.

Una de las principales desventajas de los anticuerpos monoclonales terapéuticos es su elevado tamaño, su escasa penetración en los tejidos por impedimentos estéricos como en el caso de ciertos tumores o su costosa producción (AlDeghaither et al., 2015). Las técnicas de ingeniería de anticuerpos han permitido en los últimos años modificarlos, modulando aspectos como la inmunogenicidad, tamaño, valencia, afinidad por el antígeno y las interacciones de la región Fc. Esto ha dado lugar a la creación de numerosas variantes estructurales. Los fragmentos de anticuerpos se presentan como una posible alternativa para superar los inconvenientes expuestos. Estos fragmentos mantienen la especificidad al antígeno, pero presentan propiedades diferentes que los hacen idóneos en el diagnóstico y tratamiento de determinadas enfermedades, presentando mejores distribuciones en tejidos, por ejemplo, pudiendo atravesar la barrera hematoencefálica para así poder tratar tumores intracraneales. Al carecer de Fc, no requieren modificaciones postraduccionales, pudiendo recurrir a sistemas de expresión más sencillos, como los procariotas. Finalmente, al no reclutar las funciones efectoras en el organismo, minimizan los efectos adversos asociados a dichos eventos.

Hay una gran diversidad de formatos de fragmentos de anticuerpos. Por un lado, están los fragmentos de anticuerpos naturales como F(ab')<sub>2</sub>, Fab o Fv (Fragment variable). Ranibizumab es un ejemplo de biofármaco tipo Fab. Este fragmento de anticuerpo humanizado está indicado en el tratamiento de afecciones oculares como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) neovascular (exudativa) o la alteración visual debida al edema macular diabético entre otras (European Medicines Agency - EMA, 2007). Por otro lado, están los fragmentos modificados por ingeniería genética, que incluyen entre otros: scFv (single chain Fragment variable), dicuerpos, tricuerpos, tetracuerpos, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos o nanocuerpos (Kholodenko et al.,



2019). Blinatumomab es un ejemplo de anticuerpo monoclonal múrido captador de células T biespecífico, que está indicado en adultos en monoterapia para el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda (LLA) de precursores B CD19 positivo y en situación refractaria o en recaída (European Medicines Agency - EMA, 2006a).

### **2.2. Infliximab y biosimilar CT-P13**

Infliximab es un anticuerpo monoclonal IgG1 quimérico, principio activo del medicamento innovador Remicade<sup>®</sup>, aprobado en terapia en 1999. Ha sido objeto de estudio en esta Tesis Doctoral. El infliximab se une a la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral alfa), haciéndolo con una elevada afinidad. Se une a las formas solubles y transmembrana del TNF- $\alpha$ , neutralizando su actividad biológica en el organismo. Sus indicaciones terapéuticas incluyen el tratamiento de la artritis reumatoide, enfermedad de Crohn en adultos y en pediatría, colitis ulcerosa, colitis ulcerosa en pediatría, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica y psoriasis. Este medicamento es producido en células de hibridoma múrido mediante tecnología del ADN recombinante, y se presenta como polvo para concentrado para solución para perfusión (polvo para concentrado) en viales de vidrio. Cada vial contiene 100 mg del principio activo junto con los excipientes sacarosa, polisorbato 80, fosfato sódico monobásico y fosfato sódico dibásico (European Medicines Agency - EMA, 1999b)

CT-P13 (Remsima<sup>™</sup> e Inflectra<sup>™</sup>, medicamentos bioidénticos) es un biosimilar de infliximab. Ha sido objeto de estudio en esta Tesis Doctoral. Su forma farmacéutica, composición y fuerza es idéntica a la de Remicade<sup>®</sup> (European Medicines Agency - EMA, 2013b, 2013a), presentando la misma ruta de administración. CT-P13 recibió aprobación para su uso en terapia humana en 2013, para las mismas indicaciones que infliximab. CT-P13 ha demostrado, por medio de un ejercicio de caracterización extensivo, la similitud con respecto a infliximab mediante ensayos bioanalíticos, preclínicos y clínicos (McKeage, 2014). CT-P13 ha demostrado niveles similares y comparables de eficacia, seguridad, inmunogenicidad y tolerancia con respecto a infliximab (ver Anexo).

### **2.3. Aspectos estructurales de las proteínas de fusión-Fc**

## INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, los avances en técnicas de clonación molecular y de ingeniería de anticuerpos, han permitido la generación de moléculas quiméricas, las proteínas de fusión-Fc terapéuticas (Rath et al., 2015).

Mientras que la región Fab de un anticuerpo es responsable de la unión al antígeno y de su especificidad frente a una diana determinada, la región Fc es responsable de la larga vida media debido a unión a FcRn (Goulet & Atkins, 2020), y de las funciones efectoras como ADCC, CDC y fagocitosis. El potencial terapéutico que ofrecen enzimas, citoquinas, receptores, componentes sanguíneos y péptidos puede explotarse si se unen a la región Fc de una inmunoglobulina G, al aportar nuevas propiedades físicas y biológicas. Hay actualmente varios biofármacos aprobados basados en este tipo de construcciones, que se usan en el tratamiento de cánceres, trastornos autoinmunes y enfermedades sanguíneas (Jafari et al., 2017). La IgG representa aproximadamente el 85% de todos los tipos de inmunoglobulinas, y es la más utilizada en terapia. Es la inmunoglobulina preferentemente utilizada debido a su elevada vida media y su capacidad para reclutar funciones efectoras. En proteínas de fusión-Fc, el péptido o proteína de interés (ligando, dominio extracelular de un receptor soluble, etc.), son fusionados a la región Fc, principalmente para beneficiarse del aumento de su vida media (Beck & Reichert, 2011).

Las proteínas de fusión-Fc pueden clasificarse en cuatro grupos en función de su configuración molecular. Se clasifican atendiendo a su especificidad al ligando (unión a uno o a varios epítopos de la molécula ligando) y valencia (la estequiometría de unión al ligando) (figura 3)(Linderholm & Chamow, 2014).

### ➤ ***Moléculas con especificidad única en construcción bivalente***

A este grupo pertenecen fármacos como alefacept (figura 3), abatacept o belatacept. Se trata de homodímeros bifuncionales, es decir, poseen dos sitios de unión al ligando con especificidad única, contruidos con un único dominio extracelular del receptor. Se comportan como antagonistas. Alefacept es el primer biofármaco aprobado de este grupo para tratar la psoriasis de placas de moderada a grave. Se compone del primer dominio extracelular del receptor LFA-3 fusionado a la región Fc de una IgG1.

Este fármaco interfiere en la activación de linfocitos T al unirse específicamente al receptor CD2 de linfocitos (Food and Drug Administration - FDA, 2003).

### ➤ ***Traps (especificidad múltiple en construcción monovalente)***

Dentro de este grupo se encuentran los fármacos rilonacept y aflibercept (figura 4). Aflibercept ha sido objeto de estudio en esta Tesis Doctoral. Son moléculas homodiméricas constituidas por dominios multiligando en los que múltiples dominios de unión al ligando de un receptor se fusionan en un único gen seguido de la región Fc (C. Huang, 2009). Están diseñados para que solo posean un sitio de unión, de tal manera que atrapan una molécula entre las dos cadenas. Se trata, por lo tanto, de construcciones monovalentes que actúan como antagonistas. Los *traps* han demostrado ser muy potentes, con IC50 en el rango de picomolar, en ensayos celulares in vitro (Economides et al., 2003). Rilonacept es un fármaco dentro de este grupo, que se emplea para tratar una rara enfermedad autoinflamatoria llamada síndrome periódico asociado a criopirina. Esta construcción atrapa la interleucina IL-1 $\beta$  soluble mediante sus dos dominios extracelulares de su receptor IL-1RI y IL-1RAcP, evitando así la interacción con los receptores endógenos.

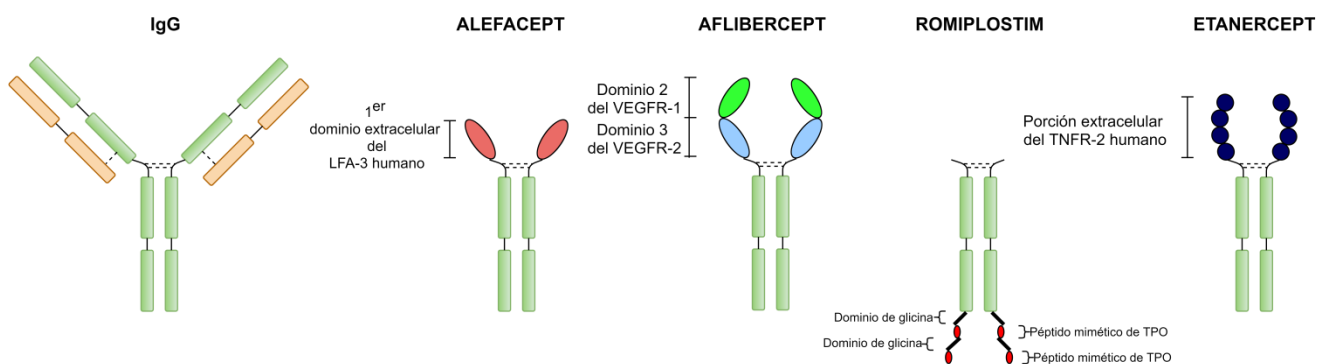
### ➤ ***Cuerpos peptídicos (especificidad única en construcción multivalente)***

Dentro de este grupo se encuentra romiplostim (figura 3) (Cines et al., 2008). Se trata de una molécula peptídica homodimérica que es específica para un único ligando. Para su construcción, múltiples copias del péptido mimético de trombopoyetina (TPO), se fusionan en serie al extremo C terminal de la región Fc de una IgG1. El péptido de 14 aminoácidos se une al receptor de trombopoyetina o CMpl, imitando el efecto que produce TPO. Hay un total de 4 péptidos separados por uniones de varias unidades de glicina flexibles. Actúa como agonista del TPO, activando distintas cascadas de señalización intracelular para aumentar la producción de plaquetas. Fue aprobado en terapia en 2008 para el tratamiento de pacientes con púrpura trombocitopénica inmune crónica a partir de un año de edad, que sean refractarios a otros tratamientos (European Medicines Agency - EMA, 2009).

### ➤ ***Moléculas con especificidad única en construcción monovalente***

## INTRODUCCIÓN

Un ejemplo de este tipo de construcción es etanercept (figura 3). Este fármaco neutraliza el TNF tanto unido a la membrana como soluble, y está constituido por el dominio extracelular del receptor II de TNF $\alpha$  fusionado a la región Fc de una IgG1, en una construcción homodimérica con una estequiometría de unión 1:1 monovalente. Fue aprobado por la FDA en 1998 para el tratamiento de la artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, artritis idiopática juvenil y psoriasis de placas (European Medicines Agency - EMA, 2006b).



**Figura 3.** Diferentes formatos estructurales de las proteínas de fusión-Fc en comparación con una inmunoglobulina G: ejemplos de fármacos aprobados en terapia.

### 2.4. Ziv-aflibercept

Ziv-aflibercept es una proteína de fusión-Fc terapéutica, principio activo del medicamento innovador Zaltrap<sup>®</sup>, aprobado en terapia en 2013. Estructuralmente, se trata de una glicoproteína homodimérica que consiste en la porción Fc de una inmunoglobulina IgG1 a la que se han unido los dominios 1 y 2 del receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR1 y VEGFR2), presentando un peso molecular de 97 kDa, al que hay que sumar el peso correspondiente de los glicanos, que contribuyen un 15%, con un peso final de 115 KDa aproximadamente.

Ziv-aflibercept actúa como un receptor señuelo soluble que se une al VEGF-A con mayor afinidad que sus receptores nativos, así como a los ligandos PlGF (factor de crecimiento placentario) y VEGF-B. Al actuar como trampa de ligandos, ziv-aflibercept impide la unión de los ligandos endógenos a sus receptores afines y, por tanto, bloquea

la señalización mediada por los receptores. Se emplea, en combinación con quimioterapia con irinotecan/5-fluorouracilo/ácido folínico (FOLFIRI), en el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico que es resistente o que ha progresado tras un régimen de oxaliplatino. Este medicamento es producido en células de ovario de hámster chino (CHO) mediante tecnología del ADN recombinante, y se presenta como concentrado para solución para perfusión a la concentración de 25 mg/mL en dos formatos: viales de 8 y 4 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 (para ajustar el pH) y agua para preparaciones inyectables (European Medicines Agency - EMA, 2013c).

### **3. El uso de los medicamentos biotecnológicos en hospitales: la práctica clínica**

#### **3.1. Impacto de la manipulación sobre la estabilidad de los medicamentos biotecnológicos**

Los fabricantes de los medicamentos biotecnológicos son responsables del correcto almacenamiento y transporte desde su lugar de producción hasta el lugar de destino, los cuales están muy bien establecidos y quedan asegurados y validados por medio de una documentación concreta. La industria biofarmacéutica ha realizado un gran esfuerzo en la mejora de los procesos de producción de los fármacos basados en proteínas, con objeto de incrementar y preservar la calidad de estos durante etapas de producción, almacenamiento y transporte (Nejadnik et al., 2018). A pesar de estas consideraciones, una vez que son registrados en las farmacias hospitalarias, hay poco control sobre la diversidad de condiciones que pueden afectar a la estabilidad, y por lo tanto, a la calidad de estos fármacos. Una vez allí, es responsabilidad del farmacéutico el almacenamiento, preparación, transporte y dispensación de estos (Krämer et al., 2008; Sindelar, 2019). Durante el proceso de preparación de los medicamentos biotecnológicos por parte del personal sanitario, hay varios factores y procedimientos que son críticos, y que pueden afectar al perfil de seguridad y eficacia de estos.

## INTRODUCCIÓN

Factores como el pH de las disoluciones, tipo y cantidad de los distintos excipientes, temperatura ambiental, presencia de oxígeno, luz ambiental, tipo de material de almacenamiento o interfaces líquido/sólido y líquido/aire, al igual que procedimientos como la congelación/descongelación, reconstitución, dilución, agitación o trasvases entre otros, pueden alterar su estabilidad fisicoquímica y funcional (Laptoš & Omersel, 2018).

Los dos ejemplos siguientes ponen de manifiesto la variabilidad observada en la práctica clínica:

- ✓ **la preparación de los medicamentos para administración por vía intravenosa.** Para ello, se llevan a cabo ciertos procedimientos que resultan críticos: la reconstitución en el caso de que la forma farmacéutica sea polvo liofilizado; extracción del volumen del vial a una jeringa; inyección a la bolsa de perfusión y mezcla; el transporte a la planta donde se encuentra el paciente por medio de los tubos mecánicos de aire comprimido o por vía tradicional en carros; el almacenamiento temporal, y, por último, la administración al paciente.
- ✓ **La preparación de medicamentos inyectables por vía subcutánea.** Estos son a menudo puestos en manos de los pacientes en las farmacias, transportados por ellos hasta sus casas y almacenados en refrigeración hasta la administración por parte de personal sanitario, o autoadministración.

Todas las situaciones anteriores, a pesar de ser controladas rigurosamente, pueden generar diferentes tipos de estrés en las proteínas terapéuticas (Nejadnik et al., 2018).

El estrés mecánico es probablemente el estrés que mayor repercusión tiene sobre la estabilidad de los biofármacos, teniendo consecuencias directas sobre los procesos de adsorción (Nejadnik et al., 2018). El estrés mecánico ocurre en esta clase de fármacos a lo largo de toda su vida, esto es, durante etapas como cultivo celular, purificación, formulación, llenado del producto y envío desde el fabricante al hospital. Posteriormente, este estrés se presenta durante la manipulación de estos medicamentos en las farmacias de hospitales. Diferentes prácticas ponen de manifiesto este tipo de estrés: transporte de bolsas de perfusión intravenosa y jeringas por tubos neumáticos; aspiración de las preparaciones a jeringas; caída accidental de

## INTRODUCCIÓN

contenedores como bolsas o jeringas; trasvases del contenido de bolsas de perfusión grandes a contenedores más pequeños, usando bombas peristálticas, o el trabajo que realizan las bombas de infusión. El estrés mecánico se clasifica principalmente en: estrés por agitación y por cizalla. Dos situaciones que están estrechamente ligadas, y que influyen en procesos de adsorción de proteínas debido a la tendencia de estas a interactuar con superficies hidrófobas y por contactos liquido/sólido o líquido/aire.

La agitación produce cavitación -creación de vacío y burbujas-, lo cual crea corrientes y diferencias de presión creando así, continuas interfaces agua/aire. El principal producto de degradación observado en anticuerpos monoclonales tras ser agitados es la formación de agregados solubles e insolubles. El mecanismo propuesto a esta agregación ha sido la del incremento de la exposición a superficies hidrófobas como resultado del propio estrés. La agitación aumenta la probabilidad del fármaco de entrar en contacto con superficies hidrófobas ya sea por interfaces liquido/aire o líquido/superficie, promoviendo la formación de partículas subvisibles. La presencia de determinados excipientes influye en la agregación, así la presencia de polisorbato 80 reduce la formación de partículas. La tendencia a la agregación, al igual que el tipo de agregados formados por este tipo de estrés, está también influenciado por otros factores como el pH, sales, velocidad de agitación, espacio de cabeza y tipo y tamaño de contenedor.

El proceso de adsorción es especialmente relevante cuando se llevan a cabo diluciones altas y cuando hay una gran superficie de contacto. Esta puede repercutir en la estabilidad de los medicamentos y desembocar en pérdidas de actividad biológica o disminución de la eficacia del tratamiento por pérdidas de concentración. Se ha demostrado que es un proceso dependiente de la concentración, e influido por otros factores como el pH o fuerza iónica, habiéndose documentado, la desnaturalización y agregación proteica tras procesos de adsorción/desorción. Estos procesos de adsorción pueden darse en cualquier tipo de material como el vidrio tipo 1 -el principal material en el envasado de estos fármacos-, micropartículas de sílica y vidrio. El material empleado en las bolsas para perfusión también influye en la adsorción. Se ha demostrado que la incubación de una solución de IgG4 a 1 mg/mL, tanto en bolsas de policloruro de vinilo (PVC) como de poliolefina de 1 a 6 horas, promovió la pérdida de

## INTRODUCCIÓN

cerca del 25% del monómero en las disoluciones almacenadas en PVC con respecto a aquellas almacenadas en poliolefina, así como la formación de partículas subvisibles y turbidez (Kumru et al., 2012). En otra investigación, se estudió la estabilidad de disoluciones de bevacizumab preparadas en jeringas de plástico en tres unidades de farmacia diferentes y se compararon los resultados con los del fármaco almacenado en viales originales. El contenido total de IgG varió considerablemente entre las muestras de las distintas farmacias, y con respecto a la solución original, habiéndose detectado un 50% de pérdida de IgG detectable en una de las muestras (Kahook et al., 2010).

La temperatura es otro de los factores que más influyen sobre la estabilidad de los biofármacos. Estos son sometidos a cambios de temperatura durante distintas etapas de su producción, almacenamiento y transporte (W. Wang, 2005), así como durante su preparación en las unidades de farmacia de los hospitales, como ocurre cuando son extraídos del frigorífico. Las altas temperaturas favorecen la ruptura de la conformación nativa, hasta el punto de iniciar la agregación, la cual comienza a temperaturas inferiores a la temperatura media de desnaturalización ( $T_m$ ). La velocidad de agregación incrementa con la temperatura, como ocurre con los anticuerpos monoclonales (Singla et al., 2016). La temperatura también favorece otras reacciones químicas como la oxidación y deamidación (Chi et al., 2003). Todas las proteínas tienen una temperatura media de fusión que se encuentra entre 40-80°C, por lo que los fabricantes recomiendan que los biofármacos se almacenen entre 2-8°C, muy por debajo de su  $T_m$ . Tokhadze y colaboradores (Tokhadze et al., 2018) demostraron que disoluciones de infliximab a diferentes concentraciones resultaron ser más estables cuando fueron almacenadas a 5°C que a 25°C. Las temperaturas bajas también pueden inducir inestabilidad en los biofármacos, especialmente durante la congelación y tras la descongelación. La congelación de los fármacos biotecnológicos es una práctica común en la industria biofarmacéutica, por la cual, el principio activo a granel es congelado y descongelado posteriormente, según la demanda del producto (Kolhe et al., 2010). Además, la congelación de estos fármacos garantiza estabilidad al reducir la cinética de degradación y evitando los crecimientos microbianos. Sin embargo, la congelación y la posterior descongelación, inducen cambios en las proteínas a través de agentes estresantes como la desnaturalización parcial por frío, la bajada del pH del tampón



debido a la cristalización, crioconcentración de solutos y/o la formación de interfaces agua/hielo (A. Zhang et al., 2011). Todos estos estreses afectan a la estabilidad coloidal y estructural de proteínas, habiéndose documentado pérdida de conformación (L. Liu et al., 2014), de funcionalidad y formación de agregados de alto peso molecular (A. Zhang et al., 2012). Tokhadze y colaboradores (Tokhadze et al., 2018) detectaron la formación de partículas subvisibles en disoluciones de infliximab sometidas a estrés por ciclos congelación/descongelación, por las técnicas de oscurecimiento de la luz y DLS. La congelación puede ocurrir de manera intencionada o inintencionada en las farmacias de los hospitales.

La concentración también afecta a la estabilidad de las proteínas terapéuticas. Una alta concentración proteica favorece la agregación. Esto resulta un problema en el caso de administraciones subcutáneas de anticuerpos monoclonales, las cuales requieren de unas concentraciones elevadas de proteína. El efecto de la concentración sobre la agregación es algo complejo, ya que hay estudios que indican que a mayor concentración mayor velocidad de agregación, pero hay otros que afirman que mayores concentraciones de proteína disminuyen la velocidad de agregación (W. Wang, 2005). Un aspecto a tener en cuenta durante la práctica clínica es la dilución del medicamento original, en la que también se produce una dilución de los excipientes alterando el pH y la fuerza iónica lo cual puede repercutir en la estabilidad química del fármaco. Sreedhara y colaboradores (Sreedhara et al., 2012) demostraron que al aumentar la relación concentración de anticuerpo monoclonal/polisorbato 20, se favorecía la agregación.

Los biofármacos quedan expuestos a la acción de la luz durante varias etapas de su vida, por ejemplo, en etapas de purificado por técnicas cromatográficas, durante las cuales son expuestos brevemente a la luz ultravioleta. Hay un documento específico para evaluar el efecto de la luz sobre la estabilidad de medicamentos, la guía ICH Q1B (Watson, 2006), que establece las pautas para llevar a cabo los estudios de fotoestabilidad de nuevos principios activos y medicamentos. La exposición a la luz ocurre, predominantemente, durante el almacenamiento en bolsas para perfusión intravenosa y durante su administración a pacientes. Las proteínas son muy sensibles a la luz, especialmente los residuos aromáticos. La luz induce fotodegradación, principalmente por fotooxidación y formación de radicales oxigenados. La

## INTRODUCCIÓN

fotodegradación se ha relacionado con la agregación y con pérdida de actividad biológica (Qi et al., 2009). Nuestro grupo de investigación llevó a cabo un extenso estudio sobre el efecto de la luz en el proceso de agregación de 5 anticuerpos monoclonales terapéuticos, empleando una cámara de envejecimiento y analizando los agregados por cromatografía SEC. Se halló que en todos ellos se producen agregados y fragmentaciones (Hernández-Jiménez et al., 2016).

### **3.2. Estabilidad en el tiempo de los sobrantes de los medicamentos biotecnológicos: estudios de estabilidad**

Los estudios de estabilidad son fundamentales durante todas las etapas del desarrollo de medicamentos biotecnológicos, antes y después de la comercialización. Estos estudios ayudan a los analistas a comprender cómo factores como la temperatura, humedad relativa, luz, material de almacenamiento, pH y otros factores influyen en los diferentes atributos críticos de la calidad. Los fabricantes llevan a cabo estos estudios para detectar rutas de degradación y establecer unas vidas medias para estos medicamentos bajo unas condiciones determinadas (Rios, 2015). Se entiende por estabilidad de un medicamento biotecnológico, a la habilidad de mantener sus propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y funcionales dentro de unos rangos previamente definidos.

Por otra parte, está la “estabilidad en uso”, un concepto más extenso que hace referencia a la estabilidad de un medicamento en unas condiciones más específicas; teniendo en cuenta, en este caso, las variaciones observadas en la práctica clínica. La estabilidad en uso es discutida por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) en una nota guía (European Medicines Agency - EMA, 2001): el objetivo de realizar estudios de estabilidad en uso es establecer, cuando sea aplicable, un periodo de tiempo en el cual un medicamento con múltiples dosis (viales multidosis o inyectables) retenga su calidad. Estos presentan un gran riesgo de contaminación microbiológica y degradación físico-química debido al repetido proceso de apertura y cierre de los contenedores.

La preparación de medicamentos en las unidades de farmacias de hospital es una misión fundamental del farmacéutico, el cual se encarga principalmente de elaborar

estas preparaciones estériles. La realización de estudios de estabilidad de preparaciones hospitalarias es un requisito que viene definido en las normativas de las prácticas de buena fabricación (GMP). Por lo tanto, es requisito previo a la administración, el establecimiento de una estabilidad o vida media de preparaciones hospitalarias de estos fármacos tras ser reconstituidos/diluidos, y almacenadas bajo unas condiciones determinadas (Vigneron, 2017). Ejemplos de estudios de estabilidad de preparaciones hospitalarias llevadas a cabo por las farmacias o por equipos universitarios son: mezclas de medicamentos empleadas en oncología o unidades de cuidados intensivos, preparaciones parenterales de anticuerpos monoclonales o proteínas de fusión, disoluciones orales pediátricas o geriátricas o fármacos muy costosos sobre los que se aporta información limitada sobre su estabilidad por parte de los fabricantes.

Los estudios de estabilidad llevados a cabo por la industria suelen ajustarse a las recomendaciones recogidas en las guías ICH. El Consejo Internacional de armonización de los requisitos técnicos para el registro de medicamentos de uso humano (guías ICH) establece recomendaciones para la validación de métodos analíticos y estudios de estabilidad. Sobre esto, hay seis guías específicas: Q1A, Q1B, Q1C, Q1D, Q1E y Q1F, que están dedicadas a la estabilidad. Sin embargo, estas guías están más orientadas a la industria y no a los hospitales. En consecuencia, se requieren guías específicas que reflejen la realidad hospitalaria (National Health Service-NHS, 2020; Sautou et al., 2013); es el caso de los medicamentos biotecnológicos, al ser especialmente costosos y frágiles. En estos casos, es de gran interés el garantizar unos periodos amplios de estabilidad, extendiendo así los periodos avalados por las fichas técnicas, que suelen ser breves, generalmente no superiores a 24 h debido a cuestiones microbiológicas. Sin embargo, la preparación de estos medicamentos suele realizarse en unidades centralizadas de preparación y en un ambiente aséptico controlado y validado por personal entrenado. Por lo que la estabilidad en estos casos no depende de contaminaciones, sino que la única estabilidad a tener en cuenta en estas preparaciones es la estabilidad fisicoquímica (Astier, 2015; le Basle et al., 2020).

Es evidente, por lo tanto, que la justificación principal para realizar estos estudios de la estabilidad en uso es económica, con la finalidad de reutilizar sobrantes de medicamentos más allá de las indicaciones específicas de los fabricantes. Diversos

## INTRODUCCIÓN

estudios de estabilidad realizados sobre diversos fármacos biotecnológicos aseguran unas vidas medias superiores a las aportadas por las fichas técnicas (Le Guyader et al., 2020; M. Pabari et al., 2013; Y. Zhang et al., 2013). Por ejemplo, rituximab demostró una estabilidad superior a 6 meses cuando fue diluido y almacenado en bolsas de poliolefina a 4 y 22°C a pesar de las indicaciones de la ficha técnica (European Medicines Agency - EMA, 2008)

## **4. Caracterización fisicoquímica y funcional comprensiva de biofármacos: atributos críticos de la calidad**

La caracterización de un biofármaco implica determinar sus propiedades fisicoquímicas, actividad biológica, propiedades inmunológicas, pureza e impurezas. Esta caracterización, llevada a cabo mediante el uso de una serie de técnicas analíticas apropiadas, es necesaria para establecer unas especificaciones determinadas. Se entiende por especificación al conjunto de análisis, referencias a procedimientos analíticos y criterios de aceptación adecuados que son límites numéricos, rangos u otros criterios de los análisis realizados. Una especificación establece el conjunto de criterios a los cuales el principio activo, el producto farmacéutico, o materias primas en cualquier etapa deben ajustarse para ser considerados apropiados para su fin. Los criterios de aceptación deben establecerse y justificarse a partir de los datos obtenidos de los lotes utilizados en los estudios preclínicos y/o clínicos, los datos de los lotes utilizados para la demostración de la consistencia de la fabricación y los datos de los estudios de estabilidad, así como los datos de desarrollo pertinentes (European Medicines Agency - EMA, 1999a)

Los atributos críticos de la calidad son un concepto muy usado en la industria biofarmacéutica durante etapas de desarrollo, para adquirir un conocimiento sólido del producto y del proceso usado para obtenerlo. Se definen como una propiedad o característica física, química, biológica o microbiológica que debe quedar establecida dentro de un límite, rango o distribución, para garantizar la calidad del producto (European Medicines Agency - EMA, 2017c). Los atributos críticos de la calidad se asocian al principio activo, excipientes, intermediarios y medicamento. En el caso de los

biofarmacos, la lista es muy extensa y, por lo tanto, suelen agruparse en distintas categorías(Chan, 2019): variantes asociadas al producto, impurezas provenientes del proceso de producción y atributos críticos de calidad estrictos. Dentro del primer grupo, podemos encontrar variantes de tamaño (oligómeros, agregados o particulado visible y subvisible), variantes de carga, variantes de glicanos, oxidaciones, deamidaciones/isomerizaciones, variantes de secuencia y variantes de estructura (estructuras secundarias, terciarias...). En el segundo grupo, podemos encontrar proteínas del hospedador, proteína A, materias primas y distintos lixiviables. Finalmente, en el último grupo, podemos hallar virus, micoplasmas, endotoxinas y apariencia o particulado.

En base a todo lo descrito anteriormente, se han seleccionado y puesto a punto en esta Tesis Doctoral, una serie de técnicas analíticas y estrategias para analizar atributos críticos de la calidad de medicamentos biotecnológicos basados en anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión-Fc. Los atributos estudiados incluyen: el perfil de perfil de oligómeros, perfil de particulado, perfil de variantes de carga, perfil de glicanos, estructuras secundarias, estructuras terciarias, concentración y funcionalidad. Mediante el análisis conjunto de los resultados de estos atributos, se puede realizar un análisis comprensivo que permita evaluar de forma rigurosa la estabilidad de las preparaciones farmacéuticas, bien frente al impacto de la manipulación o bien en su estabilidad en el tiempo, tal y como se demuestra en los capítulos siguientes de esta Tesis Doctoral.

### **4.1. Cromatografía líquida de altas y ultra altas prestaciones (HPLC/UHPLC)**

#### **4.1.1. Cromatografía de exclusión molecular (SEC)**

De entre todas las técnicas analíticas que permiten el estudio de la agregación en disoluciones de proteínas (ver Anexo), la cromatografía SEC es la herramienta estándar de separación para cuantificar dímeros, trímeros, oligómeros y fragmentos. SEC separa las proteínas en modo isocrático, de acuerdo a su volumen hidrodinámico, empleando fases estacionarias de naturalezas muy variadas. Estas consisten en

## INTRODUCCIÓN

partículas esféricas porosas, de tamaño de poro muy controlado, por medio de las cuales las biomoléculas difunden de acuerdo a su tamaño gracias al uso de fases móviles (tampones) (Fekete, Beck, & Guillarme, 2015).

En la industria biofarmacéutica, la aplicación más destacada es la evaluación de la agregación. La ventaja principal que ofrece SEC, son las condiciones suaves de las fases móviles utilizadas, que permiten caracterizar los biofármacos manteniendo intactas sus estructuras nativas (“native analysis”). A pesar de esto, la cromatografía SEC presenta desventajas en el estudio de la agregación de biofármacos, como es el no poder detectar agregados de alto peso molecular (le Basle et al., 2020). Por SEC, la separación basada en el tamaño permite la creación de una función de calibración, a partir de patrones de peso molecular conocido, y que sirve para estimar -solo estimar- el peso molecular de las proteínas estudiadas.

En la presente Tesis Doctoral se han utilizado métodos SEC de altas prestaciones con detección ultravioleta (SE/HPLC-DAD), usando sales no volátiles, para evaluar la formación de oligómeros de ziv-aflibercept (Capítulos II y III), y métodos de cromatografía líquida de ultra altas prestaciones acoplada a espectrometría de masas - (SE/UHPLC-UV-MS(Orbitrap)), usando sales volátiles, para evaluar la formación de oligómeros, y para caracterizar el perfil de isoformas de infliximab y CT-P13 (Capítulo I).

### **4.1.2. Cromatografía de intercambio iónico (IXC)**

La cromatografía de intercambio iónico es ampliamente usada en la industria biofarmacéutica durante etapas de purificación -cromatografía separativa industrial- y para caracterizar las proteínas terapéuticas -cromatografía analítica- (Fekete, Beck, Veuthey, et al., 2015). Se emplea en la separación e identificación de las distintas variantes de carga resultantes de modificaciones enzimáticas o químicas superficiales. La cromatografía de intercambio iónico ha sido capaz de resolver variantes resultantes de ciclaciones del N terminal (formación de piroglutamato), deamidaciones, truncaciones de la lisina C terminal o sialilaciones entre otras, manteniendo intactas las estructuras nativas de las proteínas. De los dos modos existentes (cromatografía de intercambio catiónico y aniónico), la cromatografía de intercambio catiónico es la herramienta estándar para caracterizar las variantes de carga de proteínas terapéuticas,

dado el mayor número de residuos de aminoácidos básicos frente a los ácidos en las IgG. Para lograr la separación de las variantes, es necesario aplicar un gradiente creciente de sales, pH o ambos.

En la presente Tesis Doctoral se ha empleado un método de cromatografía líquida de ultra altas prestaciones de intercambio catiónico fuerte con detección ultravioleta (SCX/UHPLC-UV), en el que se ha llevado a cabo una separación de las variantes de carga de ziv-aflibercept (Capítulo III), por gradiente de sales (Pérez Robles, 2020).

### **4.1.3. Cromatografía en fase reversa (RP)**

En la cromatografía líquida en fase reversa, los analitos son retenidos en la fase estacionaria por medio de interacciones hidrófobas. Dada la naturaleza hidrófoba de las proteínas terapéuticas, particularmente anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión-Fc, estos quedan en un principio retenidas en la fase estacionaria, para después ser eluidos al aplicar un gradiente creciente en la fase móvil orgánica. Las ventajas principales que ofrece la cromatografía RP con respecto a otros modos cromatográficos en el estudio de las proteínas terapéuticas son: su gran poder de resolución, sensibilidad y su compatibilidad con la espectrometría de masas (Le Basle et al., 2020). Esto la convierte en una herramienta ideal para cuantificar las proteínas terapéuticas. La cromatografía en fase reversa ofrece, además, un gran número de aplicaciones en el estudio de anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión-Fc terapéuticos en estado intacto o digeridos (peptide mapping). A pesar de todo, la técnica también presenta ciertos inconvenientes al exigir condiciones agresivas que desnaturalizan las proteínas. La temperatura elevada requerida o las fases móviles de naturaleza orgánica usadas no permiten el estudio de las proteínas en su conformación nativa.

En la presente tesis se ha empleado un método de cromatografía líquida de ultra altas prestaciones de fase reversa con detección ultravioleta (RP/UHPLC-UV), para llevar a cabo la cuantificación proteica de infliximab y CT-P13 (Capítulo I). Este método ha sido puesto a punto y validado en nuestro grupo de investigación.

## INTRODUCCIÓN

### 4.2. Técnicas espectroscópicas

#### 4.2.1. Dispersión de la luz dinámica (DLS)

En DLS, un láser ilumina la muestra en estado líquido y las fluctuaciones de la luz dispersada son detectadas en un ángulo concreto. Por DLS, se registra el movimiento browniano y este se relaciona con el tamaño de las partículas en disolución. El movimiento browniano se define como el movimiento aleatorio de las partículas debido al bombardeo de las moléculas del disolvente. Cuanto mayor es el tamaño de las moléculas, más lento es el movimiento de estas; las partículas más pequeñas son golpeadas en mayor medida que las más voluminosas (Malvern, 2011).

La técnica DLS es una herramienta relativamente rápida, no destructiva, muy sensible y esencialmente cualitativa para caracterizar el tamaño de biomoléculas en disolución. Se ha usado durante varias décadas en el monitoreo del fenómeno de la agregación en disoluciones de proteínas, pudiendo diferenciar muestras monodispersas homogéneas de muestras agregadas (Nobbmann et al., 2007). Esta técnica presenta ciertas ventajas sobre otras estrategias, como el poder realizar experimentos con una gran variedad de tampones, amplios rangos de temperaturas y concentraciones (Stetefeld et al., 2016). Es ampliamente usada en la industria biofarmacéutica, especialmente en etapas tempranas, ya que, debido a su sensibilidad, es capaz de detectar agregación incipiente. Se utiliza como herramienta de cribado para evaluar la agregación usando un gran número de tampones.

Sin embargo, esta técnica también presenta debilidades: su baja resolución, que no la convierte en apta para discriminar oligómeros como dímeros o trímeros; su gran sensibilidad a cambios en la temperatura y viscosidad; el hecho de solo poder estudiar muestras transparentes, y el hecho de que la intensidad dispersada depende del diámetro, y es proporcional a su sexta potencia ( $I \cdot D^6$ ), por lo que la cubeta debe ser limpiada exhaustivamente y la muestra filtrada y centrifugada, puesto que cualquier contaminación en ínfima proporción puede dominar la distribución.

Algunas aplicaciones en el análisis de agregados proteicos son: el estudio del efecto de diversos factores en la agregación, la detección y monitoreo de agregados



indeseables en biofármacos y la investigación de enfermedades relacionadas con la agregación de proteínas (Lorber et al., 2012). DLS es, además, una herramienta adecuada para llevar a cabo estudios de estabilidad con la finalidad de detectar agregados (Mirasol, 2021)

En la presente Tesis Doctoral, las proteínas terapéuticas estudiadas han sido analizadas por DLS para caracterizar el particulado en disolución. Se han discutido distintos parámetros como el tamaño promedio  $Z$ , polidispersidad, distribución por intensidad y distribución por volumen.

### **4.2.2. Espectropolarimetría de Dicroísmo Circular (DC) en el UV lejano**

La espectropolarimetría de DC es una técnica espectroscópica de absorción basada en la medida del DC en un intervalo de longitudes de onda concreto. DC hace referencia a la absorción diferencial entre la luz circularmente polarizada a la derecha y la luz circularmente polarizada a la izquierda.

Esta técnica es ampliamente usada en la industria biofarmacéutica para estudiar los efectos del proceso de producción, formulación y condiciones de almacenamiento en la conformación de las proteínas y su estabilidad (Li et al., 2011), a pesar de no presentar la resolución que ofrecen técnicas como la cristalografía de rayos X o la resonancia magnética nuclear (RMN). La espectropolarimetría de DC ofrece una gran versatilidad de aplicaciones en el estudio no solo de la conformación de proteínas, sino de la agregación de las mismas (Joshi et al., 2014).

Esta técnica ofrece una serie de ventajas con respecto a técnicas de alta resolución (cristalografía de rayos X o RMN): se pueden obtener espectros de alta calidad en relativamente poco tiempo; se requiere poca cantidad de muestra para estudiar el UV lejano; su naturaleza no destructiva, que permite la reutilización de la muestra para otros fines, o la posibilidad de utilizar cubetas con pasos ópticos que difieren en varios ordenes de magnitud, que la hacen ideal para el estudio de proteínas a concentraciones muy variadas. Las desventajas de la técnica se asocian a su bajo poder resolutivo sobre la estructura de proteínas, ya que, a pesar de que en el UV lejano se pueden obtener estimaciones sobre el contenido en estructura secundaria, esto es, la

## INTRODUCCIÓN

abundancia de alfa hélices, laminas beta, giros beta o estructuras desordenadas, estos softwares no indican en qué lugar de la proteína esta cada tipo de estructura secundaria. La información contenida en un espectro de DC en el UV lejano puede ser interpretada en términos del porcentaje del contenido en cada tipo de estructura secundaria (Whitmore & Wallace, 2004). Se han desarrollado diversos algoritmos que permiten la deconvolución de cada tipo de estructura secundaria presente en la proteína estudiada. Dichroweb, disponible en (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>), es un servidor web que permite un análisis en línea de datos de DC (Whitmore & Wallace, 2008). EL servidor pone a disposición del usuario de manera gratuita 5 algoritmos: SELCON3 (Sreerama & Woody, 1993); CONTINLL (Provencher & Gloeckner, 1981); CDSSTR (Compton & Johnson, 1986); VARSLC, y K2d (Andrade et al., 1993), así como una serie de bases de datos de proteínas referencia (Abdul-Gader et al., 2011; Evans et al., 2007; Lees et al., 2006; Sreerama et al., 2000; Sreerama & Woody, 2000). Finalmente, para evaluar la comparación de los resultados experimentales con los teóricos calculados, Dichroweb calcula un parámetro de la bondad del ajuste denominado “raíz de la desviación cuadrática media normalizada (NRMSD)”. Valores bajos (<0.1) indican que los cálculos realizados son confiables. Es una condición necesaria, aunque no implica que los cálculos estimados sean reales (Whitmore & Wallace, 2008).

En la presente Tesis Doctoral se han puesto a punto y validados métodos de DC en el UV lejano (190-260 nm), para caracterizar las estructuras secundarias de infliximab, CT-P13 y ziv-aflibercept. Posteriormente, los espectros han sido deconvolucionados para calcular el contenido porcentual en estructuras secundarias por Dichroweb.

### **4.2.3. Espectroscopia de fluorescencia intrínseca de triptófanos**

La espectroscopia de fluorescencia es, indiscutiblemente, la estrategia experimental más usada en el estudio de la conformación de las proteínas. Las tres razones de la gran aplicabilidad de la técnica en estudios de plegamiento y dinámica conformacional de proteínas son: las señales de fluorescencia son muy sensibles al entorno más próximo del fluoróforo bajo estudio; la técnica presenta una relación señal/ruido muy alta con poca cantidad de proteína, convirtiéndola en una técnica muy sensible, y la escala de emisión, que se encuentra en la escala de nanosegundos. Esto,

sumado a la alta relación señal/ruido permite tiempos de adquisición bastante rápidos relativos a la escala de tiempo para los plegamientos y transiciones conformacionales.

Sin embargo, presenta algunas desventajas. Generalmente, la señal obtenida es local, es decir, en el ambiente próximo al fluoróforo estudiado. Por lo tanto, es complicado interpretar los cambios observados por la técnica en términos de su origen y localización. En segundo lugar, en proteínas que contienen numerosos fluoróforos, es difícil interpretar los resultados obtenidos por la técnica: el entorno de cada fluoróforo es único y presenta propiedades espectrales diferentes a las del resto. Los espectros de absorción y emisión se solapan y es difícil distinguir la contribución de cada residuo por separado al global de cambios observados. El espectro de fluorescencia intrínseca de una proteína puede obtenerse excitando a 280 nm, absorbiendo principalmente el triptófano y tirosina. En cambio, si se quiere obtener la emisión del triptófano exclusivamente, puede excitarse la proteína a 295-305 nm.

De todos los aminoácidos aromáticos, el triptófano domina la emisión fluorescente en una proteína. Las proteínas suelen tener dos o más triptófanos, como es el caso de los biofármacos, y en particular, de los anticuerpos monoclonales y derivados. La emisión del triptófano es altamente sensible a las condiciones del disolvente, proximidad de aminoácidos ácidos, número y localización de triptófanos (Thiagarajan et al., 2016). Por lo tanto, se usa para seguir cambios conformacionales de proteínas. Los desplazamientos en sus espectros de emisión han sido observados como resultado de diversos fenómenos como la unión a ligandos, asociación proteína-proteína o desplegamiento de proteínas (Vivian & Callis, 2001). El máximo de emisión es un reflejo del promedio de exposición al disolvente de los triptófanos en una proteína; estos, debido a su carácter aromático, suelen encontrarse en el interior hidrófobo de la proteína -en la interfaz entre dominios o subdominios, o en la interfaz entre subunidades en proteínas oligoméricas-. Tras la ruptura de las estructuras terciarias y cuaternarias, el triptófano queda más expuesto al disolvente, lo que provoca un desplazamiento de máximo de emisión hacia el rojo. Sin embargo, no es posible predecir el efecto sobre el rendimiento cuántico, ya que este es difícil de predecir. Si no hay desactivación fluorescente o transferencia energética hacia grupos prostéticos en el estado plegado, se puede predecir que la desactivación de la fluorescencia del

## INTRODUCCIÓN

disolvente debido a la exposición de los triptófanos al exterior dará lugar a una caída en la intensidad de emisión. Sin embargo, hay casos en los que ocurre una fuerte desactivación en estados plegados, y aumenta la intensidad de fluorescencia al producirse el desplegamiento (Royer et al., 1993). La tirosina y fenilalanina también pueden usarse como sondas fluorescentes intrínsecas en el estudio de las proteínas, sin embargo, sus bajos coeficientes de extinción y rendimientos cuánticos, así como la falta de sensibilidad a su entorno próximo, los hace mucho menos útiles que el triptófano.

En la presente Tesis Doctoral, se ha puesto a punto y validado una estrategia para evaluar la estructura terciaria, empleando los espectros de emisión intrínseca del triptófano de disoluciones de infliximab, CT-P13 y ziv-aflibercept -excitando a 298 nm-, para posteriormente proceder al cálculo del centro de masas del espectro. Esta herramienta se ha demostrado muy útil para detectar desplazamientos del máximo de emisión del triptófano y ha sido desarrollada por primera vez en esta Tesis Doctoral para el estudio de proteínas terapéuticas.

### **4.3. Inmunoensayos**

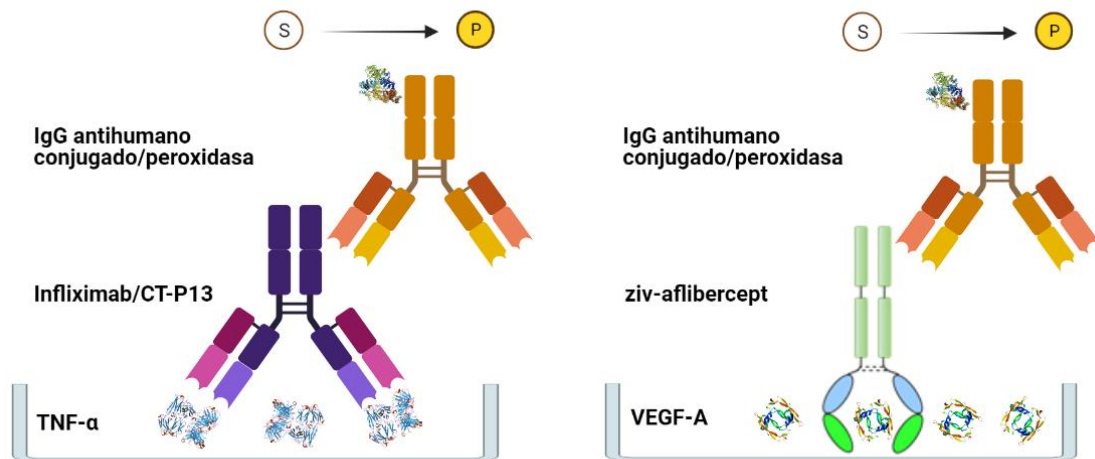
#### **4.3.1. ELISA indirecto**

Actualmente, ELISA es el inmunoensayo más usado para evaluar la actividad biológica de anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión-Fc (Suárez et al., 2016). La guía ICH Q6B (Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products) establece que un protocolo aceptado para la evaluación de la actividad biológica de anticuerpos monoclonales y proteínas relacionadas, son los ensayos bioquímicos. Además, establece que los resultados de los ensayos biológicos deberían ser expresados en unidades de actividad biológica previamente calibrados frente a estándares de referencia si es posible, y si no es posible, se aceptan los estándares de referencia “*in house*”. Teniendo esto en cuenta, los inmunoensayos tipo ELISA son ideales para evaluar la funcionalidad en relación a los ensayos que emplean líneas celulares, en donde la calibración se hace más difícil y la variabilidad es mucho mayor que en los ELISA.

Así pues, en un ELISA indirecto, un anticuerpo (proteína terapéutica en este caso) se une específicamente a un antígeno inmovilizado y un anticuerpo secundario conjugado específico de especie se une al anticuerpo primario, el cual revela la reacción al añadir un sustrato específico de la enzima ligada. Como ventajas de este ensayo se encuentran: amplificación de la señal; alta sensibilidad; posibilidad de usar distintos anticuerpos secundarios, o la gran flexibilidad: el mismo anticuerpo secundario puede utilizarse en diferentes anticuerpos primarios. Como desventajas principales destacan los protocolos extensos al ser comparados con los de un ELISA directo o la posible reactividad cruzada del anticuerpo secundario(*ELISA Principles and Types*, n.d.).

En la presente Tesis Doctoral, se han llevado a cabo diversos ELISA indirectos desarrollados y validados previamente en nuestro grupo de investigación (Suárez et al., 2016) y que han sido adaptados y validados para los estudios específicos de infliximab, CT-P13 y ziv-aflibercept. En la figura 4, se recoge un esquema general del formato seguido en estos ELISA. Todos los ELISA empleados han sido, por tanto, optimizados, se han obtenido las correspondientes funciones de calibrado empleando como estándares de referencia “in-house”, medicamentos en condiciones óptimas de uso (recién abiertos los viales), los datos de reproducibilidad y repetibilidad, así como se ha procedido a la validación cuando necesario (ziv-aflibercept). Además, las muestras de proteínas terapéuticas bajo estudio siempre se han comparado con muestras frescas recién preparadas de los correspondientes medicamentos, para así comparar las señales obtenidas, construyéndose funciones de calibrado simultáneamente.

## INTRODUCCIÓN



**Figura 4.** ELISAs indirectos llevados a cabo para evaluar la actividad biológica de infliximab, CT-P13 y ziv-aflibercept.

## 5. Estructura de la Tesis Doctoral y coherencia entre las publicaciones

La presente Tesis Doctoral ha sido presentada por compendio de publicaciones en revistas científicas de alto impacto e indexadas en el *Journal Citation Reports*. Según la normativa a aplicar de la Escuela de Doctorado de la Universidad de Granada, es requisito incluir los indicios de calidad relativos de cada una de las publicaciones, los cuales son descritos a continuación. Se ha seguido una nueva estructura en la que el apartado resultados y discusión es sustituido por las publicaciones científicas. La tesis presenta los apartados *resumen*, *hipótesis* y *objetivos*, *publicaciones científicas*, *conclusiones*, *perspectivas futuras*, *anexos* y *bibliografía*. Los artículos científicos son mostrados en el formato PDF de la revista. Los capítulos que se muestran en esta memoria satisfacen los objetivos que quedan recogidos en los proyectos de investigación financiados por el instituto de salud Carlos III: FIS PI010-00201 y FIS PI17-00547.

**Capítulo I:** En este trabajo, y por primera vez en nuestro grupo, se ha establecido y definido una metodología de análisis comprensiva para a través de un conjunto de distintos atributos críticos de la calidad, evaluar de forma rigurosa la estabilidad de

## INTRODUCCIÓN

anticuerpos monoclonales terapéuticos en condiciones de uso hospitalario. De esta manera, se ha llegado a determinar un perfil indicador de la estabilidad fisicoquímica y funcional, que se ha aplicado al estudio comparativo del anticuerpo monoclonal infliximab (Remicade®, medicamento innovador) y su biosimilar CT-P13 (Remsima™ e Inflectra™, medicamentos bioidénticos). Este perfil indicador de la estabilidad ha demostrado su validez en la caracterización y comparabilidad de un innovador y su biosimilar en condiciones de uso hospitalario con rigurosidad. Se han obtenido datos sobre sus estabilidades frente a degradación acelerada, lo cual permiten, a su vez, evaluar el impacto de la manipulación. También se han investigado las estabilidades en el tiempo de disoluciones preparadas y almacenadas en condiciones de uso hospitalario. Concretamente, se han estudiado las disoluciones de 10 mg/mL (medicamento reconstituido y almacenado en viales de vidrio), 2 mg/mL (medicamento reconstituido, diluido en disolución isotónica (0,9% de NaCl) y almacenado en viales de vidrio) y 0,4 mg/mL (medicamento reconstituido, diluido en disolución isotónica (0,9% de NaCl) y almacenado en bolsas de poliolefina). Todas han sido almacenadas a 2-8°C y oscuridad durante 14 días. Ha sido objetivo también de este estudio, la comparación de resultados en cuanto a procesos de degradación que se llevan a cabo en el innovador y biosimilar, robustez frente a dicha degradación y comparación de las estabilidades de las disoluciones en el tiempo.

Esta metodología de análisis desarrollada en este capítulo se ha aplicado en los siguientes capítulos de la Tesis para estudiar la proteína de fusión-Fc ziv-aflibercept.



## INTRODUCCIÓN

- ✓ AUTORES: HERMOSILLA J, SÁNCHEZ-MARTÍN R, PÉREZ-ROBLES R, SALMERÓN-GARCÍA A, CASARES S, CABEZA J, CUADROS-RODRÍGUEZ L, NAVAS N.
  - ✓ TÍTULO: *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)*
  - ✓ VOLUMEN: 33
  - ✓ PAGINAS:193-205
  - ✓ DOI: 10.1007/s40259-019-00342-9
  - ✓ REVISTA: *BIODRUGS*.
  - ✓ FACTOR DE IMPACTO (2019) JOURNAL CITATION REPORTS (JCR): **5.313**
  - ✓ POSICIÓN: PRIMER TERCIL (T1), PRIMER CUARTIL (Q1), PRIMER DECIL (D1), PERCENTIL 91, EN CATEGORÍA "PHARMACOLOGY AND PHARMACY" (23/271).
  - ✓ FECHA DE PUBLICACIÓN: 14/03/2019.
  - ✓ EDITORIAL: *SPRINGER*
- 

**Capítulo II:** En este trabajo, el perfil indicador de la estabilidad fisicoquímica y funcional que fue establecido para el anticuerpo monoclonal infliximab (Remicade<sup>®</sup>, medicamento innovador) y su biosimilar CT-P13 (Remsima<sup>™</sup> e Inflectra<sup>™</sup>, medicamentos bioidénticos), se ha aplicado para el estudio de la proteína de fusión-Fc terapéutica ziv-aflibercept (Zaltrap<sup>®</sup>, medicamento innovador). Este perfil indicador de estabilidad ha permitido llevar a cabo una caracterización fisicoquímica y funcional de dicha proteína y proporcionar datos sobre la estabilidad frente a la manipulación hospitalaria. Además, se ha hecho uso de técnicas complementarias como la microscopia de transmisión de electrones, y distintos ensayos de unión como tioflavina T y Congo Red y, que han sido necesarios, dada la gran complejidad estructural que presenta esta proteína terapéutica en comparación con anticuerpos monoclonales previamente estudiados. La estabilidad de ziv-aflibercept en condiciones de uso hospitalario es estudiada en el próximo capítulo.





**Scientific Reports**

- ✓ AUTORES: HERMOSILLA J, PÉREZ-ROBLES R, SALMERÓN-GARCÍA A, CASARES S, CABEZA J, BONES J, NAVAS N.
  - ✓ TÍTULO: *COMPREHENSIVE BIOPHYSICAL AND FUNCTIONAL STUDY OF ZIV-AFLIBERCEPT: CHARACTERIZATION AND FORCED DEGRADATION*
  - ✓ VOLUMEN: 10
  - ✓ DOI: 10.1038/s41598-020-59465-7
  - ✓ REVISTA: SCIENTIFIC REPORTS.
  - ✓ FACTOR DE IMPACTO (2020) JOURNAL CITATION REPORTS (JCR): **4.379**
  - ✓ POSICIÓN: PRIMER TERCIL (T1), PRIMER CUARTIL (Q1), PERCENTIL 77 EN CATEGORÍA "MULTIDISCIPLINARY SCIENCES" (17/73).
  - ✓ FECHA DE PUBLICACIÓN: 14/02/2020.
  - ✓ EDITORIAL: SPRINGER-NATURE
- 

**Capítulo III:** En este último capítulo, los datos previos que ya se tienen sobre la caracterización de la proteína de fusión-Fc terapéutica ziv-aflibercept (Zaltrap®, medicamento innovador), así como de su degradación acelerada, que permite validar la estrategia para ser empleada en estudios de estabilidad, ha servido para llevar a cabo un estudio de estabilidad en condiciones de uso hospitalario. Las disoluciones estudiadas han sido 4 mg/mL (medicamento diluido en 0,9 % de NaCl y almacenado en bolsas de poliolefina) y 0,6 mg/mL (medicamento diluido en 0,9 % de NaCl y almacenado en bolsas de poliolefina). Todas han sido almacenadas a 2-8°C en oscuridad durante 14 días. En este trabajo, se ha puesto a punto metodología analítica adicional como es la cromatografía de intercambio catiónico fuerte. Esta metodología ha permitido el análisis

## INTRODUCCIÓN

de las variantes de carga. La puesta a punto y validación de esta metodología ha sido publicada en la misma revista por nuestro grupo de investigación (Pérez-Robles et al., 2020).



- ✓ AUTORES: HERMOSILLA J, PÉREZ-ROBLES R, SALMERÓN-GARCÍA A, CASARES S, CABEZA J, NAVAS N.
  - ✓ TÍTULO: STABILITY STUDY OVER TIME OF CLINICAL SOLUTIONS OF ZIV-AFLIBERCEPT PREPARED IN INFUSION BAGS USING A PROPER COMBINATION OF PHYSICOCHEMICAL AND FUNCTIONAL STRATEGIES
  - ✓ DOI: 10.1016/j.jpba.2021.114209
  - ✓ REVISTA: JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANÁLISIS.
  - ✓ FACTOR DE IMPACTO (2020) JOURNAL CITATION REPORTS (JCR): **3.935**
  - ✓ POSICIÓN: PRIMER TERCIL (T1), SEGUNDO CUARTIL (Q2), PERCENTIL 71 EN CATEGORÍA "ANALYTICAL CHEMISTRY" (24/83).
  - ✓ FECHA DE PUBLICACIÓN: 16/06/2021.
  - ✓ EDITORIAL: ELSEVIER
-

## **CAPÍTULO I**

**Comparative stability studies of  
different infliximab and biosimilar  
CT-P13 clinical solutions by  
combined use of physicochemical  
analytical techniques and ELISA**

---

## CAPÍTULO I

# Resumen

---

En el Capítulo I, se ha puesto a punto un conjunto de métodos de análisis y estrategias para llevar a cabo una caracterización fisicoquímica y funcional el anticuerpo monoclonal infliximab (Remicade<sup>®</sup>, medicamento innovador), y su biosimilar CT-P13 (Remsima<sup>™</sup> e Inflectra<sup>™</sup>, medicamentos bioidénticos). Posteriormente, se empleó esta metodología desarrollada en un estudio de estabilidad comparativo *medicamento innovador/medicamento biosimilar*. El objetivo fue comparar, por un lado, la estabilidad fisicoquímica de ambos frente a la degradación; y por otro, evaluar la estabilidad fisicoquímica y funcional de disoluciones clínicas de ambos medicamentos cuando son preparadas en condiciones asépticas validadas y almacenadas a 2-8°C en oscuridad durante 14 días. Distintos viales de INF y CT-P13 fueron reconstituidos en agua para inyectables a la concentración de 10 mg/mL y diluidos en solución isotónica (0,9% de NaCl) a las concentraciones clínicas de 2 y 0,4 mg/mL. Las disoluciones a 10 y 2 mg/mL fueron almacenadas en viales de vidrio, mientras que las disoluciones a 0,4 mg/mL fueron almacenadas en bolsas de poliolefina. La metodología analítica aplicada se basó en el análisis de distintos atributos de la calidad: el particulado de 0,001-10 µm fue analizado por DLS y los oligómeros de pequeño tamaño mediante (SE/UHPLC-UV-(native)MS(Orbitrap)), que también fue empleado para análisis intacto del perfil de isoformas; la cuantificación se realizó mediante (RP/UHPLC-UV); las estructuras secundarias por DC en el UV lejano; la estructura terciaria por fluorescencia intrínseca de triptófanos y la funcionalidad por ELISA. Los resultados indicaron unos perfiles espectroscópicos, un perfil de agregados, así como unos patrones de degradación muy similares y comparables entre INF y CT-P13. La única diferencia destacable entre INF y CT-P13 fue detectada por DLS tras los ciclos de congelación/descongelación; CT-P13 mostró una mayor robustez frente a dicho estrés en cuanto a formación de particulado. En lo referente al estudio de estabilidad en condiciones de uso clínico, no se detectó formación de agregados, cambios significativos en las estructuras secundarias y terciaria o disminución de la funcionalidad. Del presente capítulo, se puede concluir que las disoluciones de INF y CT-P13 almacenadas a 2-8°C y en oscuridad, presentaron estabilidad fisicoquímica y funcional durante dos semanas, independientemente de la

## CAPÍTULO I

concentración (10, 2 y 0,4 mg/mL) y del material de almacenamiento (viales de vidrio o bolsas de poliolefina). Los medicamentos, innovador y bisimilares, demostraron en este estudio un alto grado de biosimilaridad en sus condiciones de uso hospitalario.

# Publicación

---

## CAPÍTULO I





# 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)

Jesús Hermosilla<sup>1</sup> · Ricardo Sánchez-Martín<sup>1</sup> · Raquel Pérez-Robles<sup>1</sup> · Antonio Salmerón-García<sup>2</sup> · Salvador Casares<sup>3</sup> · Jose Cabeza<sup>2</sup> · Luis Cuadros-Rodríguez<sup>1</sup> · Natalia Navas<sup>1</sup> 

© Springer Nature Switzerland AG 2019

## Abstract

**Background** There are two products in which infliximab is the active pharmaceutical ingredient. These are Remicade<sup>®</sup> (INF; reference product) and Remsima<sup>™</sup>/Inflectra<sup>™</sup> (CT-P13; infliximab biosimilar). Remsima<sup>™</sup>/Inflectra<sup>™</sup> are bioidentical products. Different recommendations have been made for the clinical solutions of each brand (Remicade<sup>®</sup> or Remsima<sup>™</sup>/Inflectra<sup>™</sup>) despite the manufacturer of the biosimilar claiming high levels of similarity to the innovator.

**Objective** The objective of this study was to assess and compare stability against degradation and over time of different clinical infliximab solutions prepared from Remicade<sup>®</sup> and from Remsima<sup>™</sup>/Inflectra<sup>™</sup> using a suitable set of characterization methods in line with the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) recommendations.

**Methods** Reconstituted solutions of INF and CT-P13 and dilutions as used in hospital were stored in glass vials (10 and 2 mg/mL) or in polyolefin infusion bags (0.4 mg/mL) refrigerated between 2 and 8 °C for 2 weeks. Regarding the physicochemical properties, the distribution of the particulates were studied over a range of 0.001–1 μm by dynamic light scattering (DLS) and oligomers up to 8 monomer were analyzed by native size-exclusion ultra-high-performance liquid chromatography with ultraviolet (UV)-visible detection coupled to (native) mass spectrometry (SE/UHPLC-UV-(native) MS); mass spectrometry was also used to evaluate natural aggregates and isoform profile; DLS was also employed to detect gross conformational changes by tracking the hydrodynamic radius (HR). The secondary structure of the proteins was studied by far UV circular dichroism (CD). The tertiary structure was investigated by intrinsic tryptophan fluorescence (IT-F). Reverse-phase ultra-high-performance liquid chromatography with UV detection (RP/UHPLC-UV) was used to analyze intact INF and CT-P13 for quantification purposes. Functionality was evaluated via the biological activity measured by the extension of the immunological reaction of the INF and the CT-P13 with its antigen, i.e., the tumor necrosis factor-α by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

**Results** The stress applied to INF and CT-P13 solutions showed similar levels of aggregate formation, structural variation, and chemical modifications. The only noteworthy difference between INF and CT-P13 was detected in their behavior to freeze–thaw cycles, in which CT-P13 showed slightly more robustness. INF and CT-P13 showed identical CD spectra, similar to those reported for IgG1 in which there is dominance in β sheet secondary structures; this typical conformation remained unmodified over time in INF and CT-P13. No significant changes were detected in the tertiary structure and no aggregates process was noticed over the time studied. Polydispersity slightly increased for the most concentrated solutions, while there were no meaningful differences in the HR in the solutions over time. The concentration of INF and CT-P13 also remained constant. Differences in the native isoform MS profile were detected, as expected by the different glycosylation pattern, with

---

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s40259-019-00342-9>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

---

Extended author information available on the last page of the article

no important modification over time. Functionality was maintained over the test period (60 days) and was similar in all the solutions tested, with no differences between INF and biosimilar solutions.

**Conclusions** High levels of similarity were noticed in the behavior of INF and CT-P13 when subjected to stress. When stored refrigerated at between 2 and 8 °C and prepared as normally used in the hospital pharmacy, all solutions showed physicochemical and functional stability for all the concentrations tested and all containers, at least for the 14-day test period.

### Key Points

The infliximab innovator and infliximab biosimilar CT-P13 showed high levels of similarity, as evaluated by their controlled degradation in concentrated reconstituted solutions of 10 mg/mL.

The results demonstrated chemical–physical and functional in-use stability of the diluted solution of infliximab innovator and infliximab biosimilar CT-P13 stored at 2–8 °C for at least 14 days.

These data provide evidence enabling evaluation of longer-term use (up to 14 days) of the infliximab and CT-P13 diluted solutions used in clinical practice when stored refrigerated (4 °C) or when reconstitution/dilution of the solutions has taken place in controlled and validated aseptic conditions.

## 1 Introduction

The European Medicines Agency (EMA) defines a biosimilar as a biological medicine that is highly similar to another already approved biological medicine, known as the ‘reference medicine’. Biosimilars are approved according to the same standards of pharmaceutical quality, safety, and efficacy applied to all biological medicines. In 2013, the EMA’s Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) recommended the authorization of Remsima™ [1] and Inflectra™ [2]—two biointerchangeable developed by Celltrion, Incheon, South Korea—as biosimilar medicinal products containing infliximab. Remsima™ and Inflectra™ are copies of Remicade® (INF; manufactured by Janssen Biotech, Inc./Janssen Pharmaceutical Companies, Horsham, PA, USA). The active substance in these medicines is the monoclonal antibody (mAb) infliximab (also known as CT-P13 in the biosimilars Remsima™ and Inflectra™), which is an inhibitor of the cytokine tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and acts by reducing its pro-inflammatory signaling [3, 4]. Remsima™/Inflectra™ is the first mAb biosimilar used in clinical practice in the European Union. This drug was approved for the same indications as its reference product infliximab [5], although clinical efficacy was only demonstrated in rheumatic diseases [1]. The therapeutic indications

and the dosing regimen are the same as for Remicade®, the pharmaceutical form (powder for concentrate for solution for infusion) and strength (infliximab 100 mg per vial) are also the same.

Detailed analytical comparison of Remicade® and Remsima™ showed high levels of product similarity, apart from the accepted differences in the glycan composition and minor differences in the levels of the soluble natural aggregates and basic charged variants [6]. Via a controlled degradation study, the two medicines were submitted to high temperature and humidity conditions, and similar degradation behavior was observed. The authors interpreted these results by arguing that despite the differences between the two infliximab medicinal products, the primary sequence of infliximab largely defines their protein instabilities and that the small initial purity and glycosylation differences are of only limited influence [6].

The manufacturers of both types of infliximab (Remicade® and Remsima™/Inflectra™) have indicated that their product is physicochemically stable for up to 24 h when stored at 25 °C and that once reconstituted, storage should not exceed 24 h at 2–8 °C [7]. From a microbiological point of view, they recommended that the infusion solution should be administered immediately, or within 24 h when stored at 2–8 °C, unless reconstitution/dilution has been carried out in controlled, validated aseptic conditions, a situation for which there is no specified expiry date. These short shelf-lives, common in biotechnological medicines, mean that their stability in hospital use conditions must be tested. The physicochemical and functional stability of Remsima™ diluted in NaCl 0.9% solution and stored in polyolefin infusion bags at 2–8 °C was confirmed over the 7 days of the study [7]. A more recent study also demonstrated the stability of dilutions of 0.7 and 1.6 mg/mL [8]. The physicochemical stability of different diluted solutions of Inflectra™ has also been tested recently over a period of 90 days. In this case, however, the researchers did not conduct the functional experiments to corroborate the stability of biological activity required in order to recommend the shelf-life of the different solutions in hospital use conditions [9].

In addition, the manufacturer of Remicade® has very recently changed the technical recommendations regarding the shelf-life of its reconstituted and diluted solution, indicating specifically that the chemical and physical stability of these diluted solutions in hospital use has been demonstrated for up to 28 days at 2–8 °C and for an additional 24 h

at 25 °C after removal from refrigeration [10], despite the short shelf-life that had been indicated for many years (since its recommendation for approval in 1999 [11]). Before this change, several investigations focused on the stability of the infliximab in Remicade® in in-use conditions due to the very short stability attributed to the doses, which had to be used within 3 h of preparation. Other researchers assessed the effects of thermal and shear stressors on the physical properties, structural integrity, and biological activity of infliximab concentrations of 1, 4, and 10 mg/mL. Their results indicated that the physical properties and structural integrity of the doses were unchanged, although the biological activity of infliximab was found to decrease with increasing temperature and sonication time [12]. The biological activity of solutions prepared for infusion at 0.4 mg/mL after storage for up to 2 weeks was investigated in polyvinyl chloride bags. The results indicated no loss of functionality, as measured by a complicated immunoassay strategy [13].

Therefore, taking into account the very recent longer shelf-life of infliximab solutions prepared from Remicade® [10], different recommendations are currently being offered for each infliximab solution by the manufacturers of Remicade® (innovator or medicinal reference product: chemical and physical in-use stability of the diluted solution for up to 28 days at 2–8 °C [10]) and Remsima™/Inflectra™ (biosimilar: chemical and physical in-use stability of the reconstituted solution for up to 24 h at 25 °C)

[14, 15]. The aim of this paper is to assess and compare the stability of different infliximab solutions prepared with Remicade® and with Remsima™/Inflectra™, reconstituted and diluted according to normal hospital use and stored in either glass vials or polyolefin infusion bags. With this in mind, and in line with the recommendations of the International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) [16], a suitable set of analytical techniques was used to test the physicochemical properties and an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) TNF- $\alpha$ -based immunoassay method was used to evaluate functionality [17]. This study also made use of the results of previously published papers by our research group on Remicade® infliximab solutions in hospital use conditions.

## 2 Stability Study

The stability study of INF and CT-P13 was performed using an ad hoc work procedure that was mainly based on the ICH Q6B international guideline [16]. To this end, we assessed physicochemical and biological parameters. The physicochemical attributes were tested using a combined set of proper analytical techniques, and biological functionality was assessed using a biochemical approach. Table 1 outlines the methodology used in this research

**Table 1** Stability study work outline

Characteristic studied		
Forced degradation (stress)	A combination of: Exposure to light High temperature Ionic strength Freeze–thaw cycles Denaturation by guanidine	Techniques validated: Far UV CD IT-F DLS SE/UHPLC-UV [19, 28] RP/UHPLC-UV [18] ELISA [22]
Stability over time		Samples
Visual characteristics		All samples
Physicochemical properties	Secondary structure (VT-CD) Soluble particulate (DLS) Aggregates (SE/UHPLC-UV) Tertiary structure (IT-F) Quantity (RP/UHPLC-UV)	10, 2, 0.4 mg/mL 10, 2, 0.4 mg/mL 10 [19], 2 [19], 0.4 mg/mL 10, 2, 0.4 mg/mL 10 [18], 2 [18], 0.4 mg/mL
Functional properties	Isoform profile ([native] MS) ELISA	0.4 mg/mL 10, 0.4 mg/mL

*DLS* dynamic light scattering, *ELISA* enzyme-linked immunosorbent assay, *Far UV CD* far UV circular dichroism, *IT-F* intrinsic tryptophan fluorescence, *MS* mass spectrometry, *RP/UHPLC-UV* reverse-phase ultra-high-performance liquid chromatography with UV detection, *SE/UHPLC-UV* size-exclusion ultra-high-performance liquid chromatography with UV detection, *UV* ultraviolet, *VT-CD* variable temperature circular dichroism



and also shows the results from previous research by the authors on infliximab solutions prepared from Remicade®.

### 2.1 Remicade® (INF) and Remsima™/Inflectra™ (CT-P13) Samples Studied

Several different INF and CT-P13 concentrations were evaluated to cover the range normally used in clinical practice. The reconstituted solutions of INF and CT-P13 in water for injection of 10 mg/mL were studied, together with the clinically common concentration of 0.4 mg/mL. The clinically high concentration of 2 mg/mL was also tested, although in this case we did not use standard storage conditions (in polyolefin bag) or the full set of techniques. This last concentration was mainly used as an internal control.

Due to the limits on obtaining samples of the medicines, we prepared two independent replicates for each storage container. Different batches were used throughout the study (Electronic Supplementary Material [ESM] Table 1). A total of 16 samples were prepared to check INF stability (reconstituted in water at 10 mg/mL and stored in its own glass vial container, diluted in 0.9% NaCl at 2 mg/mL and stored in a laboratory glass vial, and diluted in 0.9% NaCl at 0.4 mg/mL and stored in a polyolefin infusion bag) and 12 samples to test and compare the stability of the biosimilar CT-P13 (reconstituted in water at 10 mg/mL and stored in its own glass vial container, diluted in 0.9% NaCl at 2 mg/mL and stored in a laboratory glass vial, and diluted in 0.9% NaCl at 0.4 mg/mL and stored in a polyolefin infusion bag). All samples were stored refrigerated, as recommended, between 2 and 8 °C (normally at 4 °C, at a controlled temperature in the fridge) and light-protected throughout the test period of 14 days.

### 2.2 Methodology Applied

Table 1 shows the methodology applied in this study. The stability-indicating nature of all the methods used was corroborated by accelerated degradation studies either performed here for the first time or performed in previously published work about INF by the authors. These experiments were also useful for evaluating the similarity between INF and CT-P13, assuming that similar molecular entities suffer similar degradation behavior and pathways. Therefore, they were also useful to compare their stability against degradation. Table 1 also indicates the suitable analytical technique used to evaluate each of the required physicochemical and functional properties of the two biotechnological drugs.

### 2.3 Stability Studies Over Time

Sample solutions of both drugs, INF and CT-P13, stored in glass containers (10 and 2 mg/mL) and in polyolefin bags (0.4 mg/mL) were analyzed for a minimum period of 14 days in order to assess their stability over time. In all cases, day 0 (D0)—the day on which the samples were prepared—was established as the control experience or reference day, and all subsequent experiences were compared to D0. For the ELISA methodology, the last point was recorded at day 60.

Samples of INF and CT-P13 at a concentration of 10 mg/mL (stored in the original glass vial containers of the medicines) were analyzed using the whole set of techniques indicated in Table 1, with the exception of size-exclusion ultra-high-performance liquid chromatography with ultraviolet (UV)-visible detection coupled to (native) mass spectrometry (SE/UHPLC-UV-[native] MS) and reverse-phase ultra-high-performance liquid chromatography with UV detection (RP/UHPLC-UV). The stability of INF solutions at 10 mg/mL over a month has been described in previously published papers focused on quantification by reverse-phase (RP) chromatography [18] and natural aggregates by size-exclusion chromatography (SEC) [19]. These two techniques were not used to analyze CT-P13 at a concentration of 10 mg/mL.

Samples of INF and CT-P13 at a concentration of 2 mg/mL (stored in laboratory glass vials), which were prepared above all as internal control samples to help detect internal problems in the analysis, were analyzed using dynamic light scattering (DLS), circular dichroism (CD), and intrinsic tryptophan fluorescence (IT-F).

Samples at a concentration of 0.4 mg/mL (stored in polyolefin bags) were analyzed using the full set of methods and techniques indicated in Table 1.

## 3 Materials and Methods

### 3.1 Materials and Reagents

Several units of the Remicade® 100 mg vials (Janssen Biotech) and Remsima™/Inflectra™ 100 mg vials (Celltrion) were used in this study, supplied by the University Hospital San Cecilio (Granada, Spain). A more extensive description of the materials and reagents used throughout this study is provided in the ESM (Supplementary “Materials and Reagents” section).

### 3.2 Preparation of the INF and CT-P13 Solutions

Remicade® and Remsima™/Inflectra™ are the trade names of the marketed medicine formats of INF and CT-P13, respectively, used in this study. INF and CT-P13 are presented as lyophilized powders; they were both reconstituted

in water for injection under sterile conditions in a laminar flow cabinet at a final concentration of 10 mg/mL, as indicated in the summary of the characteristics of both products. Both the INF and CT-P13 10 mg/mL solutions were subsequently diluted up to 2 and 0.4 mg/mL in isotonic solution 0.9% NaCl in laboratory glass vials and polyolefin bags, respectively. 10 mg/mL solutions were stored in the original glass vial container of the medicine and 2 mg/mL solutions were stored in 1.5 mL amber glass vials. 0.4 mg/mL solutions were stored in polyolefin infusion bags (BN:18A23E4Z; Baxter, Madrid, Spain) throughout the stability study.

### 3.3 Forced Degradation

Different methods of degradation were assessed by subjecting freshly prepared samples of Remicade® and Remsima™/Inflectra™ reconstituted in water for injection at 10 mg/mL to several stress conditions. These included (1) exposure to heat stress by keeping solutions at a high temperature until insoluble white particles appeared or submitting samples to a gradient of increasing temperature; (2) exposure to light irradiation (250 W/m<sup>2</sup>) in an aging chamber (Solarbox 3000e RH, Cofomegra, Milan, Italy) for 48 h following the guidelines laid down by the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH Q1B) for photostability testing [20]; (3) freeze–thaw (F–T) cycles; (iv) exposure to a hypertonic medium by diluting INF and CT-P13 reconstituted solution (10 mg/mL) in a hypertonic solution of 1.5 M NaCl at a final concentration of 2 mg/mL and stored for 48 h; and (v) exposure to denaturing conditions by diluting the drugs at a concentration of 2 mg/mL with a final concentration of denaturing guanidine solution of 6.5 M.

### 3.4 Physicochemical Analytical Methods

#### 3.4.1 Visual Inspection

A quick visual inspection was carried out daily, prior to experimentation, in order to check for evidence of formation of large aggregates, turbidity, suspended particles, color changes, and gas formation. To this end, samples were visually inspected using the naked eye.

#### 3.4.2 Far Ultraviolet (UV) Circular Dichroism (CD)

Both the INF and CT-P13 solutions were studied by CD spectroscopy using a JASCO J-815 spectropolarimeter (JASCO, Tokyo, Japan). Temperature control was set at 20 °C for all measurements. A wider description of the

instrumental methods conditions, methods optimization, and validation is in the ESM (Supplementary “Far UV Circular Dichroism” section).

CD spectra were evaluated by analyzing the shifting of the wavelength at zero intensity, the spectra minimum ( $\lambda_{\min}$ ), and the shoulder at around 227 nm; the value of the shoulder was calculated by the first derivative of the CD spectra.

#### 3.4.3 Intrinsic Tryptophan Fluorescence (IT-F)

IT-F measurements were carried out on a Cary Eclipse spectrofluorometer (Agilent, Santa Clara, CA, USA). A description of the instrumental methods conditions is given in the ESM (Supplementary “Intrinsic Tryptophan Fluorescence” section). Raw spectra of each sample were visually checked, looking initially for either shifts at the maximum or a fluorescence intensity decrease. The spectral centroid was considered as a mathematical representation of each spectrum and was determined as such for each sample tested, using the following equation:

$$\text{Centroid} = \frac{\sum(fi\lambda)}{\sum fi},$$

where  $fi$  is the fluorescence intensity and  $\lambda$  is the wavelength.

Validation of the technique was performed by submitting samples to F-T cycles, hypertonic medium, high temperature, and denaturing guanidine solution.

#### 3.4.4 Dynamic Light Scattering (DLS)

DLS readings were carried out in a Protein Solutions DynaPro-99 System Dynamic Light Scattering Module equipped with a Temperature Control Micro Sampler (Wyatt, Santa Bárbara, California, USA). A 1.5 mm path-length quartz cuvette, which was cleaned thoroughly before measuring, was used to obtain the readings. A total of 100 reads were recorded per measurement. Temperature was set at 20 °C and the acquisition time was 5 s. Laser power was set to 45–50% depending on the concentration of the samples. The solvent was also modified according to each sample.

#### 3.4.5 Size-Exclusion Ultra-High-Performance Liquid Chromatography (UHPLC) with UV-Visible Detection Coupled to (Native) Mass Spectrometry (SE/UHPLC-UV-[Native] MS)

The analysis was performed by liquid chromatography 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-3000

Vis-UV detector). The chromatograph was coupled in line to a Q Exactive Plus mass spectrometer (Thermo Scientific). The ionization was performed using a heated electrospray ionization (HESI) source. A size-exclusion column was used for mAb analysis. Description of the method is given in the ESM, including size-exclusion column calibration (Supplementary “SE/UHPLC-UV-(native) MS -Fig. 1 and Fig. 2-” section). Native isoforms of the drugs were obtained by mass spectra deconvolution using BioPharma Finder™ software version 2.0 (Thermo Scientific) with ReSpect algorithms.

#### 3.4.6 Reverse-Phase UHPLC with UV Detection (RP/UHPLC-UV)

The RP/UHPLC-UV method was performed using the chromatograph described in Sect. 3.4.5. For this analysis, 5  $\mu$ L of solution was injected into a monolithic column 1  $\times$  50 mm internal diameter (i.d.) (ProSwift™ RP-4H, Thermo Scientific) coupled to a 2.1  $\times$  5 mm i.d. micro desalting column (particle size 20  $\mu$ m, 1000 Å pore size, MassPREP™, Waters, Milford, MA, USA). The experimental conditions were the same as applied in the procedure described in previous research [21]. They are summarized, including validation data, in the ESM (Supplementary “RP/UHPLC-UV -Fig. 3 and Table 2-” section). Samples from the bag solution were diluted 1/10 with deionized water prior to injection into the chromatograph.

#### 3.5 Functional-Based Method: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

An indirect and non-competitive ELISA [22] based on the specific reaction of INF and CT-P13 with the TNF- $\alpha$  was carried out to test their biological activity throughout the stability study [23, 24]. A wider description of the ELISA can be found in the ESM (Supplementary “ELISA for INF and CT-P13 -Fig. 4 and Table 3-” section).

#### 3.6 Statistical Methodology

One-way analysis of variance (ANOVA) was used to identify differences between means over time and forced degradation treatment. When data did not follow the normal distribution and homogeneity of variances, even after logarithmic transformations, non-parametric Kruskal–Wallis tests were applied. The Tukey test was performed for post hoc comparisons (confidence level of 95%). For these statistical analyses, we used R version 3.3.1, Rcmdr package.

## 4 Results

### 4.1 Visual Inspections

All samples remained clear for the duration of the study with no precipitates or particulate matter detected with the naked eye. No changes in color or turbidity were observed over the test period.

### 4.2 Far UV CD

Regardless of the concentration, INF and CT-P13 showed identical far UV CD spectra, similar to those reported for IgG1 molecules in which the dominance of  $\beta$ -sheet secondary structural conformation has been demonstrated [25, 26]. All the reference spectra, those recorded at D0, showed a wavelength at zero intensity of around 208.7–209.0 nm for INF and CT-P13 solutions, a  $\lambda_{\min}$  at 217.2–217.4 nm, and a shoulder between 227.4 and 227.6 nm and 227.8 and 228.2 nm, respectively for INF and CT-P13 solutions (ESM Fig. 5).

The results of the stress study indicated similar stability against degradation. All these results (ESM Table 4) showed a high level of similarity in the changes that occurred in the secondary structure as a result of accelerated degradation in both therapeutic mAbs; therefore, there is great similarity between the secondary structure of the INF and the biosimilar CT-P13.

Results of the stability study are shown in Table 2 (for the CD spectra, see ESM Fig. 5). No changes were observed in ellipticity and no shifts were detected in the  $\lambda_{\min}$ ,  $\lambda_{\text{Ellipticity} = 0}$ , or in the broad shoulder over the 14-day study period, indicating that both mAbs maintained their secondary native conformation.

### 4.3 IT-F

Table 3 includes the calculated gravity center of the spectra expressed in nanometers for INF and CT-P13 samples subjected to stress. The most substantial changes we observed are highlighted using italics. As regards the stress studies, the greatest change in the gravity center was observed in samples of INF and CT-P13 diluted in guanidine solution, where there was a shift of approximately 20 nm to the right in the spectrum accompanied by a large decrease in the fluorescence signals. These results were expected as the guanidine was used just to promote and evaluate denaturalization due to breakdown of the tertiary structure. Slighter but significant differences were observed in high-temperature and hypertonic medium stresses. Temperature stress (50 °C) induced shifts to the



**Table 2** Stability study over 14 days: far ultraviolet circular dichroism spectral changes in Remicade® (INF) and Remsima™/Inflextra™ (CT-P13) samples

Concentration (mg/mL)	Day	INF			CT-P13		
		$\lambda_{\min}$ (nm)	$\lambda_{\text{Ellipticity}=0}$ (nm)	Shoulder (nm)	$\lambda_{\min}$ (nm)	$\lambda_{\text{Ellipticity}=0}$ (nm)	Shoulder (nm)
10	D0	217.4	209.0	227.4	217.4	208.9	227.8
	D1	217.4	208.8	228	217.2	208.9	227.8
	D7	217.2	208.8	227.2	217.4	209.0	228
	D14	217.4	208.9	228	217.6	209.3	228
2	D0	217.4	209.0	227.4	217.4	208.9	227.8
	D1	217.0	208.9	227.8	217.0	208.9	227.6
	D7	217.4	208.8	227.6	217.4	208.9	227.6
	D14	217.4	208.9	228.2	216.8	209.0	227.8
0.4	D0	217.4	208.8	227.6	217.2	208.7	228.2
	D1	217.2	208.9	228	217.0	208.8	228
	D7	217.4	208.8	228	217.4	208.8	227.8
	D14	217.2	208.8	227.8	217.2	208.7	228

$\lambda_{\min}$  spectra minimum,  $\lambda_{\text{Ellipticity}=0}$  spectra intensity equal to zero,  $D$  day

right in the spectrum of approximately 2.5 nm, along with a decrease in the fluorescence signal in both mAbs. Hypertonic medium stress caused shifts of around 2–3 nm to the left in the spectrum in both mAbs. Neither appreciable shifts nor changes in fluorescence intensity occurred in samples undergoing F-T cycles, except in the first F-T cycle where a similar shift to that for hypertonic medium stress was observed in both mAbs. This could indicate a slight change in the tertiary structure due to F-T that was not observed after the first F-T cycle. Again, both drugs exhibited similar stability against degradation.

Regarding the samples stored at 2–8 °C to evaluate stability over 14 days (Table 3), no significant shifts were observed for any of the INF and CT-P13 solutions, except for at day 1 (D1), when a slight shift was perceived in INF and CT-P13 solutions for the highest concentration assessed, i.e., 10 mg/mL. No changes were observed in the fluorescence signals over time at any concentration studied (ESM Fig. 6).

#### 4.4 DLS

The results of the stress on the samples indicated changes in the hydrodynamic radius (HR)  $\pm$  standard deviation (SD) of INF (ESM Fig. 7A) and CT-P13 (ESM Fig. 7B), being affected by all the stress conditions tested, including F-T cycles, which are discussed later in this section. A significantly larger mean HR  $\pm$  SD could suggest the formation of aggregates with a greater spherical volume [7]. This would imply that temperature induced a substantial and progressive decrease in the HR  $\pm$  SD of the mAbs up to 50 °C, as described in previous research [27] (ESM Fig. 7a). The HR  $\pm$  SD of the samples diluted in hypertonic medium was

strongly affected so that 24 h after dilution the HR  $\pm$  SD of INF and CT-P13 increased significantly from 9 and 9.4 nm to 12 and 12.3 nm, respectively (Fig. 1b). Visible light irradiation caused a slight increase in the HR of INF and CT-P13 after 48 h of exposure (Fig. 1b). On the other hand, polydispersity clearly decreased with the rise in temperature in both mAb solutions (ESM Table 5). The hypertonic medium promoted the greatest changes in polydispersity, with a tendency to split the particulates into two populations. Exposure to light irradiation indicated a slight decrease in the polydispersity of both mAb solutions (ESM Table 6).

As regards the stability study, Fig. 1 shows the HR  $\pm$  SD for the INF (Fig. 2a) and CT-P13 (Fig. 2b) reconstituted and diluted solutions kept at 2–8 °C over a period of 14 days. There were no meaningful differences in the HR  $\pm$  SD of these samples throughout the 14 days in any of the concentrations or storage systems checked, although some slight variations were detected, as might be expected in a dynamic system such as the solutions we studied. Furthermore, important differences in the HR  $\pm$  SD were clearly associated with the concentration of the INF/CT-P13 solutions, in that these values are directly proportional to concentration, i.e., increasing with the concentration from  $6.9 \pm 0.6$  (INF) and  $7.0 \pm 0.5$  (CT-P13) in a 0.4 mg/mL solution to  $12.7 \pm 0.4$  (INF) and  $12.7 \pm 0.4$  (CT-P13) in 10 mg/mL solutions. Polydispersity in 10 and 2 mg/mL solutions decreased slightly over time for the two mAbs (ESM Table 6). In the 0.4 mg/mL samples, polydispersity did not follow a specific tendency, remaining stable over time (ESM Table 6).

The HR of INF samples subjected to F-T cycles increased significantly after the second F-T cycle, while in the case of CT-P13 samples it increased significantly after the third F-T

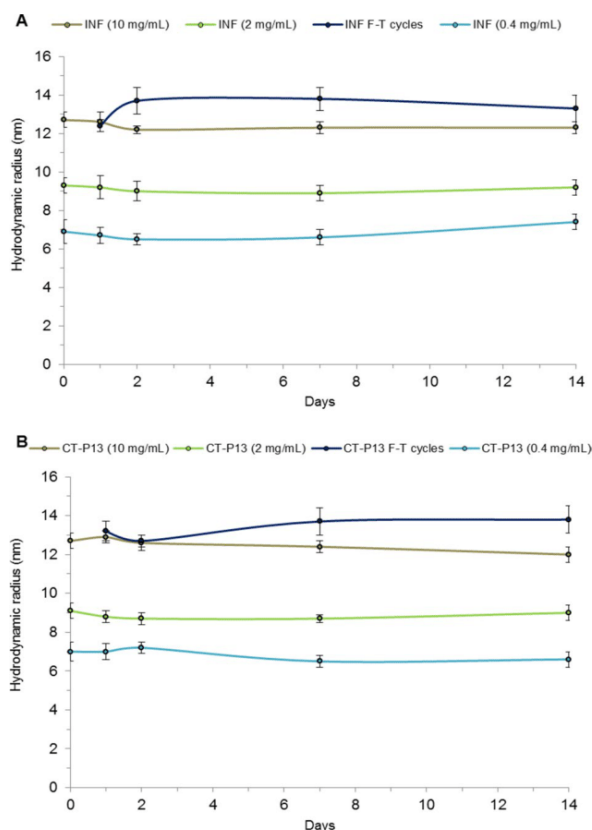
**Table 3** Tertiary structure study as investigated by tracking the fluorescence spectral centroid

INF			CT-P13				
F-T cycles	Guanidine	1.5 M NaCl	T	F-T cycles	Guanidine	1.5 M NaCl	T
Changes in the centroid (nm) of INF and CT-P13 due to stresses applied							
346.79 (1st)			348.06 (20 °C)	346.78 (1st)			348.73 (20 °C)
349.24 (2nd)	366.67	346.87		349.43 (2nd)	366.57	346.88	
348.92 (3rd)			350.79 (50 °C)	349.09 (3rd)			351.26 (50 °C)
349.20 (4th)				349.30 (4th)			
Day	10 mg/mL	2 mg/mL	0.4 mg/mL	10 mg/mL	2 mg/mL	0.4 mg/mL	
Changes in the centroid (nm) of INF and CT-P13 in the stability study over time (2–8 °C)							
0	349.16	348.87	349.43	349.05	349.03	349.74	
1	346.71	348.90	349.34	346.63	349.14	349.81	
2	349.07	349.31	350	349.23	349.29	349.98	
7	348.75	348.85	349.71	349.05	349.09	349.24	
14	348.98	349.05	349.48	349.41	349.14	349.56	

Data in italics indicate the most substantial changes observed  
*CT-P13* Remsima™/Infectra™, *F-T* freeze-thaw, *INF* Remicade®, *T* temperature



## Comparative Stability of Infliximab and Biosimilar CT-P13 in Clinical Solutions

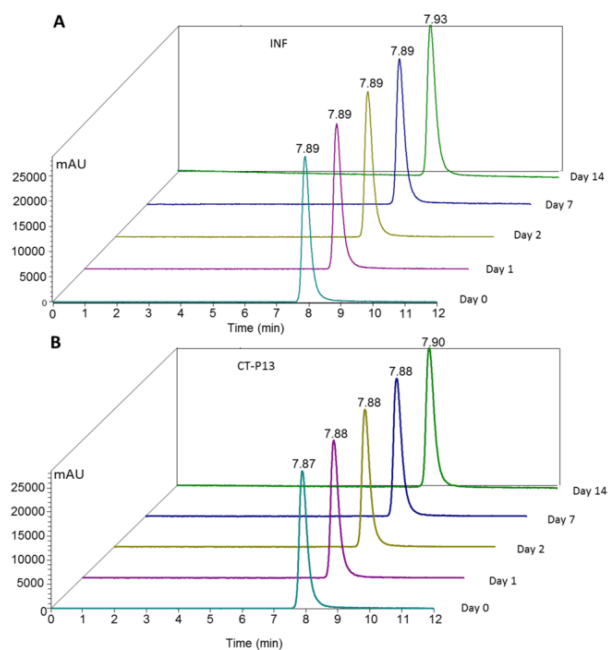


**Fig. 1** Stability study over time (14 days) assessed by means of the averaged hydrodynamic radius  $\pm$  standard deviation—estimated using dynamic light scattering—of Remicade® (INF) (a) and CT-P13 (Remsima™/Inflectra™) (b) solutions and freeze–thaw cycles

cycle (Fig. 2). Polydispersity of INF and CT-P13 samples increased slightly in both mAbs (ESM Table 5).

#### 4.5 Size-Exclusion Chromatography (Size-Exclusion UHPLC UV Chromatography [SE-UHPLC-UV])

An in-depth validation of the UV-SEC method for detecting aggregation and/or fragmentation has been performed in previous investigations [19, 28]. In our current research, this method was used to analyze aggregates in INF and CT-P13 solutions, the only difference being that it was adapted to a more efficient separation system, the UHPLC. Since an in-depth stability study had already been presented for INF at concentrations of 10, 2, and 0.4 mg/mL stored in glass vials [19, 28], we decided to investigate only the concentration of 0.4 mg/mL stored in polyolefin bags in the present study. The control chromatograms were characterized by a main single peak eluting at  $7.88 \pm 0.01$  min for INF and  $7.89 \pm 0.01$  min for CT-P13. These chromatographic profiles, characterized by a single peak, were invariant over the time



**Fig. 2** Representative size-exclusion ultra-high-performance liquid chromatography with ultraviolet-visible detection (SE/UHPLC-UV) chromatograms of INF (Remicade®) 0.4 mg/mL (a) and CT-P13 (Remsima™/Inflectra™) 0.4 mg/mL (b) solutions in polyolefin bags over the study period (14 days)

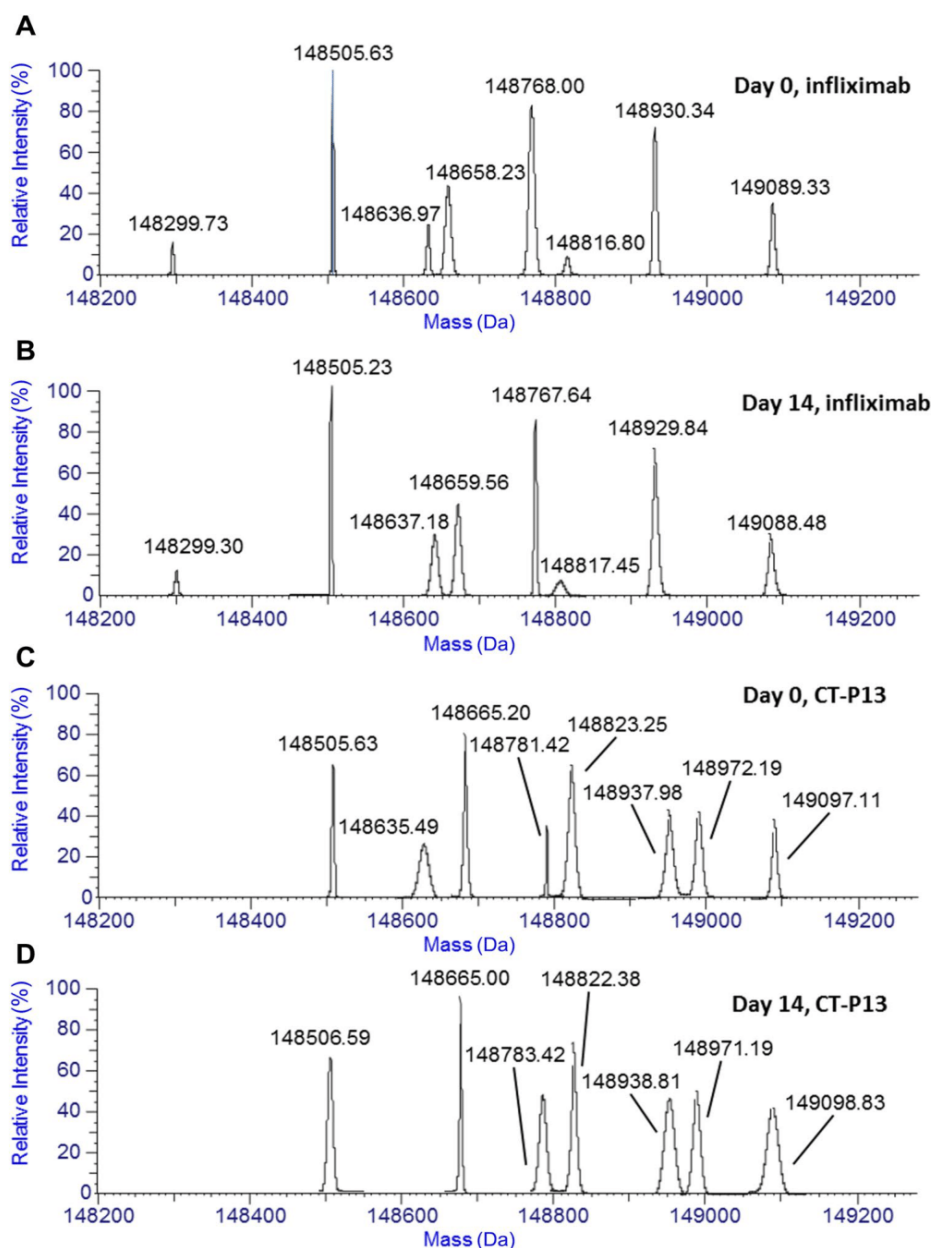
checked in both the elution time and the area under the peak. Figure 2 shows the UV-SEC chromatograms corresponding to one of the replicates of the samples analyzed in this study; the analysis of all the chromatographic profiles clearly indicated high stability of both drugs and a high degree of similarity in the solutions despite the slightly high aggregation profile of Remsima™/Inflectra™, as indicated by the manufacturer.

An estimation of the molecular weight (MW) of the drugs was made using the estimated calibration model for the size-exclusion column (ESM Fig. 2). The result confirmed that the entities detected in the solutions were monomers (averaged  $MW_{INF} = 157,536$  Da and averaged  $MW_{CT-P13} = 160,881$  Da), with no tendency to aggregates during the time they were stored refrigerated (2–8 °C). Previous results obtained by the authors also confirm this behavior for INF (Remicade®) in reconstituted solutions (10 mg/mL) and in diluted solutions in 0.9% NaCl (at 2 and 1 mg/mL) stored in glass materials refrigerated at 4 °C [19, 28].

#### 4.6 RP/UHPLV-UV

The method used to study the concentration of the two drugs using RP-UHPLC-UV has been explained in an

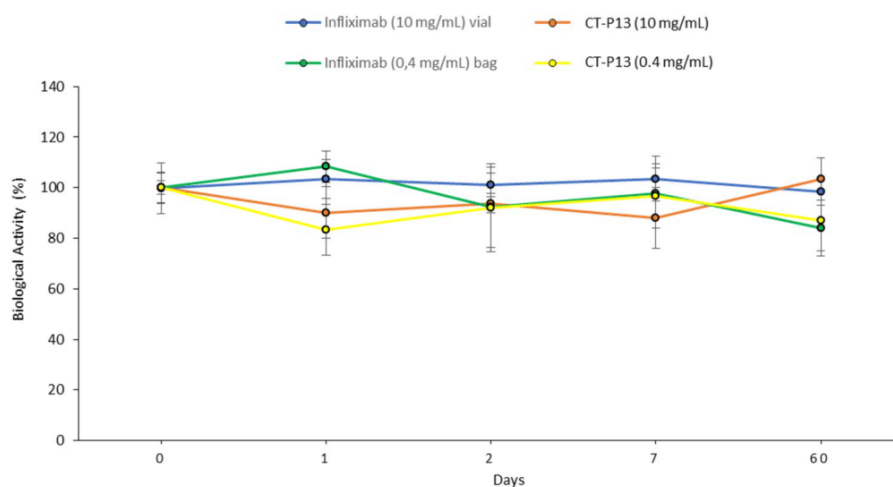
**Fig. 3** Averaged biological activity (%) of INF (Remicade®) and CT-P13 (Remsima™/ Inflectra™) 10 mg/mL (glass vials) and 0.4 mg/mL (polyolefin bags) solutions over time evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): **a** day 0, infliximab; **b** day 14, infliximab; **c** day 0, CT-P13; and **d** day 14, CT-P13



earlier paper by the current authors [21]. Reconstituted solutions of INF 10 mg/mL and dilutions in 0.9% NaCl at 2 and 0.5 mg/mL stored in glass vials were checked for quantification purposes over a month. The results demonstrated a high degree of stability with no significant changes in the concentration. The stress study also proved that RP chromatography can be used to detect degradation by fragmentation [18]. Therefore, we used this technique to study the samples stored in the polyolefin bags, i.e., 0.4 mg/mL of drug concentration. The results of the stability study are shown in Fig. 3. Using the

calibration model established with the standard solution indicated in Sect. 2.2, the concentration calculated at D0 was  $0.45 \pm 0.004$  mg/mL [0.9% Relative Standard Deviation (RSD)] for INF and  $0.40 \pm 0.001$  mg/mL (0.3% RSD) for CT-P13. No significant changes in the concentration were observed throughout, indicating that the concentration of INF and CT-P13 remained constant over the 14 days of the study, with no adsorption on the wall of the container (ESM Fig. 8).

**Fig. 4** Representative (native) mass spectrometric profile—obtained by size-exclusion ultra-high-performance liquid chromatography with ultraviolet-visible detection coupled to (native) mass spectrometry (SE/UHPLC-UV-[native] MS)—of INF (Remicade®) 0.4 mg/mL (a) and CT-P13 (Remsima™/Inflextra™) 0.4 mg/mL (b) in polyolefin bags over the study period (14 days)



#### 4.7 Size-Exclusion Chromatography Native Mass Spectrometry (SE-UHPLC-[Native] MS)

Under native conditions the INF mass spectra profile was characterized on D0 by eight peaks (Fig. 4a, b), the most intense of which were 148,505.63, 148,768.00, 148,930.34, and 149,089.33 Da. Of these peaks, the strongest signal corresponded to (G0F/G0F)-2K glycoform (148,505.63 Da). The mass and relative abundance of this species remained constant over 14 days, with no additional peaks being detected.

Similarly, on D0, the mass spectrum of CT-P13 was characterized by eight peaks (Fig. 4c, d). The majority of the species were detected practically unchanged over the study period, except for mass 148,635.49 Da, which was not detected until the last checked day (day 14 [D14]). This entity was assigned to the glycoform (G0F/G0F)-1K, which was not amongst the most abundant.

The differences in the native isoform MS profile detected in INF and CT-P13 in terms of both the intensities and the particular isoform identified were explained by the different glycosylation pattern [29] and the different post-translational modifications that might occur [6].

#### 4.8 ELISA

The ELISA method used in this study was previously validated by subjecting INF sample solutions to stress [22]. In that work, INF 10 mg/mL reconstituted solutions were subjected to the same stress conditions described here, all of which caused a significant decrease in biological activity in INF. Figure 3 shows the results of the stability study performed in our current research in which the biological activity was measured by the binding capacity

of the TNF- $\alpha$ . Results are shown as the remaining biological activity expressed as a percentage of the initial data obtained on D0 immediately after preparation of the samples. The results show a high stability of both drugs over the 60-day study period. There were no statistically significant differences between stability-tested and fresh samples (ESM Table 7). Biological activity remains stable in all the studied samples, regardless of both concentration (10 and 0.4 mg/mL) and containers (glass vials and bag).

## 5 Discussion

The application of various different stresses allowed us to identify certain changes in the structure of the mAbs and enabled the validation of the method in order to associate possible changes in the stability study with specific modifications in both mAb solutions, such as aggregation, dis-aggregation, denaturalization, or conformational changes. The specific results of all these controlled degradations applied to the INF and CT-P13 solutions showed similar levels of soluble aggregate formation, structural variation, and chemical modifications, thus helping to confirm high levels of biosimilarity between the two drugs. The only difference between INF and CT-P13 was detected in their behavior when subjected to F-T cycles: INF average HR increased significantly from the second F-T cycle, while CT-P13 average HR increased significantly from the third F-T cycle; but taking into account that only two replicates were used for the experiments and that only one cycle of difference was observed (second cycle for INF and third cycle for CT-P13), this phenomenon may be attributed to experimental variations.

The results for the different parameters in the stability studies demonstrate that the INF and CT-P13 solutions



that are stored refrigerated (2–8 °C) show high physicochemical and functional stability upon extended storage in all the concentrations and containers we studied. Both mAbs solutions exhibited almost identical physicochemical and functional behavior. No significant instabilities were observed with any of the techniques employed during the 14-day period at any of the concentrations studied. The shift detected in the fluorescence gravity center (using IT-F) for the highest concentration (10 mg/mL in vials) solutions in both drugs indicated a more hydrophobic environment in the two proteins 24 h after preparation (D1); however, this alteration was not observed on the following check days and could be the result of the hydrodynamic process in the proteins in aqueous solutions. It is important to make clear that this change did not affect the functionality as assessed by the specific union of the INF and CT-P13 with their target, TNF- $\alpha$ , as indicated by the functionality results in the analysis made 24 h after preparation of the solutions (D1).

All techniques used during this study proved useful in determining and comparing the stability of INF and CT-P13 solutions over time. Both mAbs showed almost identical behavior when they were undergoing stress conditions, stored refrigerated at 2–8 °C, and taking into account that different batches were used throughout the study. These solutions remained stable, as measured by physicochemical parameters and functionality, regardless of the particular storage material or concentration.

## 6 Conclusions

The research presented here revealed high levels of similarity between clinical solutions of INF (Remicade<sup>®</sup>) and CT-P13 (Remsima<sup>™</sup>/Inflixtra<sup>™</sup>) in terms of both degradation pathways and stability over time. A set of analytical techniques were used to evaluate the physicochemical and functional integrity of the two drugs over the 14-day test period. Previously, all the techniques used in this study were validated to confirm their ability to detect changes in the structure or functionality of the two proteins. We found that INF and CT-P13 solutions prepared in glass vials (10 mg/mL in water for injection and 2 mg/mL in NaCl 0.9%) and in polyolefin bags (0.4 mg/mL in NaCl 0.9%) remain stable over 14 days when stored refrigerated at 2–8 °C in the absence of light. In addition, biological activity of the two drugs by ELISA was corroborated for 60 days in the 0.4 mg/mL solution in polyolefin bags.

**Acknowledgements** The authors would like to thank the Hospital Pharmacy Unit of the University Hospital San Cecilio (Grenada, Spain) for kindly supplying all the medicine samples and the Biomedical Research

Foundation “Alejandro Otero” (FIBAO) for the support given during the course of this research.

## Compliance with Ethical Standards

**Conflict of interest** Jesús Hermosilla, Ricardo Sánchez Martín, Raquel Pérez-Robles, Antonio Salmerón-García, Salvador Casares, Jose Cabeza, Luis Cuadros-Rodríguez, and Natalia Navas declare that they have no conflict of interest related to the contents of this article that might influence the results of the investigation.

**Funding** 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).

## References

1. Committee for Medicinal Products for Human Use. Remsima assessment report EMA/CHMP/589317/2013. 2013. [https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/remcima-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/remcima-epar-public-assessment-report_en.pdf). Accessed 20 Nov 2018.
2. Committee for Medicinal Products for Human Use. Inflectra assessment report EMA/CHMP/589422/2013. 2013. [https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/inflectra-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/inflectra-epar-public-assessment-report_en.pdf). Accessed 20 Nov 2018.
3. Wong M, Ziring D, Korin Y, Desai S, Kim S, Lin J, et al. TNF $\alpha$  blockade in human diseases: mechanisms and future directions. *Clin Immunol*. 2008;126:121–36.
4. Couriel DR, Hicks K, Giralt S, Champlin RE. Role of tumor necrosis factor-alpha inhibition with infliximab in cancer therapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Oncol*. 2000;12:582–7.
5. Blair HA, Deeks ED. Infliximab biosimilar (CT-P13; infliximab-dyyb): a review in autoimmune inflammatory diseases. *BioDrugs*. 2016;30:469–80.
6. Pisupati K, Benet A, Tian Y, Okbazghi S, Kang J, Ford M, et al. Biosimilarity under stress: a forced degradation study of Remicade<sup>®</sup> and Remsima<sup>™</sup>. *MAbs*. 2017;9:1197–209.
7. Young BL, Khan MA, Chapman TJ, Parry R, Connolly MA, Watts AG. Evaluation of the physicochemical and functional stability of diluted REMSIMA<sup>®</sup> upon extended storage—a study compliant with NHS (UK) guidance. *Int J Pharm*. 2015;496:421–31.
8. Vieillard V, Astier A, Sauzay C, Paul M. One-month stability study of a biosimilar of infliximab (Remsima<sup>®</sup>) after dilution and storage at 4 °C and 25 °C. *Ann Pharm Fr*. 2017;75:17–29.
9. Tokhadze N, Chennell P, Le Basle Y, Sautou V. Stability of infliximab solutions in different temperature and dilution conditions. *J Pharm Biomed Anal*. 2018;150:386–95.
10. EMA. Remicade<sup>®</sup>, annex 1: summary of product characteristics. 2018. [https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/remicade-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/remicade-epar-product-information_en.pdf). Accessed 20 Nov 2018.
11. EMA. Remicade<sup>®</sup>, annex 1: summary of product characteristics. 1999. [https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/1999/199908133334/anx\\_3334\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/1999/199908133334/anx_3334_en.pdf). Accessed 20 Nov 2018.
12. Alsaddique JA, Pabari RM, Ramtoola Z. Effect of thermal and shear stressors on the physical properties, structural integrity and biological activity of the anti-TNF-alpha monoclonal antibody, infliximab. *Curr Pharm Biotechnol*. 2016;17:905–14.

13. Ikeda R, Vermeulen LC, Lau E, Jiang Z, Saha S, Reichelderfer M, et al. Stability of infliximab in polyvinyl chloride bags. *Am J Heal Pharm.* 2012;69:1509–12.
14. EMA. Remsima<sup>®</sup>, annex 1: summary of product characteristics. 2010. [https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/remcima-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/remcima-epar-product-information_en.pdf). Accessed 06 Feb 2019.
15. EMA. Inflectra<sup>®</sup>, annex 1: summary of product characteristics. 2010. [https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/inflectra-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/inflectra-epar-product-information_en.pdf). Accessed 06 Feb 2019.
16. ICH Expert Working Group. Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products Q6B. 1999. [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q6B/Step4/Q6B\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q6B/Step4/Q6B_Guideline.pdf). Accessed 27 Nov 2018.
17. Visser J, Feuerstein I, Stangler T, Schmiederer T, Fritsch C, Schiestl M. Physicochemical and functional comparability between the proposed biosimilar rituximab GP2013 and originator rituximab. *BioDrugs.* 2013;27:495–507.
18. Martínez-Ortega A, Herrera A, Salmerón-García A, Cabeza J, Cuadros-Rodríguez L, Navas N. 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.* 2018;116:993–1003.
19. Hernández-Jiménez J, Martínez-Ortega A, Salmerón-García A, Cabeza J, Prados JC, Ortíz R, et al. 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.* 2018;118:511–24.
20. ICH Expert Working Group. Stability testing: photostability testing of new drug substances and products. Q1B. 1996. [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q1B/Step4/Q1B\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1B/Step4/Q1B_Guideline.pdf). Accessed 27 Nov 2018.
21. Pérez-Robles R, Cuadros-Rodríguez L, Salmerón-García A, Navas N. 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.* 2018;159:437–48.
22. Suárez I. ELISA methodology to study the stability of biotechnological medicines [in Spanish]. University of Granada; 2016. <http://hdl.handle.net/10481/47150>. Accessed 27 Nov 2018.
23. Suárez I, Salmerón-García A, Cabeza J, Capitán-Vallvey LF, Navas N. Development and use of specific ELISA methods for quantifying the biological activity of bevacizumab, cetuximab and trastuzumab in stability studies. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2016;1032:155–64.
24. Wang Y, Fei D, Vanderlaan M, Song A. Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro. *Angiogenesis.* 2004;7:335–45.
25. Vermeer AWP, Bremer MGEG, Norde W. Structural changes of IgG induced by heat treatment and by adsorption onto a hydrophobic Teflon surface studied by circular dichroism spectroscopy. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1425:1–12.
26. Pabari RM, Ryan B, McCarthy C, Ramtoola Z. Effect of microencapsulation shear stress on the structural integrity and biological activity of a model monoclonal antibody, trastuzumab. *Pharmaceutics.* 2011;3:510–24.
27. Langridge TD, Tarver MJ, Whitten ST. Temperature effects on the hydrodynamic radius of the intrinsically disordered N-terminal region of the p53 protein. *Proteins Struct Funct Bioinform.* 2014;82:668–78.
28. Hernández-Jiménez J, Salmerón-García A, Cabeza J, Vélez C, Capitán-Vallvey LF, Navas N. The effects of light-accelerated degradation on the aggregation of marketed therapeutic monoclonal antibodies evaluated by size-exclusion chromatography with diode array detection. *J Pharm Sci.* 2016;105:1405–18.
29. Lee C, Jeong M, Lee JAJ, Seo S, Cho SC, Zhang W, et al. Glycosylation profile and biological activity of Remicade<sup>®</sup> compared with Flixabi<sup>®</sup> and Remsima<sup>®</sup>. *MAbs.* 2017;9:968–77.

## Affiliations

Jesús Hermosilla<sup>1</sup> · Ricardo Sánchez-Martín<sup>1</sup> · Raquel Pérez-Robles<sup>1</sup> · Antonio Salmerón-García<sup>2</sup> · Salvador Casares<sup>3</sup> · Jose Cabeza<sup>2</sup> · Luis Cuadros-Rodríguez<sup>1</sup> · Natalia Navas<sup>1</sup> 

✉ Natalia Navas  
natalia@ugr.es

<sup>1</sup> Department of Analytical Chemistry, Sciences Faculty/ Biomedical Research Institute ibs.Granada, University of Granada, Fuentenueva Avenue s/n, 18071 Granada, Spain

<sup>2</sup> UGC Farmacia Hospitalaria, Biomedical Research Institute ibs.Granada, Hospital Universitario San Cecilio de Granada, 18012 Granada, Spain

<sup>3</sup> Department of Physical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, 18071 Granada, Spain

## CAPÍTULO I

## **Material suplementario**

---

## CAPÍTULO I

### **Comparative stability studies of different infliximab and biosimilar CT-P13 clinical solutions by combined use of physicochemical analytical techniques and ELISA**

Jesús Hermosilla <sup>a</sup>, Ricardo Sánchez Martín <sup>a</sup>, Raquel Pérez-Robles <sup>a</sup>, Antonio Salmerón-García <sup>b</sup>, Salvador Casares <sup>c</sup>, Jose Cabeza <sup>b</sup>, Luis Cuadros-Rodríguez <sup>a</sup>, Natalia Navas <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Sciences Faculty / Biohealth Research Institute (ibs.GRANADA), University of Granada, E-18071 Granada, Spain

<sup>b</sup> UGC Intercentro Interniveles Farmacia Granada, “San Cecilio Hospital”, Biohealth Research Institute (ibs.GRANADA), Hospitales Universitarios de Granada, E-18012 Granada, Spain

<sup>c</sup> Department of Physical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, E-18071 Granada, Spain

\* Corresponding author.

E-mail address: natalia@ugr.es (N. Navas)

Fuentenueva Avenue s/n, 18071 Granada, Spain.

Telephone / Fax number: ++ 34 958 242868 / ++ 34 958 243328

**Note:** Supplementary material is showed in the order that is cited in the text.



**Supplementary Table 1****Table 1** Remicade® and Remsima™/Inflectra™ batches indicating the samples prepared and the techniques used on each one.

<b>Remicade®</b>		
<i>Batch</i>	<i>Techniques</i>	<i>Concentrations (mg/mL)</i>
8RMAG0901 (4 samples)	CD	10 (2 samples); 2 (2 samples)
7RMKA91101 (4 samples)	DLS	10 (2 samples); 2 (2 samples)
7RMA65701 (4 samples)	IT-F	10 (2 samples); 2 (2 samples)
8RMKA90601 (4 samples)	ELISA	10 (2 samples); 0.4 (2 samples)
	DLS	0.4
	CD	0.4
	IT-F	0.4
	SE/UHPLC-UV UV	0.4
	RP/UHPLC-UV	0.4
<b>Remsima™</b>		
<i>Batch</i>	<i>Techniques</i>	<i>Concentrations (mg/mL)</i>
17B1M09FE1 (4 samples)	ELISA	10 (2 samples); 0.4 (2 samples)
	DLS	0.4
	CD	0.4
	IT-F	0.4
	SE/UHPLC-UV	0.4
	RP/UHPLC-UV	0.4
<b>Inflectra™</b>		
<i>Batch</i>	<i>Techniques</i>	<i>Concentrations (mg/mL)</i>
213028 (4 samples)	CD	10 (2 samples); 2 (2 samples)
257077 (4 samples)	DLS	10 (2 samples); 2 (2 samples)
	IT-F	10; 2

*CD* Far UV Circular Dichroism, *IT-F* Intrinsic Tryptophan Fluorescence, *DLS* Dynamic Light Scattering, *SE/UHPLC-UV* Size Exclusion Ultra-High Performance Liquid Chromatography with UltraViolet detection, *RP/UHPLC-UV* Reverse Phase Ultra-High Performance Liquid Chromatography with UltraViolet detection, *ELISA* Enzyme Linked Immunosorbent Assay.

## CAPÍTULO I

### Supplementary “Materials and reagents”

The 250 mL sodium chloride (0.9%) infusion bags were from Baxter S.L (Valencia, Spain). The 10 mL sterile water for injection ampoules came from Fresenius Kabi España S.A.U (Barcelona, Spain). Lubricant-free luer-lock Injekt1 syringes (BN: 4606728V) were obtained from B. Braun (Melsungen, Germany). Nunc maxisorp microplates were supplied by Labclinic S.A. (Barcelona, Spain). Anti-human IgG (whole molecule)-peroxidase antibody from rabbit, O-Phenylenediamine Dihydrochloride -as “the sigmafast opd”- (OPD), Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ), Guanidine Hydrochloride (GnHCl) and ammonium acetate LC-MS purity grade were supplied by Sigma Aldrich (Madrid, Spain). Sodium carbonate, sodium hydrogen carbonate, sodium chloride, potassium chloride, disodium phosphate monohydrate and potassium phosphate monobasic were supplied by Panreac (Barcelona, Spain). Tween 20 was supplied by Fluka Chemika (Madrid, Spain). Skimmed milk powder “La Asturiana” (Oviedo, Spain) was acquired in the local market. Acetonitrile LC-MS purity grade (ACN) was supplied by VWR International Eurolab S.L. (Barcelona, Spain). Trifluoroacetic acid LC-MS purity grade (TFA) was obtained from Scharlab S.L. (Barcelona, Spain). Size exclusion column standard calibration (Advance BioSEC 300 Å protein standard) was supplied by Agilent technologies (California, USA). Reverse-osmosis-quality water purified ( $\geq 18$  M/cm) with a Milli-RO plus Milli-Q station from Millipore Corp. (Madrid, Spain) was used throughout the study.

**Supplementary “Far UV Circular Dichroism”**

CD spectroscopy in the far region was used to monitor conformational changes over time in both INF and CT-P13 solutions. Previously, the method was validated by subjecting the 10 mg/mL reconstituted solutions of the drugs to a temperature ramp from 20 to 75°C, to hypertonic medium and F-T cycles. The concentration to be analyzed was optimized to 0.5 mg/mL, so drugs solutions of 10 mg/mL and 2 mg/mL were diluted with deionized water and isotonic solution respectively. We also ensured that CD spectra were independent of the medium used for diluting samples, which meant that water and NaCl 0.9%. 0.4 mg/mL drug solutions were analyzed without further dilutions. A quartz cuvette with a path length of 0.1 cm was used. Spectra were recorded with a scan speed of 50 nm/min with 6 accumulations. The blank was measured and subtracted from the samples. Savitzky-Golay smoothing was applied to all the spectra with Spectra Manager software and they were converted to molar Ellipticity using the following equation:

$$[\theta]_{molar,\lambda} = 100000 * \theta_{\lambda} / m * d$$

where  $\theta_{\lambda}$  is the ellipticity observed in millidegrees (mdeg);  $d$  is the path length of the cell (in cm) and  $m$  is the molar concentration in mol/L.

## CAPÍTULO I

### **Supplementary “Intrinsic Tryptophan Fluorescence”**

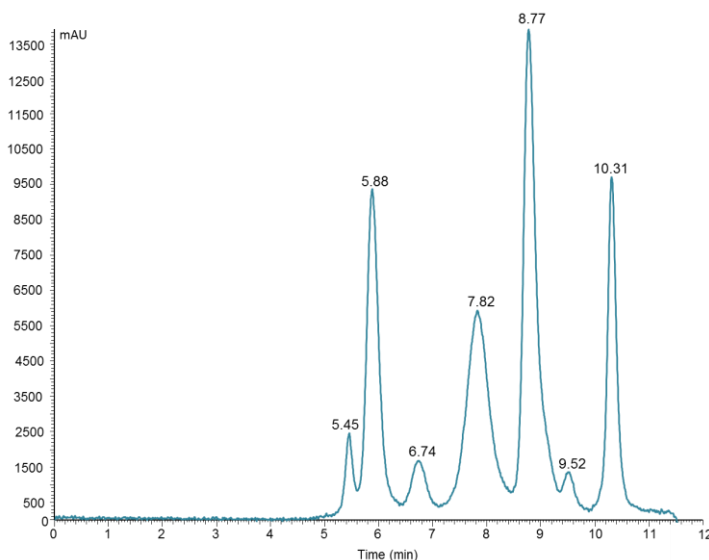
Emission spectra were recorded from 300 to 460 nm with the excitation wavelength set to 298 nm. The temperature of the samples was kept at 20°C using a thermostatically controlled cell holder. A total of 5 spectral accumulations were performed for all measurements in order to maximize the signal to noise ratio. For 10 mg/mL samples, the excitation slit was set to 5 nm and the emission slit to 2.5 nm, avoiding further dilutions of the drugs. For the rest of the samples both the excitation and the emission slits were set to 5 nm. Blank was measured with the appropriate solvent without the antibody.

**Supplementary “SE/UHPLC-UV-(native) MS -Fig. 1 and Fig. 2-”****1 Method**

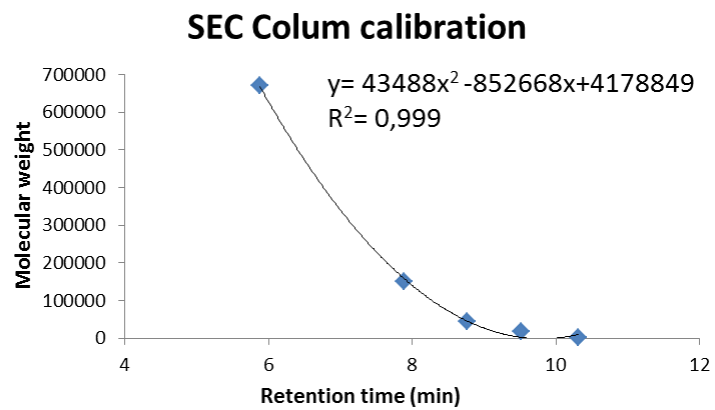
Drug chromatographic evaluation was carried out in a SEC column 300A, 2.7 $\mu$ m, 4.6x300mm (AdvanceBioSec, Agilent technologies, California, USA) with a column temperature set at 30°C. The flow rate was 0.3 mL/min and 20  $\mu$ L of sample were injected into the column for analysis. The eluent solvent was composed of 50 mM of ammonium acetate. An isocratic elution mode was applied for 12min. The UV chromatograms were registered at 220nm. The mass spectra were recorded from 4 min to 11 min in positive mode at 17500 resolution full scan ranging from 2000 to 6000 m/z. The mass spectrometric instrumental parameters were set as follows: the spray voltage was 4.00kV, the sheath gas flow rate was 10 arbitrary units and the capillary temperature was 320°C.

**2 SE column calibration**

4  $\mu$ L of a commercial protein standard solution were injected into the chromatograph to calibrate the SEC column. The solution was composed of 5 proteins: thyroglobulin (670 kDa),  $\gamma$ -globulin (150 kDa), ovalbumin (45 kDa), myoglobin (17 kDa) and angiotensin II (1 kDa).



**Fig. 1** Chromatogram of the standard proteins for Size Exclusion (SE) calibration column. Thyroglobulin (5.88 min),  $\gamma$ -globulin (7.82 min), ovalbumin (8.77 min), myoglobin (9.52 min), angiotensin II (10.31 min).



**Fig. 2** Experimental size exclusion column calibration model.

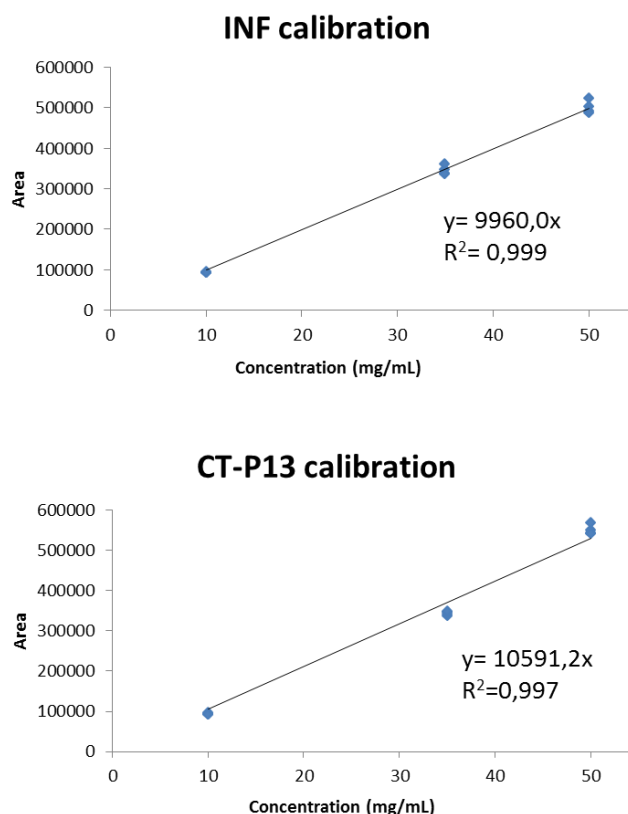
## Supplementary “RP/UHPLC-UV -Fig. 3 and Table 2-”

**1 Method**

A binary gradient of 0.04% TFA in deionized water (eluent A) and 0.04% TFA in ACN (eluent B) was used. The column was equilibrated with 30% of eluent B for 5 min. A linear gradient was then 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 column temperature was maintained at 60°C and the flow rate was sustained at 0.25 mL/min. The UV chromatograms were registered at 214 nm.

**2 Validation**

Calibration was carried out using fresh drug solutions (prepared right after reconstitution of the medicines) from 10 to 50 mg/L as standard. The calibration curves were fitted by least squares regression (LS).



**Fig. 3** Experimental calibration curves of infliximab and CT-P13 Reverse Phase Ultra-High Performance Liquid Chromatography with UltraViolet (RP/UHPLC-UV) quantification.

## CAPÍTULO I

**Table 2** Accuracy of the Reverse Phase Ultra-High Performance Liquid Chromatography with UltraViolet (RP/UHPLC-UV).

<b>mAb</b>	<b>Reference (mg/L)</b>	<b>Relative standard deviation (%)</b>	<b>Found (mg/L)</b>	<b>Relative error (%)</b>
a) INF standard solutions <sup>1</sup>				
INF	50	—	49.8	-0.5
	35	—	35.4	1.1
	10	—	9.8	-1.9
b) INF validation solutions <sup>1</sup>				
INF	1450	17.6	1395	-3.8

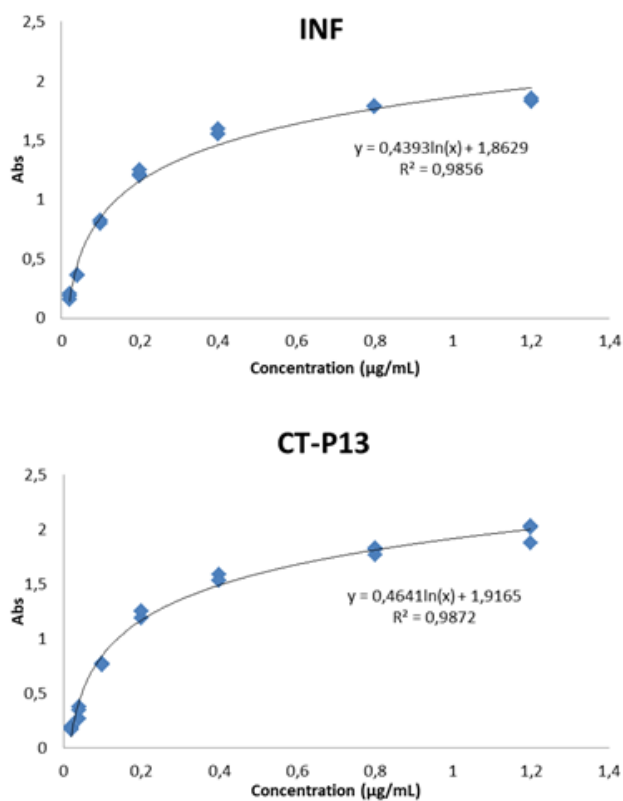
(1) Three independent analysis



**Supplementary “ELISA for INF and CT-P13 -Fig. 4 and Table 3-”****1 Method**

96-well Maxisorp immune plates were sensitized with TNF- $\alpha$  by incubation ‘overnight’ to 4°C using 200  $\mu$ L/well of 0.1  $\mu$ g/mL of TNF- $\alpha$  dissolved in 0.1 M carbonate buffer solution (pH 9.6). The plate was washed (VASHER RT-2600C microplate washer, Comecta, Abrera, Barcelona) four times. The washes (using the washing buffer solution - PBS pH 7.4 containing 0.3% (v/v) Tween<sup>®</sup> 20) were alternated with aspirations. It was then treated with 100  $\mu$ l of the blocking buffer (PBS pH 7.4 containing 2% (w/v) skim milk) per well for 2 h at 37°C to eliminate nonspecific absorptions. The plate was again washed four times with PBS as explained above and filled with 100  $\mu$ l of INF and CT-P13 appropriately diluted with 0.1 M carbonate buffer pH 9.6 at several concentrations ranging from 0.02  $\mu$ g/mL to 1.2  $\mu$ g/mL. After incubating for 45 min at 37°C, the plate was washed four times with PBS and incubated again with 100  $\mu$ l/well of a solution of 5  $\mu$ g/mL of peroxidase-labeled rabbit anti-human IgG prepared in 0.1 M carbonate buffer solution pH 9.6 for 30 min at 37°C. After washing four times with PBS, 100  $\mu$ l of the substrate solution (OPD) was added to each well and incubated for 20 min in darkness at room temperature (around 24 °C). The reaction was stopped by adding 50  $\mu$ l of 1 M sulfuric acid to each well. The absorbance was recorded at wavelengths of 450 nm and 620 nm, and the analytical signal was the difference between the two absorbance values (TECAN SUNRISE™ microplate absorbance reader for 96-well plates connected to a computer loaded with XFluor4 software, Tecan, Austria, GMBH).

## 2 Elisa validation



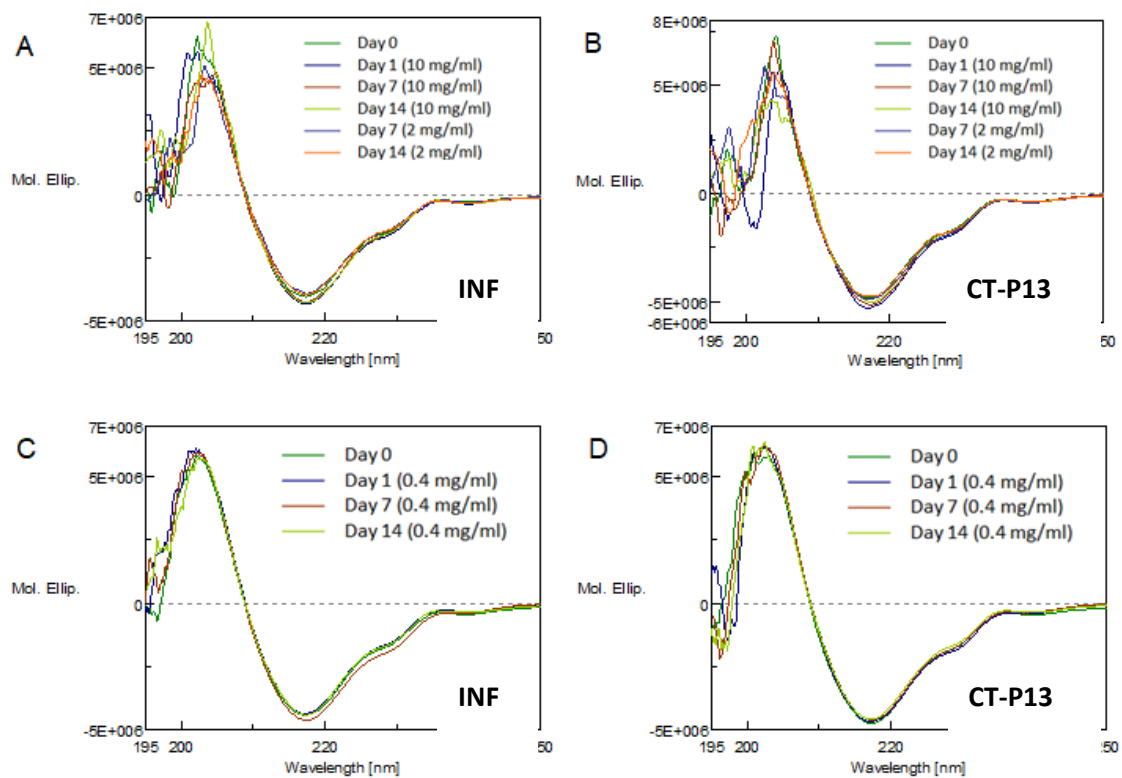
**Fig. 4** Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) calibration functions of INF and CT-P13. Absorbance is represented as a function of INF and CT-P13 concentrations.

**Table 3** Precision of the ELISA method

Target [INF] µg/mL	Calculated [INF] <sup>1</sup> µg/mL	Relative standard deviation (RSD %)
Intra-day precision		
5	5.4	5.5
2	1.8	7.7
0.1	0.07	6.4
Inter-(4)-day precision		
5	5.9	6.6
2	2.2	7.2

(1) Mean of 10 independent analysis

## Supplementary Figure 5



**Fig. 5** Far-UV Circular Dichroism (CD) spectra corresponding to the stability study at different concentrations over the study period (14 days): **A** (INF samples at 10 and 2 mg/mL); **B** (CT-P13 samples at 10 and 2 mg/mL); **C** (INF samples at 0.4 mg/mL) and **D** (CT-P13 samples at 0.4 mg/mL).

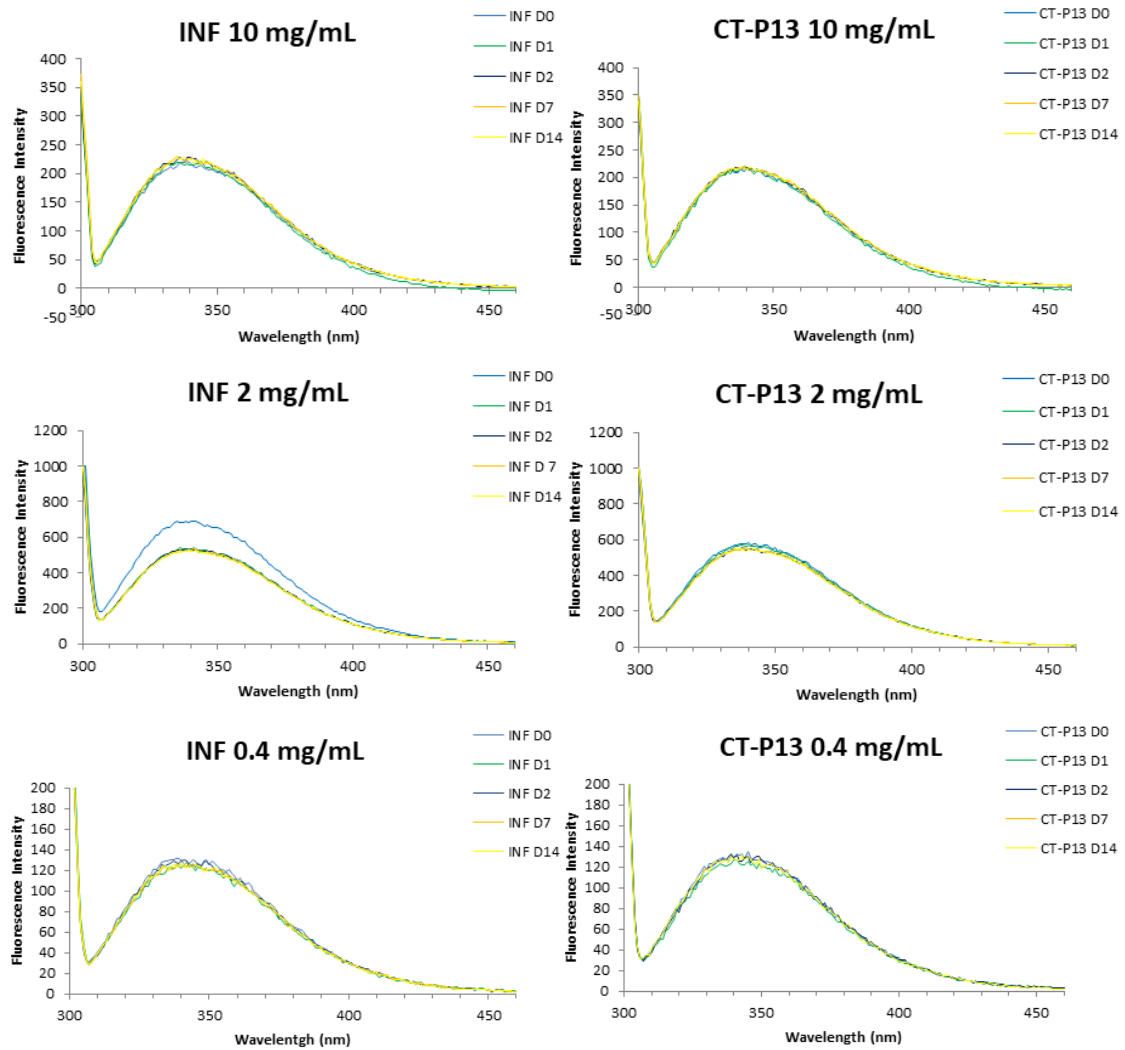
# CAPÍTULO I

## Supplementary Table 4

**Table 4.** Far UV Circular Dichroism (CD) spectral changes in INF and CT-P13 solutions (stress studies).

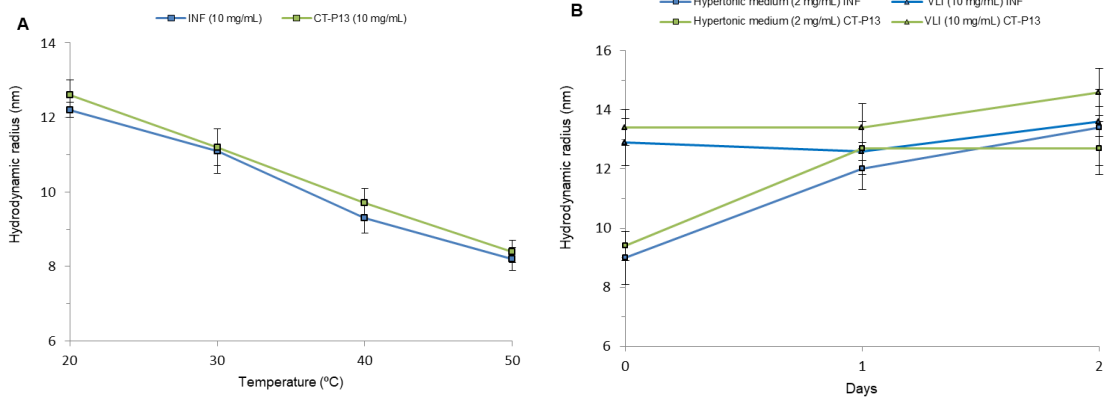
INF				CT-P13			
Stress	$\lambda_{\min}$ (nm)	$\lambda_{\text{Ellipticity}=0}$ (nm)	Shoulder	Stress	$\lambda_{\min}$ (nm)	$\lambda_{\text{Ellipticity}=0}$ (nm)	Shoulder
F-T cycles				F-T cycles			
D1	217	208.7	227.6	D1	217	208.9	227.8
D2	216.8	208.1	228	D2	217	208.1	227.8
D7	217.4	208.9	227.4	D7	217.4	209	227.8
D14	217.6	208.8	227.8	D14	217.8	209.3	228
HM 1.5 M				HM 1.5 M			
D0	217.4	209	227.4	D0	217.4	208.9	227.8
D1	217.2	209.5	228.6	D1	217.6	209.2	228.8
D2	217.4	209.4	227.8	D2	217.4	209.5	227.8
T <sup>a</sup> (°C)				T <sup>a</sup> (°C)			
20	217	208.7	228	20	217	208.8	228
45	217	208.5	228	45	218	208.8	228
55	218	208.3	227	55	217	208.6	229
65	223	205.7	-	65	220	203.4	-
75	-	200.1	-	75	-	198.8	-

## Supplementary Figure 6



**Fig. 6** Intrinsic Tryptophan Fluorescence (IT-F) spectra of INF and CT-P13 samples at the different concentrations tested over the study period (14 days).

Supplementary Figure 7



**Fig. 7** Average Hydrodynamic Radius  $\pm$  Standard Deviation (HR  $\pm$  SD) -estimated by Dynamic Light Scattering (DLS) - of INF and CT-P13 solutions samples subjected to forced degradation stresses. Visible light radiation, hypertonic medium (A) and temperature (B)

## Supplementary Table 5

**Table 5** Polydispersity of the stressed INF and CT-P13 solutions.

<i>Stress applied</i>	<i>Polydispersity ± SD</i>			
<b>F-T cycles</b>	<b>1º</b>	<b>2º</b>	<b>3º</b>	<b>4º</b>
INF	46.4 ± 8.4	48.8 ± 9.1	50.4 ± 8.1	50 ± 9.3
CT-P13	47.9 ± 8.6	48.8 ± 9.6	45.8 ± 8.7	51.2 ± 8.4
<b>Temperature (°C)</b>	<b>20</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>50</b>
INF	45.8 ± 9.5	46.9 ± 10	36.5 ± 9.5	30.7 ± 8.3
CT-P13	46.5 ± 7.9	42.3 ± 9.2	40 ± 12	33.9 ± 9.4
<b>Ionic strength (1.5M)</b>	<b>D0</b>	<b>D1</b>	<b>D2</b>	
INF	39.4 ± 11.5	40.8 ± 10.1	34 ± 10.8	
CT-P13	32 ± 9.2	39.8 ± 10.2	43.3 ± 12.6	
<b>VLI</b>	<b>D0</b>	<b>D1</b>	<b>D2</b>	
INF	49.8 ± 9.8	47.1 ± 7.2	45.3 ± 8.6	
CT-P13	49.4 ± 9.5	50.5 ± 8.4	48.6 ± 8.2	

*F-T* Freeze/Thaw*VLI* Visible Light Irradiation

# CAPÍTULO I

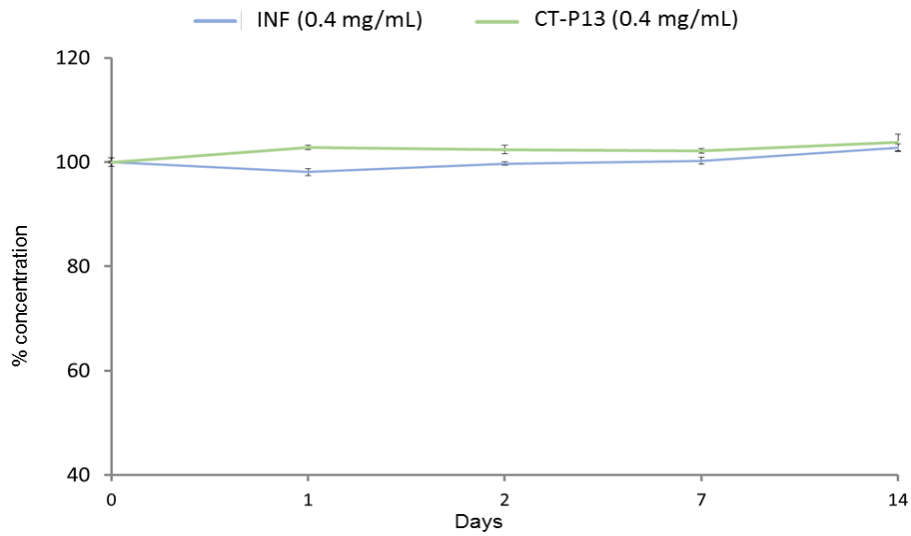
## Supplementary Table 6

**Table 6** Averaged polydispersity over the course of the stability study.

Concentration (mg/mL)	Polydispersity $\pm$ SD				
	D0	D1	D2	D7	D14
<b>10</b>					
INF	51.1 $\pm$ 9	47.7 $\pm$ 9.1	45.8 $\pm$ 9.5	43.2 $\pm$ 9.1	46.8 $\pm$ 8.8
CT-P13	50.1 $\pm$ 9.7	49.1 $\pm$ 8.9	46.5 $\pm$ 7.9	47.1 $\pm$ 8.6	45.8 $\pm$ 8.9
<b>2</b>					
INF	35 $\pm$ 9.6	34 $\pm$ 10	31.6 $\pm$ 11.1	30.2 $\pm$ 9.7	-
CT-P13	34.8 $\pm$ 10.3	30.2 $\pm$ 10.6	29 $\pm$ 9	26.1 $\pm$ 8.7	34.8 $\pm$ 11.3
<b>0.4</b>					
INF	31 $\pm$ 9.9	29.1 $\pm$ 11.3	27.2 $\pm$ 10.2	30.4 $\pm$ 11.6	43.1 $\pm$ 11.1
CT-P13	32.6 $\pm$ 12	33.9 $\pm$ 9.8	39.2 $\pm$ 11.6	26.1 $\pm$ 10.3	25.1 $\pm$ 11.9



## Supplementary Figure 8



**Fig. 8** Average concentration -calculated by Reverse Phase Ultra-High Performance Liquid Chromatography with UltraViolet detection (RP/UHPLC-UV) - of INF 0.4 mg/mL (A) and CT-P13 0.4 mg/mL (B) solutions in polyolefin bags over the study period (14 days).

# CAPÍTULO I

## Supplementary Table 7

**Table 7.** Statistical analysis of functional activity of INF and CT-P13 samples by ELISA.

	Concentration	Data tested	D1 vs D0	D2 vs D0	D7 vs D0	D60 vs D0
INF	10 mg/mL	P-value	1	1	1	1
		Are means sig diff?	No	No	No	No
	0.4 mg/mL	P-value	0.9930	0.9055	1	0.4502
		Are means sig diff?	No	No	No	No
CT-P13	10 mg/mL	P-value	0.9738	0.9905	0.8605	0.9033
		Are means sig diff?	No	No	No	No
	0.4 mg/mL	P-value	0.3670	0.9970	1	0.9999
		Are means sig diff?	No	No	No	No

*ELISA* Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

**CAPÍTULO II**  
Comprehensive biophysical and  
functional study of ziv-aflibercept:  
Characterization and forced degradation

## CAPÍTULO II

# Resumen

---

En el capítulo II, se han puesto a punto métodos de análisis para llevar a cabo una caracterización comprensiva de la proteína de fusión-Fc terapéutica ziv-aflibercept (Zaltrap®). Los objetivos fueron, por un lado, validar los métodos analíticos, mientras que, por otro, fue evaluar el impacto de la manipulación hospitalaria sobre la estabilidad de dicho biofármaco. Para ello, disoluciones del medicamento Zaltrap® fueron sometidas a diferentes condiciones de degradación acelerada y controlada: luz, temperatura elevada, ciclos de congelación/descongelación, variación del pH, dilución en una disolución hipertónica de NaCl, y dilución en solución desnaturizante fuerte (cloruro de guanidinio). La metodología aplicada se basó en el análisis de las disoluciones estresadas mediante las técnicas analíticas seleccionadas para detectar la agregación (DLS y (SE/HPLC-DAD)), cambios en las estructuras secundarias (DC en el UV), cambios en la conformación o en la estructura terciaria (fluorescencia intrínseca del triptófano) y alteraciones en la funcionalidad (ELISA). Las técnicas de microscopía de transmisión de electrones y los ensayos de unión a tioflavina T y Congo Red han sido herramientas complementarias para caracterizar los agregados de tipo  $\beta$ -amiloides. Los resultados indicaron que la agregación es una vía de degradación común. Se detectaron dos tipos diferentes de agregados: dímeros y agregados de alto peso molecular atribuidos a estructuras tipo  $\beta$ -amiloides. La estructura secundaria se mantuvo en la mayoría de las pruebas de estrés, mientras que la conformación se alteró en casi todas las pruebas, excepto en los ciclos de congelación/descongelación. La funcionalidad, evaluada por su reacción inmunoquímica con el VEGF, resultó estable, pero con disminución al exponerse a la luz y con probable inactivación parcial del fármaco cuando se alteró el pH. Como conclusiones, se ha indicado que las disoluciones del medicamento biotecnológico Zaltrap® deben ser protegidas de la luz y evitar medios hipertónicos en las diluciones entre otras, y se ha destacado la fragilidad y fácil degradación de esta proteína de fusión, la cual, además, agrega en unas estructuras particulares tipo  $\beta$ -amiloides no descritas previamente en bibliografía.

## CAPÍTULO II

# Publicación

---

## CAPÍTULO II



# Comprehensive biophysical and functional study of ziv-aflibercept: characterization and forced degradation

Jesús Hermosilla<sup>1</sup>, Raquel Pérez-Robles<sup>1</sup>, Antonio Salmerón-García<sup>2</sup>, Salvador Casares<sup>3</sup>, Jose Cabeza<sup>2</sup>, Jonathan Bones<sup>4</sup> & Natalia Navas<sup>1\*</sup>

Aflibercept (AFL) is an Fc fusion protein used in the treatment of colorectal cancers and different ophthalmological diseases. There are two medicines in which AFL is the active substance: Zaltrap and Eylea, referred as ziv-AFL and AFL respectively. No proper accelerated degradation studies were published on either AFL or ziv-AFL. These studies are essential during research, development and manufacturing stages. Here, we characterized ziv-AFL and submitted it to different stress conditions: light, 60 °C, freeze-thaw cycles, changes in pH, high hypertonic solution and strong denaturing conditions. We used an array of techniques to detect aggregation (SE-HPLC/DAD and DLS), changes in secondary structure (Far-UV circular dichroism), changes in conformation or tertiary structure (Intrinsic tryptophan fluorescence) and alterations in functionality (ELISA). Results indicate that aggregation is common degradation pathway. Two different types of aggregates were detected: dimers and high molecular weight aggregates attributed to  $\beta$ -amyloid-like structures. Secondary structure was maintained in most of the stress tests, while conformation was altered by almost all the tests except for the freeze-thaw cycles. Functionality, evaluated by its immunochemical reaction with VEGF, was found to be stable but with decrease when exposed to light and with likely partial inactivation of the drug when pH was altered.

Fc-fusions proteins are a well-established class of biotherapeutics. They are composed of the Fc region of the IgG antibody (Hinge-CH2-CH3) and a desired linked protein. Although the top-selling biotherapeutics are monoclonal antibodies (mAbs), there is increasing use of therapeutic Fc-fusion proteins in medicine today<sup>1</sup>. One of these is aflibercept (AFL), a recombinant human Fc-fusion protein that –as indicated in the assessment report of Zaltrap of the European Medicine Agency<sup>2</sup>– “acts as a high-affinity soluble decoy receptor that preferentially binds to vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), VEGF-B and placenta growth factor (PlGF) and prevents these factors from activating their endogenous receptors. By blocking this pathway, AFL exerts direct anti-cancer activity and boosts the anti-cancer activity of chemotherapy agents by preventing new tumour vessel growth, regressing existing tumour vessels, normalizing vasculature, negatively affecting tumour cell function, offsetting the effects of chemotherapy induction of VEGF levels and potentially inhibiting VEGF repression of dendritic cell function”<sup>2</sup>. As a VEGF inhibitor, AFL is also classified as a VEGF-trap together with bevacizumab and ranibizumab.

Cancer therapy is not the only field of medicine to benefit from AFL, which is also being used to treat several ophthalmological diseases characterized by neovascularization. As the administration to patient varies depending on the particular illness they are suffering, two different medicines are currently available, Zaltrap (Sanofi-Aventis US, LLC, Bridgewater, New Jersey, USA and Regeneron Pharmaceuticals, Inc, Tarrytown, New York, USA), which is indicated for the treatment of metastatic colorectal carcinoma resistant to an oxaliplatin-containing regimen<sup>3</sup> and Eylea (Regeneron, Tarrytown, New York, USA and Bayer Healthcare, Leverkusen, Germany), an

<sup>1</sup>Department of Analytical Chemistry/Institute for Biomedical Research (ibs.GRANADA), University of Granada, E-18071, Granada, Spain. <sup>2</sup>Department of Clinical Pharmacy, San Cecilio University Hospital, Institute for Biomedical Research, (ibs.GRANADA), 18016, Granada, Spain. <sup>3</sup>Department of Physical Chemistry/Institute of Biotechnology, University of Granada, E-18071, Granada, Spain. <sup>4</sup>Characterisation and Comparability Laboratory, NIBRT., Fosters Avenue, Mount Merrion, Blackrock, Co., Dublin, Ireland. \*email: [natalia@ugr.es](mailto:natalia@ugr.es)

ophthalmologic medicine approved for the treatment of wet age-related macular degeneration<sup>4,5</sup> and macular oedema from retinal vein occlusion or diabetes<sup>6</sup>. AFL is identical in both medicines but differently formulated. In order to distinguish between the two, the AFL from Zaltrap is normally referred to as ziv-AFL.

Given the widespread, generalized incidence of the diseases they are approved for, these two medicines are used worldwide. From a commercial point of view, although both medicines are expensive, ziv-AFL is much cheaper than AFL<sup>7</sup> and this has led clinical studies to be conducted to evaluate the possible use of ziv-AFL in the treatment of ocular diseases<sup>7,8</sup>. Surprisingly, only one of these studies evaluated the stability of ziv-AFL in *ad-hoc* formulations for intravitreal injection administration, although it only tested its capacity to bind to the VEGF over time by ELISA<sup>9</sup>, and did not study any of the physicochemical attributes of ziv-AFL. Although more research has been done on AFL (Eylea), few analytical studies have been carried out and most of these have focused on various physicochemical and functional properties of AFL in pharmaceutical compounding in pre-filled syringes<sup>10</sup>. To the best of our knowledge, no forced degradation studies of ziv-AFL (Zaltrap) have been described to date. These studies are essential in that they are an integral part of biopharmaceuticals research and development and serve a variety of objectives ranging from early stage manufacturability evaluation to supporting comparability assessments both prior to and after approval for sale<sup>11</sup>. Forced degradation studies are also of great importance for quality control of these drugs after compounding in routine hospital use before administration, as they can test the impact of handling of the drug on its stability from the time it is released by the manufacturer up until its administration to patients<sup>12</sup>. In the most similar previously published paper, researchers studied AFL (Eylea) under physiological conditions as well as when incorporated into drug delivery systems<sup>13</sup>, and analysed the changes it undergoes when submitted to different temperatures and pH values. Although this paper presented valuable results, it did not focus on degradation studies.

It is well known that the degradation of recombinant therapeutic proteins has a negative impact on product quality, safety and efficacy and must therefore be detected when it occurs. Forced degradation studies can provide an in-depth understanding of the physicochemical and functional properties of the proteins, including the identification of the major degradation pathways that could not be observed in stability studies performed in real time<sup>11</sup>. In general, forced degradation studies are conducted by submitting a particular biopharmaceutical product to a range of experimental stress conditions. These conditions should avoid applying excessive or too little stress<sup>14</sup>. However, there are no practical protocols available for the preparation of stress tests on bio-pharmaceuticals nor there are well-established acceptance criteria to interpret the results obtained<sup>15</sup>. As a result, the particular stress tests and the conditions applicable in each one are normally decided by researchers themselves on the basis of their previous experience. These researchers are normally from academic institutions and biopharmaceutical companies.

In this paper, using an appropriate set of physicochemical and functional techniques, we perform a comprehensive analytical characterization of ziv-AFL (Zaltrap) and a forced degradation study in order to expand our knowledge of this complex Fc-fusion protein. We present, for the first time, some interesting results about this widely used Fc-protein that could also be very useful for evaluating the risks associated with its handling.

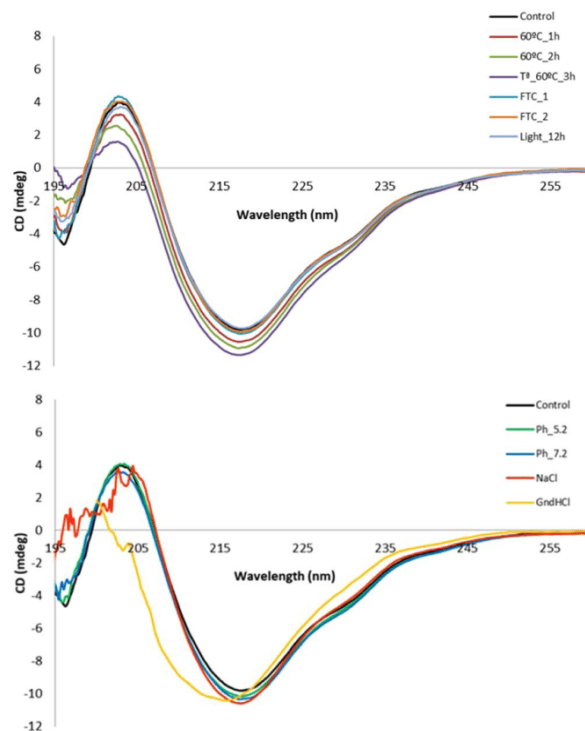
## Results

Ziv-AFL medicine (Zaltrap) was submitted to six forced degradation conditions: (i) exposure to high temperature (60 °C and 70 °C) for 1, 2 and 3 hours, (ii) exposure to light irradiation (250 W/m<sup>2</sup>) in an aging chamber (Solarbox 3000e RH, Cofomegra), (iii) 1 and 2 freeze-thaw cycles, (iv) pH = 5.2 and pH = 7.2, (v) exposure to a hypertonic medium, NaCl 1.5 M, and (vi) exposure to denaturing conditions by diluting ziv-AFL in GndHCl 8 M. A thermal stability study was performed by Circular Dichroism from 20 to 90 °C. There are no official documents explaining how to conduct forced degradation studies, except for the test involving exposure to light irradiation<sup>16</sup>. The stress study was therefore designed by considering a range of stress factors to which the medicine might be exposed in real-life conditions. In addition, GndHCl stress was used to study ziv-AFL in denatured conditions.

The aliquots were analysed using an array of methods to measure possible changes in the structure of ziv-AFL. A physicochemical and functional characterization of ziv-AFL was performed. A soluble particulates profile (dynamic Light Scattering –DLS– and analytical Size Exclusion Chromatography –SEC–), a conformational study of secondary and tertiary structures (circular dichroism –CD– and Intrinsic Tryptophan Fluorescence –IT-FS–spectroscopies) and a functional assay (ELISA) were also conducted.

**Visual inspections.** The samples remained clear after the stress tests had been performed. No precipitates or particulate matter could be detected with the naked eye, except for the sample subjected to temperature stress at 70 °C. The exposure of ziv-AFL medicine to a temperature of 70 °C for 1 h caused the formation of a viscous opalescent material. This sample was analysed by ThT and Congo Red experiments in order to confirm whether it was an amyloid-like structure (Supplementary Data, Fig. 1).

**Circular dichroism (CD).** Alterations in the secondary structure are one of the first indicators of protein inactivation when exposed to different conditions<sup>13</sup>. Several ziv-AFL (Zaltrap, 25 mg/mL) fresh samples were diluted to 0.25 mg/mL and characterized by Far UV CD. At this concentration Ziv-AFL has the characteristic Far UV spectrum shown in Fig. 1 which was characterized by a wavelength of 207 ± 0.1 nm with ellipticity = 0; wavelength of the minimum at 217.5 ± 0.3 nm and a shoulder at around 229 ± 0.2 nm. These three checkpoints in the spectra were tracked in the stressed samples in order to detect changes in the secondary structures of ziv-AFL and the results obtained are presented in Table 1. The wavelength corresponding to ellipticity = 0 was considerably modified in the GndHCl stressed sample, a change that was expected as it was used as a positive control for protein denaturalization. This wavelength was also significantly altered when the sample was subjected to temperature stress, and slightly in the pH 7.2 and NaCl 1.5 M stresses. The wavelength of the minimum (217.5 nm) remained unchanged except in the case of GndHCl stress. The shoulder at 229 nm was modified in the GndHCl



**Figure 1.** Far-UV CD spectra of all the stressed samples compared with ziv-AFL control samples (black line).

Stress	Wavelength (nm) (Ellipticity = 0)	Minimum (nm)	Broad shoulder (nm)	Ellipticity at (215 nm)
Control	207.0 ± 0.1	217.5 ± 0.3	229 ± 0.2	-9.2
60 °C 1 h	<b>206.5</b>	217.4	228.8	-10
60 °C 2 h	<b>205.9</b>	217.4	229.0	-10.4
60 °C 3 h	<b>205.2</b>	217.4	229.0	-10.8
FTC 1	207.0	217.4	228.6	-9.4
FTC 2	207.1	217.6	228.8	-9.3
pH 5.2	206.9	217.6	229.0	-9.6
pH 7.2	206.7	217.4	228.8	-9.7
Light 12h	206.9	217.8	228.6	-9.1
GndHCl 8 M	<b>201.7</b>	<b>215.6</b>	<b>230</b>	-10.4
NaCl 1.5 M	207.2	217.4	229.2	-10

**Table 1.** Secondary structures of ziv-AFL samples tracked by changes in the Far UV CD spectra. Italic and bold: datum with significant difference respect to control.

stress test. Ziv-AFL was only partially denatured by GndHCl as indicated by the CD spectra (Fig. 1). This was probably due to the dilution made prior to recording the CD spectra, when the sample was tested at the analysis concentration (ziv-AFL 0.25 mg/mL) in a similar GndHCl medium as the medicine was (GndHCl 8 M), complete denaturation of the protein was indicated by the flat, featureless CD spectra. Ellipticity was additionally monitored at 215 nm in order to detect aggregation processes: 60 °C stress and GndHCl 8 M stress caused the greatest signal drop followed by NaCl 1.5 M, then by pH 7.2 and pH 5.2. The tests that caused the least stress were the F/T cycles and exposure to light. Nevertheless, aggregation was studied in greater depth with DLS and SEC.

Thermal stability was checked by applying a ramp from 20 °C to 90 °C. The CD spectra remained visually unaltered up to 60 °C (Supplementary Data, Fig. 2). Temperatures over 60 °C caused notable spectral changes. A percentage estimation of secondary structures showed a decrease in  $\beta$ -sheet structures and an increase in unordered structures.

Concentration (mg/ml)	Stress	R <sub>h</sub>	P <sub>d</sub> (%)
25 mg/mL	Control	10.1 ± 0.4	9.9 ± 6.4
	60 °C 1 h	<b>15.8</b>	<b>43.0</b>
	60 °C 2 h	<b>13.6</b>	10.8
		40.8	15.9
	60 °C 3 h	<b>17.8</b>	12.4
		49.1	19.8
	FTC 1	10.0	10.0
	FTC 2	10.1	10.7
	pH_5.2	—	—
	pH_7.2	10.3	11.6
Light stress 12 h	9.9	12.4	
0.6 mg/mL	Control	5.4 ± 0.3	16 ± 4.9
	GndHCl	<b>8.3</b>	11.9
	NaCl	5.2	12.1

**Table 2.** Average hydrodynamic radius (R<sub>h</sub>) and polydispersity (P<sub>d</sub>) of ziv-AFL samples. Italic and bold: datum with significant difference respect to control.

Stress	Centre of spectral mass (C.M) (fluorescence spectrum)
Control (25 mg/mL)	346.4
60 °C 1 h	348.0
60 °C 2 h	348.6
60 °C 3 h	349.0
FTC 1	346.4
FTC 2	346.4
pH 5.2	346.6
pH 7.2	346.5
Light stress	347.2
GndHCl	359.4
NaCl	345.9

**Table 3.** Ziv-AFL tertiary structure assessed by means of the Centre of spectral mass (C.M) of the fluorescence spectrum.

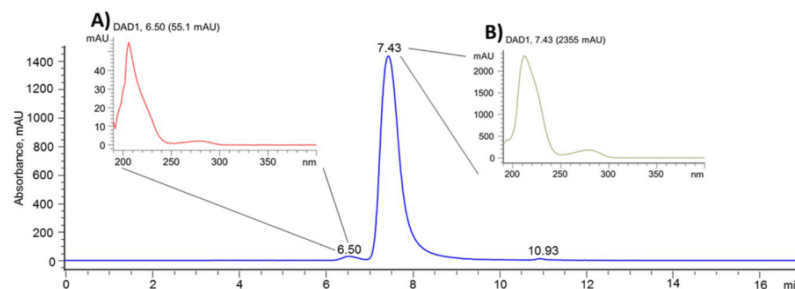
The secondary structure content estimated from the CD spectra after mathematical deconvolution reflected a majority of β strands and random coil conformation, in line with the IgG1 based-structure of ziv-AFL<sup>17</sup> (Supplementary Data, Table 1). Changes indicated above in the CD spectra were not clearly transferred to the secondary structure estimated by this approach.

**Dynamic light scattering (DLS).** DLS results are shown in Table 2. The Ziv-AFL (Zaltrap, 25 mg/mL) medicine sample showed a single population of particles with a hydrodynamic radius (R<sub>h</sub>) of 10.1 nm and a polydispersity (P<sub>d</sub>) of 9.9%. Temperature was the only stress that increased the R<sub>h</sub>. Moreover, after 2 h and 3 h of exposure the monodisperse population was split into two with P<sub>d</sub> also increasing significantly. The R<sub>h</sub> and P<sub>d</sub> remained unaltered in all other stress conditions tested.

In order to subject Ziv-AFL medicine (Zaltrap, 25 mg/mL) to the stress of GndHCl and NaCl media, samples were diluted in distilled water to 0.6 mg/mL. Fresh samples of ziv-AFL at this concentration were analysed as control. These samples showed a single population with an average R<sub>h</sub> of 5.4 ± 0.3 nm and a P<sub>d</sub> of 16% (Table 2). Dilution therefore dramatically reduced the R<sub>h</sub>, while increasing the P<sub>d</sub>. In the samples stressed with GndHCl the R<sub>h</sub> increased significantly. When the samples were subjected to NaCl stress, the R<sub>h</sub> and P<sub>d</sub> remained unaltered.

**Intrinsic tryptophan fluorescence spectroscopy (IT-FS).** Significant changes can take place in the tertiary structure of the protein without this causing much change in its secondary structure, although the long-term stability of the protein may be affected. These changes in the tertiary structure can expose some hydrophobic pockets to the solvent, which makes the protein itself more prone to aggregation. Ziv-AFL (Zaltrap, 25 mg/mL) was first characterized by IT-FS, which was used to calculate the spectrum centroid (or Centre of spectral mass -C.M-), which was 346.4 nm for fresh (control) samples. Table 3 shows the Centre of spectral mass (C.M) of the fluorescence spectrum of fresh (control) and stressed samples. GndHCl, temperature (60 °C) and light stresses caused the most significant increases in the C.M value, followed by pH, which induced slight increases. NaCl stress caused a fall in the C.M value. By contrast, G.C was unaltered when the samples were subjected to F/T stress.





**Figure 2.** Representative SE/HPLC-DAD chromatogram for ziv-AFL 25 mg/mL (Zaltrap). UV spectra for the dimer population, peak at 6.50 (A) and for the monomer population, peak at 7.43 min (B).

**Size-exclusion high performance liquid chromatography with diode array detection (SE-HPLC/DAD).** Aggregation is most common form of protein degradation. With this in mind, fresh and stressed samples of ziv-AFL were analysed by SE-HPLC/DAD in order to obtain their SEC aggregates profile. As in the above studies, the ziv-AFL medicine was analysed immediately after opening the vial (fresh sample 25 mg/mL) and the resulting profile was used as a control for comparing with the chromatograms for stressed ziv-AFL samples in order to detect any changes.

The SE chromatogram for the control sample of Ziv-AFL (fresh medicine 25 mg/mL) is shown in Fig. 2. This control SEC aggregation profile displays two clear peaks. The corresponding molecular weight (MW) for each peak was calculated by using the estimated calibration model for the size-exclusion column (Supplementary Data, Figs. 3 and 4). The main peak, at  $7.42 \pm 0.02$  min ( $98.1\% \pm 0.02\%$  of the total area) was assigned to ziv-AFL monomers with an estimated MW of 164 kDa. A small peak eluting at  $6.5 \pm 0.01$  min ( $2\% \pm 0.02\%$  of the total area), just before the monomer, was assigned to natural and soluble aggregates, which due to their estimated MW of 358 kDa seem likely to be dimers.

In size-exclusion chromatography (SEC) the separation of molecules depends on their hydrodynamic volume and not on their molecular weight. The retention time is therefore affected by protein chain folding. In the case of ziv-AFL the retention time obtained for the monomers was shorter than expected for a molecule of its MW (115 kDa approx<sup>2</sup>) and, consequently, the estimated MW was higher (164 kDa). This result shows that the hydrodynamic volume of ziv-AFL is greater than the volume of the proteins used for the calibration of the column, which means that the “apparent mass” of ziv-AFL is higher than that indicated by the manufacturer<sup>2</sup>. A similar MW (150 kDa) was obtained previously for AFL (EyLea, 40 mg/mL, Bayer Pharma AG, Germany) by SDS-Page<sup>13</sup>. Ongoing research by high resolution mass spectrometry using different approaches has confirmed the indicated MW of 115 kDa approx<sup>2</sup>. Also, these current investigations have brought out the great complexity of the glycan profile that could be the responsible of the volume greater than that expected by the only considering its MW in SEC.

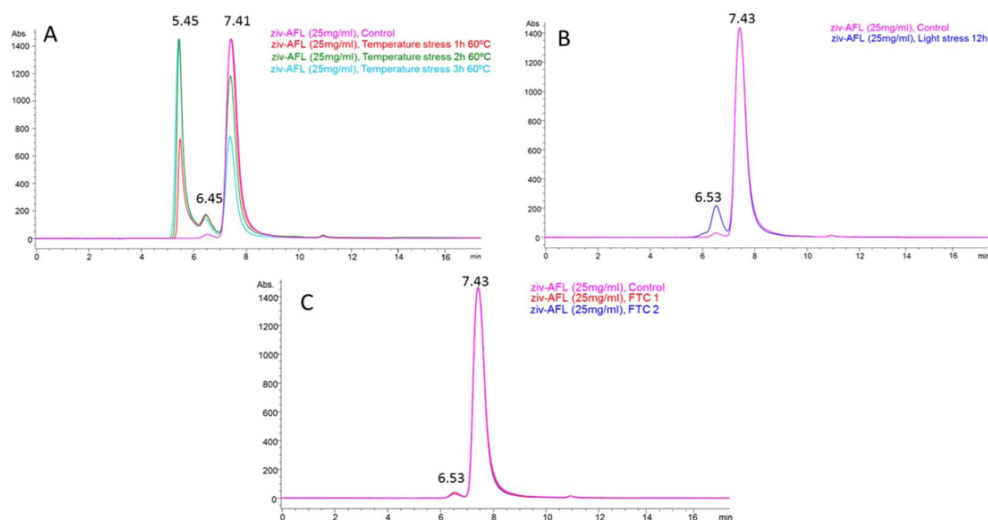
In addition, the peaks of both the monomers and the dimers exhibit similar UV spectra and a high degree of spectral peak purity (>99%) (in Fig. 2A,B. respectively).

As regards the stress study, Figs. 3 and 4. show the SEC chromatograms under physical and chemical stress conditions respectively. The retention times and percentage of the peak detected in the chromatograms are indicated in Table 4. Ziv-AFL samples submitted to 60 °C degraded gradually over time into two main entities (Fig. 3A, Table 4). The first was a dimer (6.5 min) and the second was an aggregate of about 10 ziv-AFL molecules with an estimated MW of 1666 kDa (5.45 min). The degradation promoted by light exposure (12 hours) led to the transformation of 10.5% of the monomers into dimers in 12 hours (Fig. 3B, Table 4). No changes were detected when the ziv-AFL samples were submitted to freeze-thaw cycles (Fig. 3C) and the percentage of monomers and dimers remained constant (Table 4).

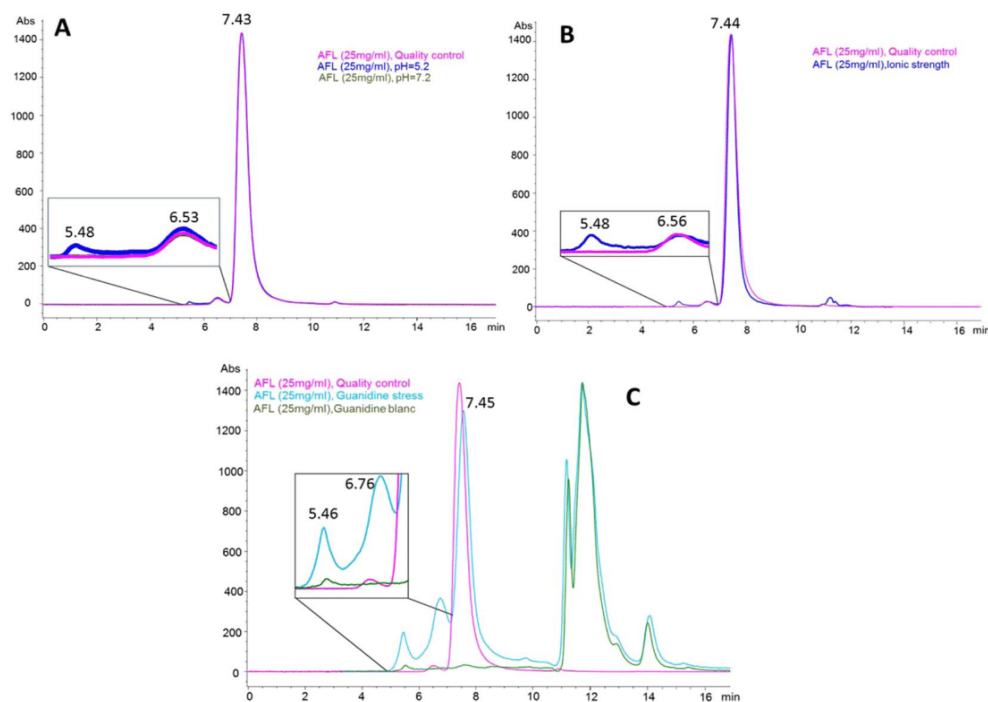
Moreover, increasing the pH by one unit (up to 7.2) compared to the original value for the medicine (6.2) did not promote ziv-AFL degradation as no changes were detected in the SEC profiles (Fig. 4A). By contrast, a more acidic pH (5.2) did lead to aggregation (Fig. 4A), with a slight increase in the dimers at 6.50 min and the detection of the HMW aggregate entity at 5.48 min, albeit representing a small percentage (0.8%). Similar degradation of ziv-AFL was detected in a high ionic strength medium, with a slight decrease in the dimers (at 5.6 min and 1.4%) and the detection of the higher order aggregation population (at 5.48 min and 1.1%) as shown in Fig. 4B and Table 4.

As expected, the presence of GndHCl in the medium (Fig. 4C) promotes high level ziv-AFL degradation; the main chromatographic peak at 7.45 min (monomers) decreased significantly (around 62.5%) in parallel with the increase in the dimers at 6.76 min (17.1%) and in the entity already detected when ziv-AFL was subjected to other stress conditions, namely a higher order of aggregation at 5.46 min (5.56%). This SEC chromatographic profile shows 2 zones: the zone where ziv-AFL and its aggregates elute (from 0 to 10 min) and the zone where the reactive elutes (from 10 to 17 min).

A chromatographic peak was detected in all the SEC profiles at a retention time of  $10.92 \pm 0.02$  min, including those from the control samples. We therefore assumed that this was due to some of the excipients used in the formulation of the medicine.



**Figure 3.** SE/HPLC-DAD chromatograms for the samples of ziv-AFL (Zaltrap 25 mg/mL) subjected to physical stress. **(A)** Ziv-AFL Temperature stress 60°C: (1) ziv-AFL control, (2) 1 hour of exposure, (3) 2 hours of exposure and (4) 3 hours of exposure. **(B)** Ziv-AFL light stress: (1) Ziv-AFL control and (2) 12 hours of exposure. **(C)** Ziv-AFL freeze-thaw stress: (1) Ziv-AFL control, (2) 1 freeze-thaw cycle and (3) 2 freeze-thaw cycles. The retention times represented in the SEC chromatograms are the mean of three chromatograms.



**Figure 4.** SE/HPLC-DAD chromatograms of samples of ziv-AFL (Zaltrap 25 mg/mL) subjected to chemical stress. **(A)** Ziv-AFL pH stress: (1) Ziv-AFL control, (2) pH = 5.2 and (3) pH = 7.2. **(B)** ionic strength stress: (1) Ziv-AFL control and (2) NaCl 1.5 M. **(C)** Ziv-AFL GndHCl stress (1) Ziv-AFL control, (2) GndHCl 8 M stressed samples and (3) GndHCl 8 M, blank sample. The retention times represented in the SEC chromatograms are the mean of three chromatograms.

Stress	Monomer		Dimer		Non-natural HMW aggregates	
	Retention time (min)	Abundance (%)	Retention time (min)	Abundance (%)	Retention time (min)	Abundance (%)
Control	7.43	98.1	6.50	1.9	—	—
60 °C 1 h	7.42	69.9	6.48	8.0	5.48	22.1
60 °C 2 h	7.40	52.1	6.46	7.8	5.45	40.1
60 °C 3 h	7.40	37.1	6.42	7.7	5.43	55.2
Light 12 h	7.43	87.6	6.53	12.4	—	—
FTC 1	7.42	98.1	6.54	1.9	—	—
FTC 2	7.43	97.9	6.52	2.1	—	—
pH 5.2	7.43	97.2	6.53	2.0	5.48	0.8
pH 7.2	7.43	98.2	6.53	1.8	—	—
NaCl 1.5 M	7.44	97.5	6.56	1.4	5.48	1.1
GndHCl 8 M	7.45	35.6	6.76	19.0	5.46	7.2

**Table 4.** Overall results for experimental retention time and abundance in the SEC analysis.

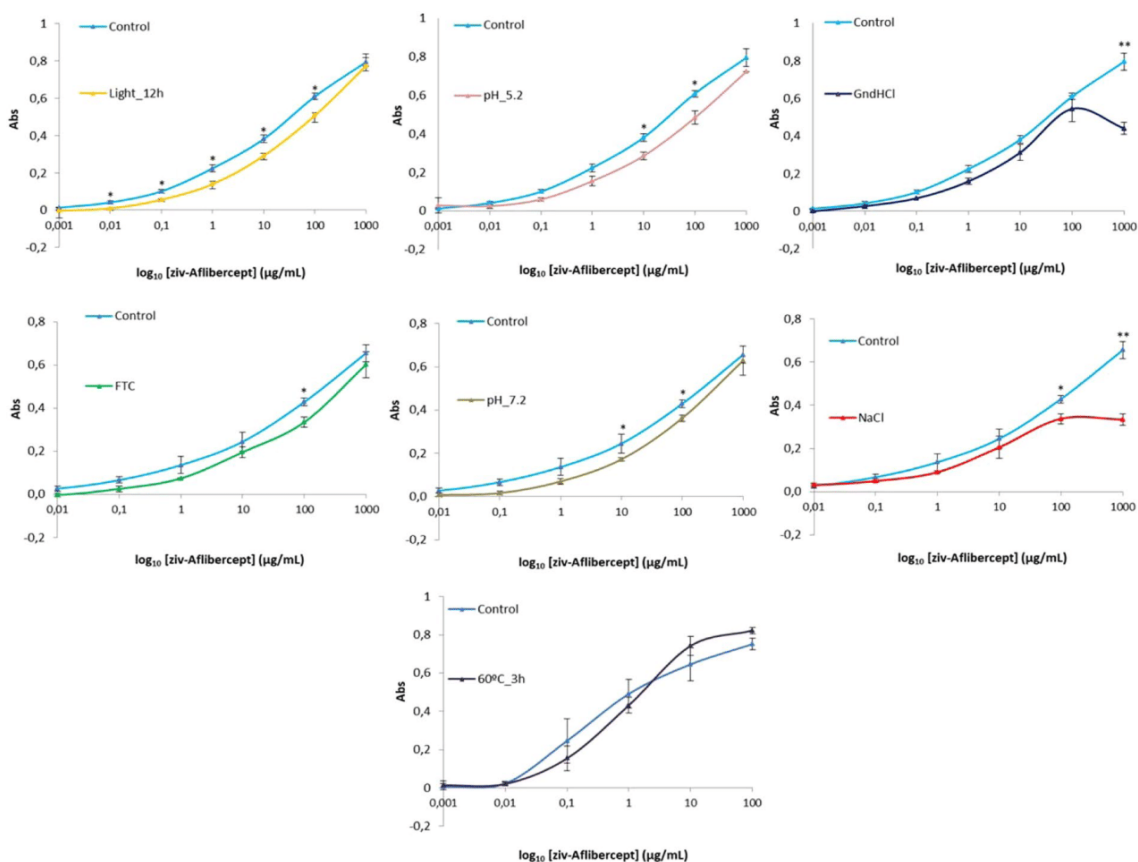
**ELISA.** ELISA-based binding assays are essential for studying therapeutic proteins. They offer a direct way of evaluating biological activity (antibody-antigen binding specificity) and thus help us understand the impact of the physicochemical changes in these proteins on the effectiveness of the biotechnological medicines. Figure 5 shows the results of the ziv-AFL VEGF ELISA. The absorbance is represented as a function of the concentrations of ziv-AFL after dilutions of the control sample and the particular stressed sample, so enabling the results to be visually compared using the graphs (Fig. 5). A Student's *t* analysis was carried out for the means comparison in order to determine whether the results of the stressed sample are significant or whether there are any changes compared to the control samples (Fig. 5) (those with asterisks are significant). Unexpectedly, ziv-AFL retains important functionality as a medicine after undergoing most of the stress tests. A clear decrease in functionality as manifested in a loss in VEGF binding capacity was only observed in the samples subjected to light-exposure stress. In the GndHCl and NaCl medium test, a clear deviation of the function was only observed in the most concentrated test sample. This was also the least diluted sample (factor of 25), which could explain the negative effect that the stress medium itself had on the ELISA process. The results were not clear when samples were stressed with a pH of one unit more or less than the pH of the ziv-AFL medicine solution (6.2); results for the test samples diluted at 10 and 100 µg/ml were significantly different from the control with an estimated remaining biological activity of around 25% (pH 5.2) and 36% (pH 7.2), while the other concentrations (dilutions) tested in the ELISA test did not produce significant results, i.e. indicating no loss of biological activity compared to the control samples. In this case, the high dilution performed on the stressed samples, i.e. dilution factors of 250 and 2500 for 100 and 10 µg/ml respectively, cannot explain the results of the ELISA test. It is therefore possible that changes in the pH cause a loss of functionality by decreasing the ziv-AFL binding capacity.

## Discussion

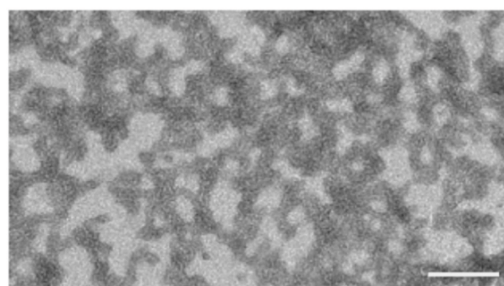
Ziv-AFL is an anti-VEGF antibody-based drug synthesized by the Chinese Hamster Ovary (CHO) cell. It is a glycosylated fusion protein which has a protein structure with a molecular weight of 97 kDa. According to the manufacturer, the glycosylation part increases the weight of the molecule (115 kDa) by 15%<sup>3</sup>.

Ziv-AFL (Zaltrap, 25 mg/mL) medicine is composed of monomers and natural dimers which make up 2% of the total molecules. This was demonstrated by the SEC profiles (Fig. 2). The spectral peak purity for each entity was found to be over 99%, with a high level of uniformity of a single compound in the chromatographic peaks, with no impurities. The CD spectrum is characterized by a minimum at 217.5 nm, a wavelength for ellipticity = 0 of around 207 nm, and a shoulder at around 229 nm. The CD spectral features indicate that the protein mainly consists of a  $\beta$ -sheet structure (Supplementary Data, Table 1), in accordance with the IgG1 structure. The tertiary structure is characterized by intrinsic tryptophan fluorescence spectroscopy with a centre of spectral mass (C.M) of 346.4 nm (Table 3). Undiluted medicine (25 mg/mL) shows an  $R_h$  of 10.1 nm and a polydispersity of 9.9%, while diluted ziv-AFL medicine (0.6 mg/mL) presents an  $R_h$  of 5.4 nm and a polydispersity of 16% (Table 2).

Exposure to high temperatures induced aggregation in the ziv-AFL medicine samples. This fact was corroborated by the results obtained using the different techniques. SE-HPLC demonstrated that aggregation increases proportionally in line with the time of exposure to heat (Table 4). The most interesting finding was the peak detected at 5.45 min retention time (Fig. 3A) These HMW aggregates (around 1666 kDa) is related to  $\beta$ -amyloid structures, in that a progressive increase of the negative band in the CD spectroscopy was observed at 215 nm. This phenomena has been widely studied and correlated with this specific form of aggregation<sup>18</sup>, where protein secondary structure elements reorganize to finally give rise to extensive  $\beta$ -structure, common in amyloid fibrils<sup>19</sup>. Moreover, the amyloid nature of the aggregates was confirmed by a very significant increase in the thioflavine (ThT) fluorescence signal and a red-shift of the Congo red absorbance induced by the aggregates (Supplementary Data, Fig. 1). These two assays are standard for amyloid fibril characterization<sup>20,21</sup> *in vitro*. The formation of these non-native aggregates in many proteins has also been linked to exposure to high temperatures<sup>22</sup>. Finally, the fibrillary nature of this HMW aggregate was observed by Transmission Electron Microscopy (TEM)<sup>20</sup> (Fig. 6); TEM image clearly shows the presence of curly amyloid protofibrils, thus confirming both the ThT and Congo Red analyses results. The secondary structure of the protein was also modified. The negative band mentioned



**Figure 5.** ELISA binding assay (1 ng/mL–1000 µg/mL) for all the stressed samples represented with respect to a fresh (control) sample of ziv-AFL (Zaltrap 25 mg/mL).



**Figure 6.** TEM image of a freshly prepared 1.0 mg·mL<sup>-1</sup> ziv-AFL sample subjected to 70 °C for 1 h. The white segment corresponds to 200 nm.

above decreased progressively over time during exposure to heat and the wavelength with ellipticity = 0 shifted to the far UV. However, all these changes did not result in alterations in the percentage of secondary structures (Supplementary Data, Table 1) perhaps due to the lack of sensitivity of the mathematical algorithm for detecting CD spectra modifications. The tertiary structure was also altered, as manifested in the red shift observed in IT-FS. Contrary to what might be expected, all these physicochemical changes do not appear to affect the ziv-AFL-VEGF binding, as indicated by the ELISA results (Fig. 5) and therefore, the biological activity of the medicine in solution is maintained despite the presence of these HMW aggregates.

The 12 h light stress also caused ziv-AFL aggregation. It is well known that exposure to light induces aggregation in monoclonal antibodies<sup>23,24</sup>, and the same occurs in the ziv-AFL medicine samples, in which the dimer population clearly increased progressively over time during light exposure (from 1.9% to 12.2% (quantified by



SE-HPLC). However, this increase in the dimer population was not detected by DLS. This may be due to the low sensitivity of this technique compared to analytical SEC. Light is also recognized as an oxidizing agent<sup>23</sup>. It is known that light oxidizes tryptophan residues on biopharmaceuticals with the subsequent loss of biological activity<sup>25</sup>. Aggregation of IgG accompanied by loss of biological activity has also been previously reported<sup>25</sup>. In our research, this stress did not affect the secondary structure content, although changes in the tertiary structure were detected. A significant red shift suggests a modification in the tryptophan environment. This indicated that the conformation of the protein changed as tryptophan residues become more exposed to the solvent. As regards functional properties, light degradation causes a decrease in the capacity to bind to VEGF. Therefore, exposure to light induces irreversible modifications in the protein conformation, which compromise its affinity for VEGF. In this case, the observed increase in the dimer population could be involved in this decrease in biological activity. It is also interesting to note that dimers were the highest orders of aggregation produced by light exposure.

No changes were noted in ziv-AFL after the freeze/thaw cycles. The monomer population remained constant throughout this stress test and the secondary and the tertiary structures also remained stable. For its part, the biological functionality of ziv-AFL measured in terms of its binding capacity to VEGF was not affected, although a slight, insignificant decrease was observed in the ELISA results (Fig. 5). Protein aggregation is the primary form of degradation in therapeutic proteins when subjected to this form of stress<sup>26</sup>. Freeze/thaw stress disturbs local structure on the surface of the residues leading to aggregation processes preceded by partial denaturation during freezing<sup>27</sup>. The two freeze/thaw cycles performed in this study were not sufficient to induce aggregation in ziv-AFL.

With regard to the NaCl stress, non-natural aggregation was observed by SE-HPLC at 5.48 min and was quantified as 1.1% of the total signal chromatogram. This small population was not however detected by DLS in which  $R_h$  and  $P_d$  remained unchanged, again due to the low sensitivity of this technique. In addition, the ellipticity of the negative band at 215 nm increased slightly, which means that these aggregates are the amyloid-like previously proposed. It has been reported that high ionic strength accelerates the protein aggregation process<sup>28</sup>. In this case the process begins in less than 24 hours. The secondary structures of the protein remained unaltered, although a conformational change was detected by IT-FS. A blue shift in the fluorescence emission spectra took place indicating that the tryptophan environment became more hydrophobic. Inorganic salts such as NaCl are known to favour compact protein conformations<sup>29</sup> and can also affect their biological activity. In the ELISA tests, there was no binding at the highest protein test concentration assayed (1000 µg/mL). This concentration corresponds to an ionic strength of 1.44 M that could affect the ELISA method. With the serial dilutions and thus the elimination of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  ions from the medium, the affinity to VEGF was significantly recovered. This could indicate that hypertonic NaCl solution induces reversible conformational changes or that this high concentration of 1.44 M could be affecting the VEGF in the ELISA plates, not allowing ziv-AFL and VEGF to bind. Once again, the appearance –although at small percentage– of higher states of aggregation (around 1666 KDa) of the protein in the samples does not seem to be associated with a decrease in the capacity of ziv-AFL to bind to VEGF.

GndHCl is a strong denaturing chaotropic, widely used in conformational studies of macromolecules. As expected, this stress induced the most dramatic changes in the structural integrity of the protein. In fact, it was initially selected as a positive control for ziv-AFL degradation. As regards aggregation, an important increase was observed using SE-HPLC in the percentage of the dimer population (from 1.9% to 19%) together with the peak at 5.46 min (7.2%). This was corroborated by DLS in which  $R_h$  increased significantly from 5.4 nm (control sample) to 8.3 nm. The ellipticity of the negative band at 215 nm also increased, which suggests that these HMW aggregates are  $\beta$  amyloid. As regards the conformation of the protein: secondary structures of the protein were significantly altered, with notable changes in the three parameters studied. An estimation of the percentage of secondary structures revealed a slight switch from characteristic  $\beta$  sheets structures to  $\alpha$  helix. The tertiary structure of the protein was also modified. The C.M increased significantly indicating widespread modification of the tertiary structure. All these results were compared with those obtained by ELISA. Similarly, as occurred when the ziv-AFL medicine samples were subjected to NaCl stress, at the highest test concentrations analysed (1000 µg/mL ziv-AFL) in which the concentration of GndHCl in the medium was also the highest tested (1.28 M), a significant decrease in the capacity of ziv-AFL to bind to VEGF was observed. However, with dilutions and the consequent elimination of the stress agent from the medium, ziv-AFL bound to VEGF with a high affinity at all the test concentrations analysed. Unexpectedly, although all the other techniques reflect severe modifications in the structural integrity of ziv-AFL, functionality –measured in terms of its capacity to bind to VEGF– was maintained.

Therefore, these results suggest that the soluble  $\beta$ -amyloid aggregates, which are detected in all the stressed ziv-AFL medicine samples, except those exposed to light and those subjected to freeze/thaw cycles, could slightly increase the signal of the immunoassay by increasing the IgG-conjugate binding ratio. Despite to be initially unexpected, these results could be attributed to the AFL high binding capacity to its antigen, that even unfolding and/or degraded, AFL kept the binding capacity to VEGFR. It was demonstrated that the AFLs equilibrium disassociation constant (Kd, inversely related to binding affinity) for VEGF-A165 was 0.49 pM, compared with 9.33 pM and 88.8 pM for native VEGFR1 and VEGFR2, respectively, then AFL binds with a greater affinity than the body's native receptors<sup>30</sup>. Then, it could occur that once this aggregate is attached to the VEGFR, more than one IgG-conjugated can bind to it, increasing the IgG-conjugate binding ratio for each ziv-AFL-VEGFR immunocomplex formed.

The ziv-AFL (Zaltrap, 25 mg/mL) solution has a pH of 6.2. Results suggest that increasing or reducing the pH by one unit caused slight but significant changes. pH 5.2 induced the formation of HMW aggregates (5.46 min) amounting to 0.8% of the total. The protein secondary structure content was maintained, although it was again observed that the negative band at 215 nm increased slightly, a change that could be due to the newly-formed HMW aggregates. There was a significant increase in the C.M value, suggesting a partial loss of ordered conformation. The isoelectric point of AFL is 8.2<sup>31</sup>, so pH 5.2 makes the molecules of ziv-AFL highly protonated, giving them a positive net charge. The increase in the positive charge within a monomer can increase the repulsion between amino acids with the same positive charge<sup>28</sup>, leading to conformational changes or partial denaturation, forcing hydrophobic pockets (hot spots) to be exposed and aggregation to begin. The ELISA assay reveals a

general decrease in ziv-AFL affinity to VEGF. For its part, pH 7.2 did not cause aggregation detectable by either of the techniques used (SE-HPLC and DLS). This result is surprising given that increasing the medium pH to 7.2 brings it closer to the isoelectric point of the protein, so decreasing its solubility. The secondary structure of the protein remained the same, a result obtained by comparing the CD spectrum for this sample with that for the control. The C.M was also modified as denoted by a slight conformational change in the protein, which in turn could explain the observed decrease in the capacity of ziv-AFL to bind to VEGF at this pH value.

### Conclusions

There are many stresses to which therapeutic proteins might be exposed during handling, both during the manufacturing process and later in hospital. The results presented here indicate that Zaltrap should be stored away from the light. Exposure to light causes significant inactivation of this drug, which could render the treatment ineffective. Light also causes dimerization, that in agreement with many published work<sup>23</sup> it is promoted by chemical degradation (mainly oxidations) that could compromise the safety and efficacy of the medicine. Storage at 4 °C is also necessary. The higher the temperature the more prone the protein is to form aggregates, including not only dimers but also higher order aggregates characterised by  $\beta$ -amyloid-like structure. The biological activity of the protein - measured by means of the ziv-AFL binding capacity to VEGFR- in solution was maintained at 60 °C, despite the appearance of HMW soluble aggregates, although they are likely to impair the safety and the efficacy of the medicine. Caution must also be taken when diluting the medicine in NaCl since a highly hypertonic solution also causes HMW aggregates to appear –although in small proportion-. Increasing the ionic strength in the solution could therefore initiate aggregation during storage. It is also important to control and maintain the pH in the medium, as pH shifts can cause partial inactivation of the molecules, possibly due to conformational changes. We also found that a pH of about 5.2 initiates aggregation processes leading to HMW. Finally, ziv-AFL seems to be relatively resistant to F/T cycles (2 in this case). However, exposure to several repeated F/T cycles is not recommended as it could eventually promote aggregation and therefore inactivation of the medicine. As expected, this research clearly demonstrates the fragile nature of biotechnological drugs and in particular of the fusion protein ziv-AFL, with the detection of a soluble ziv-AFL HMW aggregate related to an amyloid-like structure.

### Materials and Methods

**Materials.** Zaltrap 25 mg/ml vials (Sanofi-aventis groupe) were supplied by the University Hospital San Cecilio (Granada, Spain) within the framework of the current project FIS17-00547, Instituto Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Spain.

**Forced degradation.** Forced degradation studies were performed on the medicine Zaltrap by subjecting the samples to the particular stress condition and then storing the stressed samples for 24 h (at 4 °C and protected from the light) before analysis. Six forced degradation conditions were tested: (i) exposure to a temperature of 60 °C for 1 h, 2 h and 3 h, and subjecting one sample to a temperature ramp from 20 °C to 90 °C (for CD analysis) (ii) exposure to light irradiation (250 W/m<sup>2</sup>) for 12 h in an aging chamber (Solarbox 3000e RH, Cofomegra, Milan, Italy)<sup>16</sup>, (iii) two freeze-thaw cycles, (iv) exposure to an acidic medium by adjusting pH to 5.2 by adding 0.1 M of HCl and to a basic medium by adjusting pH to 7.2 by adding NH<sub>3</sub> 1 M (Sigma-Aldrich, USA), (v) exposure to a hypertonic medium by diluting ziv-AFL in 1.5 M NaCl at a final concentration of 0.6 mg/ml, and (vi) exposure to denaturing conditions by diluting ziv-AFL in GndHCl 8 M (pH 8.5, Sigma-Aldrich, USA) at a final concentration of 0.6 mg/ml; this GndHCl medium was also used as a positive control for ziv-AFL degradation.

When possible, all the samples, control samples and those subjected to stress, were analysed without dilution, i.e. in ziv-AFL medicine format (25 mg/mL). This was to make sure that the aggregation equilibrium was not altered by dilution. In the CD study, the samples had to be diluted at a drug concentration of 0.25 mg/mL (so as to avoid detector saturation). The only exception was the GndHCl stressed sample, which was analysed at 5 mg/mL.

**Far UV circular dichroism (CD) spectroscopy.** The experimental conditions were similar to those used in ref. <sup>32</sup>. Spectra were recorded using a JASCO J-815 spectropolarimeter (JASCO, Tokyo, Japan) equipped with a Peltier system for temperature control. Temperature was set at 20 °C for all measurements. Solution samples were studied at the target concentration of 0.25 mg/ml. Spectra were acquired every 0.2 nm with a scan speed of 20 nm/min from 260 to 190 nm and a total of 5 accumulations were averaged, with a bandwidth of 1 nm. A 1 mm path length quartz cuvette was used throughout. The blank was first measured and subtracted from the samples. Means-Movement Smoothing was applied to all the spectra with Spectra Analysis software. Spectra were exported as ASCII files, and then secondary structures were estimated using CDSSTR<sup>33</sup> and CONTINL<sup>34</sup> algorithms and SP175 protein DataSet<sup>35</sup> available at the Dichroweb website<sup>36</sup>.

**Intrinsic tryptophan fluorescence spectroscopy.** The experimental conditions were similar to those used in ref. <sup>32</sup>. Measurements were carried out on a Cary Eclipse spectrofluorometer (Agilent, Santa Clara, CA, USA) equipped with a Peltier system for temperature control. Excitation wavelength was set at 298 nm and emission was recorded from 310 to 400 nm. Solution samples were not diluted before measuring and temperature was set at 20 °C. Spectra were recorded at a scan speed of 600 nm/min and a total of 5 spectral accumulations were acquired. Excitation and emission slits were initially set at 5 nm. Excitation slits were modified depending on the samples in order to avoid saturation or low fluorescence signal. Data centre of spectral mass (C.M) was calculated for each spectrum using Eq. 1:

$$C.M = \frac{\sum_{i=1}^n (f_i \lambda_i)}{\sum_{i=1}^n f_i} \quad (1)$$

where  $f_i$  is the fluorescent intensity and  $\lambda_i$  is the wavelength.



**Dynamic light scattering (DLS).** The experimental conditions were similar to those used in ref. <sup>32</sup>. DLS measurements were carried out in a Protein Solutions DynaPro-99 System Dynamic Light Scattering Module equipped with a Temperature Control Micro Sampler (Wyatt, Santa Bárbara, California, USA). A 1.5 mm path length quartz cuvette, which was cleaned thoroughly before measuring, was used throughout. A minimum of 100 reads were recorded per measurement. Temperature was set at 20 °C and the acquisition time was 5 s. Laser power was lowered depending on the concentration of the samples. Solvent parameters were also modified according to each sample.

**Size exclusion chromatography (SE/HPLC-DAD).** The analysis was performed by liquid chromatography using an Agilent 1100 chromatograph equipped with a quaternary pump, degasser, autosampler, column oven and photodiode array detector (Agilent Technologies). Drug chromatographic evaluation was carried out in a SEC-5 column (300Bio, Agilent Technologies, USA) in which temperature was set at 25 °C. The flow rate was 0.35 mL/min and the mobile phase was composed of 150 mM of phosphate buffer pH 7.0, which was prepared with anhydrous disodium hydrogen phosphate (Panreac, Spain) and monohydrate monobasic sodium phosphate (Sigma-Aldrich, USA). An isocratic elution mode was applied for 17 min. 1 µL of sample was injected into the column. The UV-visible spectra were recorded between 190–400 nm with a data point every 0.5 nm. Chromatograms were registered at 214 nm with a reference band at 390 nm.

The column was calibrated in order to establish the relationship between the molecular weight and the retention time of the Fc-protein. The calibration kit (Agilent, USA) was composed of 5 proteins: thyroglobulin (670 kDa),  $\gamma$ -globulin (150 kDa), ovalbumin (45 kDa), myoglobin (17 kDa) and angiotensin II (1 kDa). The chromatogram and the experimental retention times for the calibration kit are shown in the Supplementary Data provided (Supplementary Data, Fig. 4) (molecular weight =  $-0.4493x^2 + 2.1667x + 8.7161$ ;  $R^2 = 0.9957$ ). The calibration model was used throughout this study.

**Functional-based method: enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).** This method was here optimized for ziv-AFL, starting from the outline of that optimized for infliximab<sup>32</sup>. An indirect and non-competitive ELISA based on the specific interaction of ziv-AFL with VEGF was carried out to test the biological activity of ziv-AFL after the various stress factors had been applied. 96-well Maxisorp immune plates were sensitized with VEGF by incubation overnight (18 h) at 4 °C adding 100 µL/well of 0.25 µg/mL VEGF diluted in 0.1 M carbonate buffer solution (pH 9.6). The plates were washed (VASHER RT-2600C microplate washer, Comecta, Abrera, Barcelona) four times with PBS-Tween 20 (pH 7.4 containing 0.3% (v/v) Tween 20). They were then treated with 100 µL of the blocking buffer (PBS pH 7.4 containing skimmed milk 2% (w/v)) per well for 2 h at 37 °C to eliminate nonspecific absorptions. The plate was again washed and filled with 100 µL of ziv-AFL appropriately diluted in 0.1 M carbonate buffer pH 9.6 at several concentrations ranging from 1 ng/mL to 1000 µg/mL. After incubating for 45 min at 37 °C, the plate was washed four times with PBS and incubated again with 100 µL/well of a solution of 10 µg/mL of peroxidase-labelled rabbit anti-human IgG prepared in 0.1 M carbonate buffer solution with a pH of 9.6 for 30 min at 37 °C. After washing four times with PBS, 100 µL of the substrate solution (OPD) was added to each well and incubated for 20 min in darkness at room temperature (25 °C). The reaction was stopped by adding 50 µL of 1 M sulfuric acid solution. Absorbance was recorded at 450 nm and 620 nm, and the analytical signal was the difference between the two absorbance values (TECAN SUNRISE™ microplate absorbance reader for 96-well plates connected to the computer running XFluor4 software, Tecan, Austria, GMB).

**Congo red binding assay.** The experimental conditions were similar to those used in ref. <sup>20</sup>. 70 °C sample was tested for amyloid-specific Congo red binding by the spectroscopic band shift assay. Aliquots of protein solution: control and stress (70 °C) (6 µL) were diluted in the reaction buffer (150 mM potassium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4), which contained 20.8 µM Congo red (150 µL final reaction volume). The Congo red solution was freshly prepared and filtered through a 0.2 µm filter before use. The absorption spectra were acquired after 2–3 min equilibration using a Cary 50 BIO UV-VIS spectrophotometer (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

**Thioflavin T binding assay.** The experimental conditions were similar to those used in ref. <sup>20</sup>. ThT binding assays were performed as described<sup>20</sup> using a Cary Eclipse spectrofluorometer (Agilent, Santa Clara, CA, USA). ThT was excited at 440 nm with a 5 nm slit width and the fluorescence emission was recorded at 485 nm with a 5 nm slit width. A 250 µM stock solution of ThT was freshly prepared in 25 mM potassium phosphate (pH 6.0). Protein aliquots (80 µL) were diluted into water (110 µL) and the phosphate buffer containing 250 µM ThT (10 µL) to a final volume of 200 µL. Measurements were carried out at room temperature using a 3 mm pathlength cuvette.

**Transmission electron microscopy.** The experimental conditions were similar to those used in ref. <sup>20</sup>. For transmission electron microscopy (TEM), protein samples were diluted ten times with water. The samples (15 mL) were then placed on a formvarcarbon-coated copper grid and allowed to stand for 4 min. The grid was then washed twice with distilled water and stained with 1% uranyl acetate for 1 min. The dried samples were evaluated in a Zeiss 902 electron microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) operating at an accelerating voltage of 120 kV and observed at a magnification of 50000.

#### Data availability

The datasets generated and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 13 November 2019; Accepted: 28 January 2020;  
Published online: 14 February 2020

## References

- Jafari, R., Zolbanin, N. M., Rafatpanah, H., Majidi, J. & Kazemi, T. Fc-fusion Proteins in Therapy: An Updated View. *Curr. Med. Chem.* **24**, 1228–1237 (2017).
- European Medicines Agency. *Zaltrap Assessment Report*. (2012).
- EMA. *Zaltrap: EPAR-Product information*. <https://doi.org/10.4324/9781315300559-8> (2013).
- Brown, D. M. *et al.* Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* **355**, 1432–1444 (2006).
- Schmidt-Erfurth, U. *et al.* Intravitreal aflibercept injection for neovascular age-related macular degeneration: Ninety-six-week results of the VIEW studies. *Ophthalmology* **121**, 193–201 (2014).
- Baker, C. W., Jiang, Y. & Stone, T. Recent advancements in diabetic retinopathy treatment from the diabetic retinopathy clinical research network. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **27**, 210–216 (2016).
- Singh, S. R., Dogra, A., Stewart, M., Das, T. & Chhablani, J. Intravitreal ziv-aflibercept: Clinical effects and economic impact. *Asia-Pacific J. Ophthalmol.* **6**, 561–568 (2017).
- Chhablani, J., Narayanan, R., Mathai, A., Yogi, R. & Stewart, M. Short-term safety profile of Intravitreal Ziv-Aflibercept. *Retina* **36**, 1126–1131 (2016).
- Mansour, A. M., I Al-Ghadban, S., Yunis, M. H. & El-Sabban, M. E. Ziv-aflibercept in macular disease. *Br. J. Ophthalmol.* **99**, 1055–1059 (2015).
- Sivertsen, M. S. *et al.* Pharmaceutical compounding of aflibercept in prefilled syringes does not affect structural integrity, stability or VEGF and Fc binding properties. *Sci. Rep.* **8**, 1–9 (2018).
- Nowak, C. *et al.* Forced degradation of recombinant monoclonal antibodies: A practical guide. *MAbs* **9**, 1230 (2017).
- Jaccoulet, E., Daniel, T., Prognon, P. & Caudron, E. Forced Degradation of Monoclonal Antibodies After Compounding: Impact on Routine Hospital Quality Control. *J. Pharm. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.06.004> (2019).
- Moreno, M. R. *et al.* Study of stability and biophysical characterization of ranibizumab and aflibercept. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **108**, 156–167 (2016).
- Tamizi, E. & Jouyban, A. Forced degradation studies of biopharmaceuticals: Selection of stress conditions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **98**, 26–46 (2016).
- Ausar, S., Hasija, I. & Rahman, N. Forced degradation studies: an essential tool for the formulation development of vaccines. *Vaccine Dev. Ther.* **11** (2013).
- ICH. Stability Testing: Photostability testing of new drug substances and products Q1B. *Int. Conf. Harmon.* <https://doi.org/10.1136/bmj.333.7574.873-a> (2003).
- Vermeer, A. W. P., Bremer, M. G. E. G. & Norde, W. Structural changes of IgG induced by heat treatment and by adsorption onto a hydrophobic Teflon surface studied by circular dichroism spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(98\)00048-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(98)00048-8) (1998).
- Vetri, V., Leone, M., Morozova-Roche, L. A., Vestergaard, B. & Foderà, V. Unlocked Concanavalin A Forms Amyloid-like Fibrils from Coagulation of Long-lived 'Crinkled' Intermediates. *PLoS One* **8** (2013).
- Polverino De Lauro, P. *et al.* Protein aggregation and amyloid fibril formation by an SH3 domain probed by limited proteolysis. *J. Mol. Biol.* **334**, 129–141 (2003).
- Morel, B., Casares, S. & Conejero-Lara, F. A single mutation induces amyloid aggregation in the  $\alpha$ -spectrin SH3 domain: Analysis of the early stages of fibril formation. *J. Mol. Biol.* **356**, 453–468 (2006).
- Nilsson, M. R. Techniques to study amyloid fibril formation *in vitro*. *Methods* **34**, 151–160 (2004).
- Al-Shabib, N. A. *et al.* Allura red rapidly induces amyloid-like fibril formation in hen egg white lysozyme at physiological pH. *Int. J. Biol. Macromol.* **127**, 297–305 (2019).
- Hernández-Jiménez, J. *et al.* The Effects of Light-Accelerated Degradation on the Aggregation of Marketed Therapeutic Monoclonal Antibodies Evaluated by Size-Exclusion Chromatography with Diode Array Detection. *J. Pharm. Sci.* **105**, 1405–1418 (2016).
- Hernández-Jiménez, J. *et al.* 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**, 511–524 (2018).
- Qi, P. *et al.* Characterization of the photodegradation of a human IgG1 monoclonal antibody formulated as a high-concentration liquid dosage form. *J. Pharm. Sci.* **98**, 3117–3130 (2009).
- Kueltzo, L. A., Wang, W., Randolph, T. W. & Carpenter, J. F. Effects of solution conditions, processing parameters, and container materials on aggregation of a monoclonal antibody during freeze-thawing. *J. Pharm. Sci.* **97**, 1801–1812 (2008).
- Zhang, A., Qi, W., Singh, S. K. & Fernandez, E. J. A new approach to explore the impact of freeze-thaw cycling on protein structure: Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry (HX-MS). *Pharm. Res.* **28**, 1179–1193 (2011).
- Roberts, C. J. Therapeutic protein aggregation: Mechanisms, design, and control. *Trends Biotechnol.* **32**, 372–380 (2014).
- Otzen, D. E. Protein unfolding in detergents: Effect of micelle structure, ionic strength, pH, and temperature. *Biophys. J.* **83**, 2219–2230 (2002).
- Papadopoulos, N. *et al.* Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis* **15**, 171–185 (2012).
- Hirvonen, L. M. *et al.* Hydrodynamic Radii of Ranibizumab, Aflibercept and Bevacizumab Measured by Time-Resolved Phosphorescence Anisotropy. *Pharm. Res.* **33**, 2025–2032 (2016).
- Hermosilla, J. *et al.* 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).
- Compton, L. A. & Johnson, W. C. Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Anal. Biochem.* **155**, 155–157 (1986).
- Provencher, S. W. & Glöckner, J. Estimation of Globular Protein Secondary Structure from Circular Dichroism. *Biochemistry* **20**, 33–37 (1981).
- Lees, J. G., Miles, A. J., Wien, F. & Wallace, B. A. A reference database for circular dichroism spectroscopy covering fold and secondary structure space. *Bioinformatics* **22** (2006).
- Whitmore, L. & Wallace, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers* **89**, 392–400 (2008).

## Acknowledgements

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).

www.nature.com/scientificreports/

### Author contributions

N.N. designed and supervised the work and wrote the paper with the contribution of J.H. and R.P.-R. which prepared figures; J.H. performed the spectroscopic experiments supervised by S.C. including samples stress and figures supervising; R.P.-R. performed the chromatographic experiments; A.S. and J.C. designed and prepared samples and A.S. supervised stress of the samples, J.H., R.P.-R., A.S., S.C., J.C., J.B. and N.N. discussed and approved final version of the manuscript.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.

### Additional information

**Supplementary information** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59465-7>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to N.N.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

## CAPÍTULO II

## **Material suplementario**

---

## CAPÍTULO II



**SUPPLEMENTARY DATA****Comprehensive biophysical and functional study of ziv-aflibercept: characterization and forced degradation**

Jesús Hermosilla<sup>a</sup>, Raquel Pérez-Robles<sup>a</sup>, Antonio Salmerón-García<sup>b</sup>, Salvador Casares<sup>c</sup>, Jose Cabeza<sup>b</sup>, Jonathan Bones<sup>d</sup>, Natalia Navas<sup>a</sup>✉

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry / Institute for Biomedical Research (ibs.GRANADA), University of Granada, E-18071 Granada, Spain

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

<sup>c</sup> Department of Physical Chemistry / Institute of Biotechnology, University of Granada, E-18071 Granada, Spain

<sup>d</sup> Characterisation and Comparability Laboratory, NIBRT. Fosters Avenue, Mount Merrion. Blackrock, Co. Dublin, Ireland

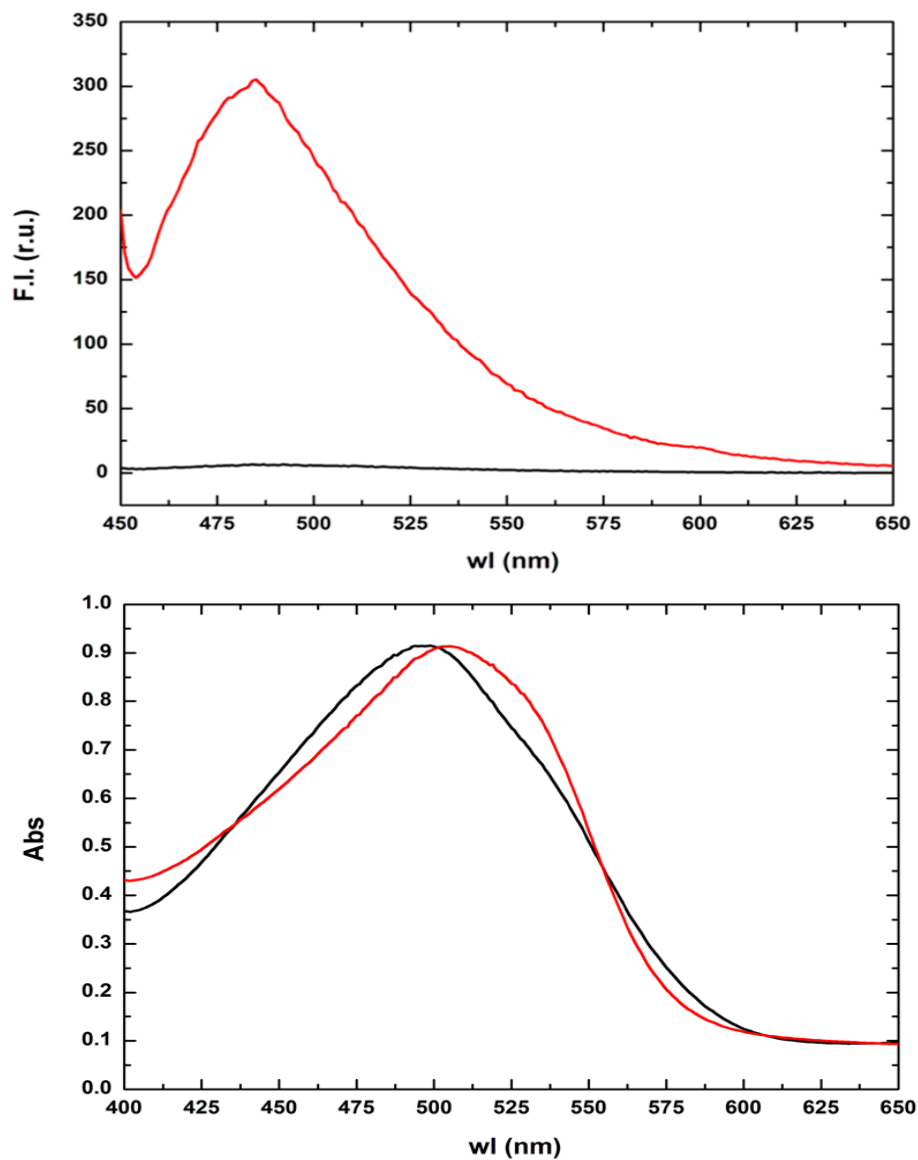
---

✉ Corresponding author: natalia@ugr.es

## CAPÍTULO II

### Supplementary Data

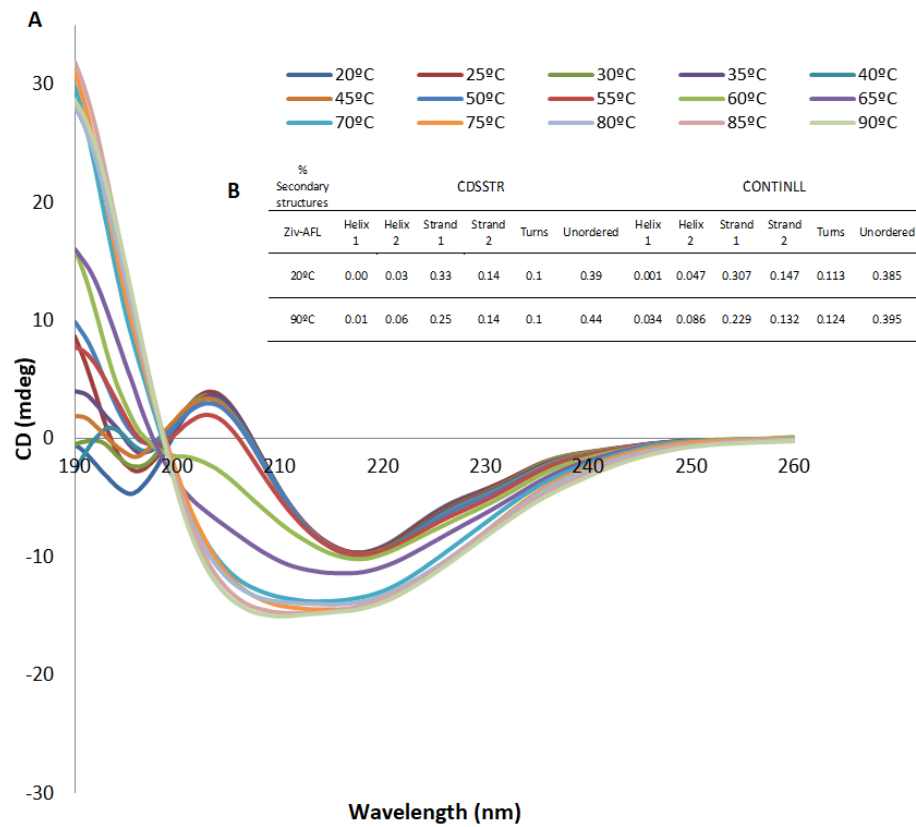
#### ThT and Congo red binding assays



**Figure 1:** Standard characterization of the amyloid-like aggregates observed when a 25 mg/mL fresh ziv-AFL sample is heated up to 70°C for 1 hour. (A) Fluorescence emission spectra of 10  $\mu$ M ThT in the presence of 10 mg/mL native protein (black line) and in the presence of same concentration of amyloid aggregates (red line). (B) Absorbance spectrum of 20  $\mu$ M Congo red in the presence of 1 mg/mL native protein (black line) and in the presence of equivalent concentration of amyloid aggregates.

## Supplementary data

## Circular Dichroism



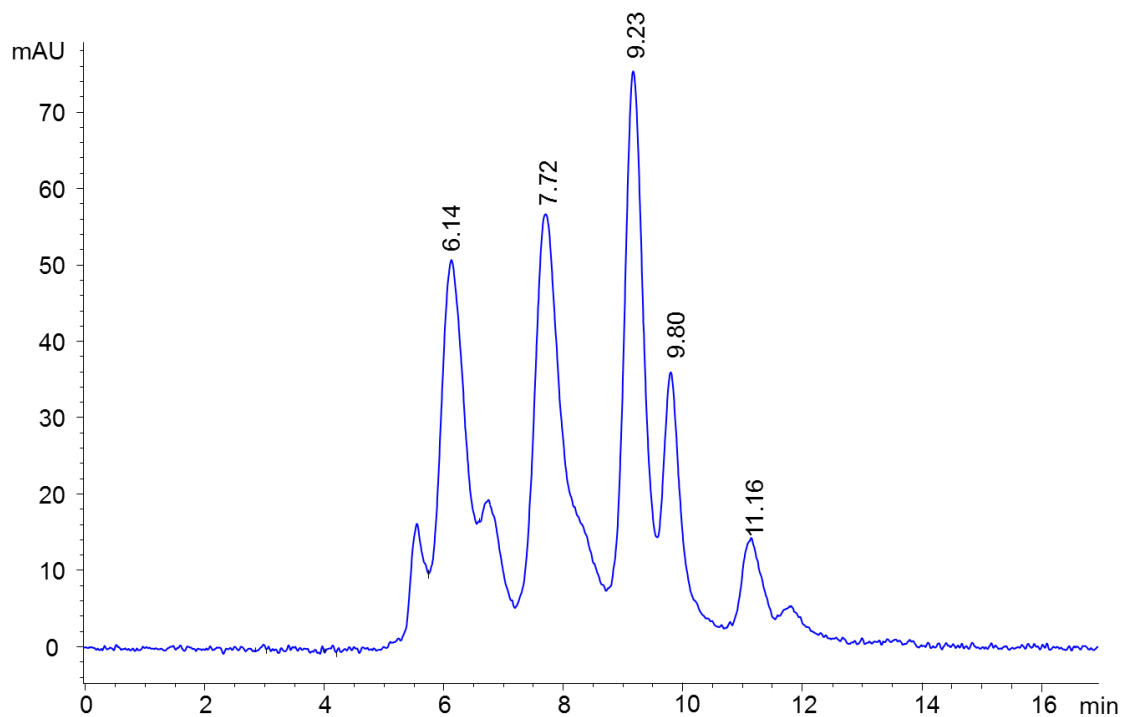
**Figure 2.** (A) Resulting CD spectra of the temperature stability study by submitting ziv-AFL to a temperature ramp (20-90°C). (B) Secondary structures obtained by Dicroweb<sup>1</sup> are also displayed.

(1) Whitmore, L. & Wallace, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers* 89, 392-400 (2008).

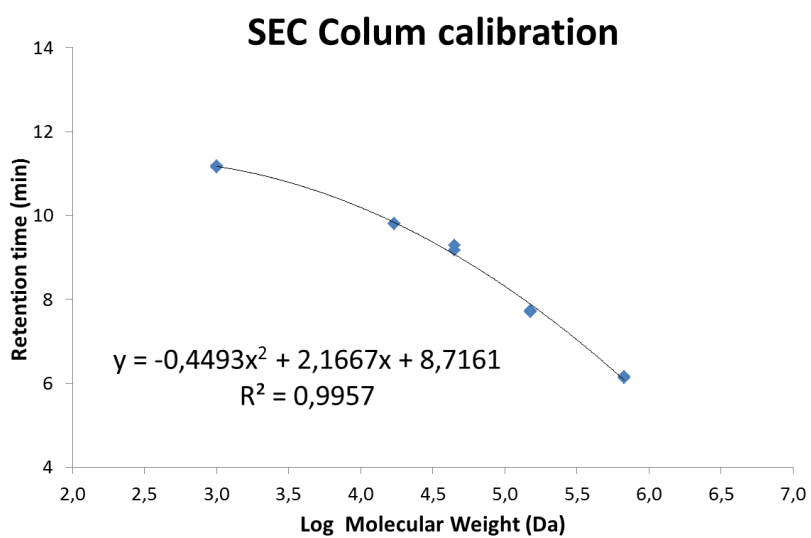
## CAPÍTULO II

Supplementary data

Size exclusion chromatography (SE/HPLC-DAD)



**Figure 3.** Calibration column SE chromatogram. Contains thyroglobulin (6.14±0.02 min),  $\gamma$ -globulin (7.72±0.01 min), ovalmunin (9.23±0.08 min), myoglobin (9.80±0.01 min), angiotensin II (11.16±0.02 min).



**Figure 4.** Experimental size exclusion column calibration model.

## Supplementary data

*Circular Dichroism***Table 1.** Percentage estimation of the different secondary structures by Dichroweb<sup>1</sup> from the CD spectra.

	CDSSTR						CONTINLL					
	Helix 1	Helix 2	Strand 1	Strand 2	Turns	Unordered	Helix 1	Helix 2	Strand 1	Strand 2	Turns	Unordered
Control	0	3	32	13	10	41	0	4.6	31.2	14.7	11.6	37.8
60°C 1h	0	3	31	13	11	41	0.1	4.6	30.9	14.7	11.4	38.2
60°C 2h	0	3	31	14	10	41	0.1	5.0	30.6	14.6	11.3	38.4
60°C 3h	0	3	32	13	10	41	0.1	4.8	30.9	14.8	11.3	38.1
Light12h	0	2	33	14	11	39	0	4.6	31.1	14.8	11.6	37.9
FTC 1	0	3	33	14	11	39	0.2	4.5	30.8	14.4	11.5	38.5
FTC 2	0	3	32	14	10	40	0.1	4.6	31.3	14.7	11.1	38.1
pH 5.2	0	3	33	14	11	39	0	4.5	31.1	14.6	11.5	38.4
pH 7.2	0	3	31	14	11	41	0.1	4.9	31.1	14.8	11.3	37.9
NaCl	0	3	34	14	10	39	0	4.7	31.7	14.9	9.9	38.8
GndHcl	0	5	29	14	12	40	1.3	6.1	28.3	14.1	11.6	38.7

(1) Whitmore, L. & Wallace, B. A. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers* 89, 392–400 (2008).

## CAPÍTULO II

## **CAPÍTULO III**

**Stability study over time of clinical solutions of ziv-aflibercept prepared in infusion bags using a proper combination of physicochemical and functional strategies**

---

## CAPÍTULO III



## Resumen

---

En el capítulo III, se ha llevado a cabo un estudio de estabilidad en condiciones de uso hospitalario de la proteína de fusión-Fc terapéutica ziv-aflibercept, principio activo del medicamento Zaltrap®. El objetivo del presente capítulo fue evaluar la estabilidad fisicoquímica y funcional de disoluciones clínicas de ziv-aflibercept, preparadas en condiciones asépticas validadas y almacenadas a 2-8°C en oscuridad durante 14 días. Dichas disoluciones fueron almacenadas en bolsas de poliolefina a dos concentraciones diferentes: intermedia 4,0 mg/mL y baja 0,6 mg/mL. La metodología aplicada se basó en la evaluación de distintos atributos fisicoquímicos y funcionales: el particulado de 0,001-10 µm fue analizado por DLS; los oligómeros mediante (SE)/HPLC-DAD); las variantes de carga se analizaron mediante (SCX)/UHPLC-UV); las estructuras secundarias se analizaron por DC en el UV lejano; la estructura terciaria mediante fluorescencia intrínseca de triptófanos y fluorescencia intrínseca de proteínas, y la funcionalidad se evaluó mediante ELISA. Los resultados obtenidos indicaron que no se produjo agregación, principal vía de degradación de esta proteína terapéutica. Las estructuras secundarias y terciarias se mantuvieron sin cambios a lo largo de los 14 días, mientras que la actividad biológica de ziv-AFL se mantuvo inalterada a lo largo del tiempo. Por lo tanto, se pudo concluir que las disoluciones clínicas de ziv-aflibercept estudiadas, mostraron una gran estabilidad fisicoquímica y funcional durante un periodo de dos semanas, independientemente de la concentración: 4.0 o 0,6 mg/mL.

## CAPÍTULO III

## **Publicación**

---

## CAPÍTULO III



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jpba](http://www.elsevier.com/locate/jpba)

## Stability study over time of clinical solutions of ziv-aflibercept prepared in infusion bags using a proper combination of physicochemical and functional strategies

Jesús Herмосilla<sup>a</sup>, Raquel Pérez-Robles<sup>a</sup>, Antonio Salmerón-García<sup>b</sup>, Salvador Casares<sup>c</sup>, Jose Cabeza<sup>b</sup>, Natalia Navas<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Sciences Faculty, Instituto de Investigación Biosanitaria (ibs.Granada), University of Granada, E-18071, Granada, Spain

<sup>b</sup> Department of Clinical Pharmacy, Instituto de Investigación Biosanitaria (ibs.Granada), San Cecilio University Hospital, 18016, Granada, Spain

<sup>c</sup> Department of Physical Chemistry, Sciences Faculty, University of Granada, E-18071, Granada, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 April 2021

Received in revised form 20 May 2021

Accepted 11 June 2021

Available online 16 June 2021

#### Keywords:

Ziv-Aflibercept  
Fc-fusion protein  
Infusion bags  
Stability study

### ABSTRACT

A range of biopharmaceutical products are used to target Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), including Eylea<sup>®</sup> (aflibercept, AFL) and Zaltrap<sup>®</sup> (ziv-aflibercept, ziv-AFL). The first is indicated for ophthalmological diseases such as neovascular (wet) age-related macular degeneration, while the second is used in the treatment of metastatic colorectal cancer. The stability of AFL in prefilled syringes has been widely studied; however, no research has yet been done on the stability of ziv-AFL in polyolefin infusion bags. Therefore, the purpose of the present research is to evaluate the stability of ziv-AFL (Zaltrap<sup>®</sup>) clinical solutions prepared under aseptic conditions in polyolefin infusion bags at two different concentrations, i.e. 4.0 and 0.6 mg/mL, and stored refrigerated in darkness at 2–8 °C for 14 days. With that aim, the ziv-AFL clinical solutions were assessed by analysing changes in its physicochemical and functional properties. The distribution of the particulates was studied over a range of 0.001–10 μm by Dynamic Light Scattering (DLS); oligomers were analysed by Size-Exclusion High-Performance Chromatography with Diode Array Detection (SE/HPLC-DAD); the secondary structure of the protein was studied by far UV Circular Dichroism (CD) and the tertiary structure by Intrinsic Tryptophan Fluorescence (IT-F) and Intrinsic Protein Fluorescence (IP-F); charge variants were assessed by Strong Cation Exchange Ultra-High-Performance Chromatography with UV detection (SCX/UHPLC-UV); functionality was evaluated by ELISA by measuring the biological activity as manifested in the extension of the immunological reaction of the ziv-AFL with its antigen (VEGF). Neither aggregation nor oligomerization were detected by the techniques mentioned above. Secondary and tertiary structures remained unchanged over the 14-day period, as did charge variants. The functionality observed initially was maintained along time. Therefore, it could be proposed that the ziv-AFL clinical solutions studied showed great physicochemical and functional stability over a period of two weeks, regardless of the concentration, i.e. 4 or 0.6 mg/mL.

© 2021 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

### 1. Introduction

Ziv-aflibercept (Ziv-AFL) is a Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-trap [1] that consists of the VEGF receptor extracellular binding domains 1 and 2 fused to the Fc portion of a human IgG1. Ziv-AFL acts as a soluble decoy receptor that binds to circulating VEGF A, VEGF B and Placental Growth Factor (PlGF). When it traps these ligands, it prevents the endogenous ligands from activating

their respective receptors and thus blocks signaling. It is a recombinant Fc-fusion protein produced in a Chinese Hamster Ovary (CHO) k-1 mammalian expression system by recombinant DNA technology. In combination with irinotecan/5-fluorouracil/folinic acid (FOLFIRI) chemotherapy, it is indicated in adults with metastatic colorectal cancer (MCR) that is resistant to or has progressed after an oxaliplatin-containing regimen [2]. There are other pharmaceutical products on the market that target VEGF in the treatment of different common chorioretinal vascular diseases, such as neovascular age-related macular degeneration (nAMD) [3], diabetic macular edema (DME) and retinal vein occlusion (RVO) [4]. These include aflibercept (AFL) (Eylea<sup>®</sup>; Regeneron, Tarrytown, NY and

\* Corresponding author at: Fuentenueva Avenue s/n, 18071, Granada, Spain.  
E-mail address: [natalia@ugr.es](mailto:natalia@ugr.es) (N. Navas).

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114209>

0731-7085/© 2021 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



Bayer Healthcare, Leverkusen, Germany), ranibizumab (Lucentis<sup>®</sup>; Genentech, South San Francisco, CA and Roche, Basel, Switzerland) and bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>; Genentech, South San Francisco, CA and Roche, Basel, Switzerland).

The prefix “ziv” is used to differentiate the AFL in Zaltrap<sup>®</sup> from the AFL in Eylea<sup>®</sup>; both medicines share the same active substance but have different formulations, and therefore different indications. Although AFL is manufactured by Regeneron Pharmaceuticals Inc, different pharmaceutical companies are responsible for batch release: Sanofi Aventis for Zaltrap<sup>®</sup> and Bayer AG for Eylea<sup>®</sup>.

The manufacturer of Zaltrap<sup>®</sup> indicates that this drug product is chemically and physically stable for 24 h at 2–8 °C and for 8 h at 25 °C once diluted in infusion bags and assuming that dilution has been performed under controlled and validated aseptic conditions [2]. Despite these indications, it recommends, due to microbiological issues, that the solutions prepared for infusion should be used immediately. Any decision to extend this recommended period must be taken by the user and it will be their sole responsibility [2]. Manufacturers usually establish short maximum stability periods for biotechnological and biological medicines due to their fragile nature and possible risks to patient safety [5]. Stability studies on biopharmaceuticals that reproduce hospital storage conditions are essential [6–8] as they guarantee the reuse of the daily surplus in hospital pharmacies including the pharmaceutical preparations not administered due to medical treatment interruption. As an example, A. Kannan et al. [9] studied the in-use interfacial stability of monoclonal antibody (mAb) formulations diluted in saline i.v. bags to evaluate the mAb aggregation propensity in saline medium 0.9 % NaCl in comparison with low ionic strength formulation buffer; results indicated higher tendency to aggregate in the saline medium. Since the approval of AFL and ziv-AFL [10,11], several stability studies have been carried out, the majority on AFL rather than on ziv-AFL. These studies assessed their stability in compounded syringes and most sought to evaluate the continuing functionality of the drug over time.

In 2015, A.M. Mansour et al. [12] proposed that ziv-AFL maintained its functionality for 4 weeks after being compounded in polycarbonate syringes and stored refrigerated. Similarly, in 2017, M. Schicht et al. [13] evaluated the functionality of AFL compounded in syringes over 120 h stored at 4 °C by means of cell proliferation assays and VEGF-ELISA, evaluating inhibition of cell proliferation and binding to VEGF respectively. In contrast to the specifications included in the summary of product characteristics for Eylea<sup>®</sup> [14], they demonstrated that AFL maintained its biological function over the five-day study period. For their part, S. Cao et al. [15] reported the functional stability of AFL when placed in plastic syringes and stored refrigerated for up to 4 weeks by determining half maximal inhibitory concentration (IC50) performing competitive binding assays against PIGF.

In 2018, J. De Lima Farah et al. [16] demonstrated the stability of AFL and ziv-AFL when compounded in tuberculin-type 1-mL plastic syringes and stored at 4 °C and -8 °C for 28 days. This was done by evaluating the mass recovered from the syringes and checking functional properties in ELISA experiments. M.S. Sivertsen et al. [17] published a stability study in which AFL was compounded in prefilled plastic syringes and stored refrigerated over 4 weeks. The results obtained from a set of suitable analytical techniques such as dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), size exclusion chromatography (SEC), antihuman Fc ELISA, FcRn binding ELISA, surface plasmon resonance (SPR) and differential scanning fluorimetry (DSF) confirmed the quality, stability and antigen/Fc binding properties of the protein over the 4-week period. These authors also developed a novel method for compounding and storage of three anti-VEGF drugs (including AFL) in prefilled silicon oil-free syringes [18]. Applying the same analytical

techniques as in the previous study [17], they demonstrated that AFL maintained its physical stability and functionality over a period of 7 days when stored at 4 °C in dark conditions.

Recently, D.P. Han et al. [19] compounded AFL in polycarbonate syringes and stored them at 4 °C and -20 °C for 14 days. They demonstrated the physical and functional stability of AFL at these conditions using ELISA and DLS techniques. M.R. Moreno et al. [20] undertook a more complete study, evaluating AFL stability over 30 days under physiological conditions and when formulated in a drug delivery system (DDS) based on microparticles. Stability was checked using SEC, circular dichroism (CD), fluorescence spectroscopy (FS), SDS-PAGE and ELISA. These authors proposed the physicochemical and functional stability of AFL at 37 °C and at different pH values ranging from 4.5–8.5 over 30 days. They also demonstrated the stability of AFL after simulating a water/oil (w/o) emulsification process, a first step towards protein entrapment, using different organic solvents such as triacetin.

Although all these studies assure that AFL and ziv-AFL are stable when stored in prefilled syringes under the right conditions, no research has yet been conducted into the stability of ziv-AFL diluted in NaCl (0.9 %) and stored in polyolefin bags. Up until now, interest has focused on assessing the stability of AFL in prefilled syringes due to the high cost of this treatment. However, ziv-AFL is also very expensive compared to traditional treatments and its stability in real hospital preparations should be evaluated so as to provide scientific evidence on which to base the complex decisions that must be taken regarding the reuse of this product.

In this research, a comprehensive set of previously validated physicochemical and functional methods [21,22] were applied to assess the stability over time (two weeks) of clinical solutions of ziv-AFL. The main critical attributes (CQA) of proteins such as particulates, oligomers, aggregates, secondary and tertiary structures, charge variants and binding to VEGF were investigated. These attributes need to be strictly monitored during process development and manufacturing in order to ensure product quality [23] and must also be controlled in real conditions of use in stability studies.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials and reagents

4 mL fresh vials containing 100 mg of ziv-AFL (Zaltrap<sup>®</sup>, Sanofi Aventis) were kindly supplied by the San Cecilio University Hospital (Granada, Spain).

Nunc maxisorp microplates were supplied by Labclinic S.A. (Barcelona, Spain). Anti-human IgG (whole molecule)-peroxidase antibody from rabbit, O-Phenylenediamine Dihydrochloride –as “the sigmafast opd”- (OPD), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) produced in *E.coli*, sodium phosphate monobasic monohydrate were supplied by Sigma Aldrich (Madrid, Spain). Sodium carbonate, sodium hydrogen carbonate, sodium chloride, potassium chloride, disodium phosphate monohydrate and potassium phosphate monobasic were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Tween 20 was supplied by Fluka Chemika (Madrid, Spain). Skimmed milk powder “La Asturiana” (Oviedo, Spain) was acquired in the local market. Size exclusion column standard calibration (Advance BioSEC 300 Å protein standard) was supplied by Agilent technologies (California, USA). Reverse-osmosis-quality water purified ( $\geq 18$  M/cm) with a Milli-RO plus Milli-Q station from Millipore Corp. (Madrid, Spain) was used throughout the study. Reverse-osmosis-quality water was purified with a Milli-Q station from Merck Millipore (Darmstadt, Germany).



## 2.2. Stability study

The stability of ziv-AFL was assessed using an *ad hoc* work procedure that was mainly based on the ICH Q6B international guideline [24]. To this end, we assessed a range of physicochemical and biological attributes in the ziv-AFL solutions. The physicochemical attributes were tested using a combined set of analytical techniques, and functionality was assessed using a biochemical approach. Table 1 in Supplementary Data indicates the methodology used in this research.

### 2.2.1. Ziv-AFL samples

Two different ziv-AFL concentrations were evaluated to cover the range commonly used in real clinical practice: 4 mg/mL (intermediate concentration) and 0.6 mg/mL (low concentration).

The medicinal product Zaltrap® contains 25 mg/mL of ziv-AFL in a concentrated solution for dilution for infusion [2]. Two doses of the medicine are currently available: a) vials containing 100 mg of the active substance in 4 mL of water for injection and b) vials containing 200 mg in 8 mL. In this study, the lower dose, i.e. vials containing 100 mg of ziv-AFL (batch number: 7F008C/ expiration date: 10-2020) was used to prepare the diluted solutions for infusion following the instructions set out in the technical report [2]. In this way, several vials of ziv-AFL 25 mg/mL were used to prepare 50 mL of 4.0 and 0.6 mg/mL ziv-AFL diluted solutions in NaCl 0.9% under validated aseptic conditions using a laminar flow cabinet (Aura Vertical S.D.4, Bio Air Instruments, Italy). This procedure was conducted according to the Hospital Pharmacy routine protocol: appropriate syringes were used to withdraw from the vials the volume of medicine needed to reach the desired concentrations (i.e. 4.0 mg/mL and 0.6 mg/mL) in the 50 mL NaCl 0.9% polyolefin infusion bags (Baxter, Spain, batch number: 19E05E3S/ expiration date: 07-2020), from which the whole contents had previously been extracted with 50 mL BD Plastipak syringes (batch number: 1707229/ expiration date: 06-2022). The necessary volumes of medicine and solution were then added to the bags to prepare the final concentrations. Due to the limits on obtaining samples of the medicine, we prepared two independent replicates for each storage container as accepted for this situation [8]. Therefore, two bags of each concentration were prepared.

### 2.2.2. Methodology applied

The stability-indicating nature of all the methods used in this study was validated by accelerated degradation studies performed in a recently published work about ziv-AFL [21,22], in which the following stresses were applied: 12 h light irradiation, exposure to high temperature (60 °C and 70 °C), subjection to several freeze/thaw cycles, pH variation of the drug product, dilution in a hypertonic 1.5 M NaCl solution and 6 M guanidine HCl denaturing solution.

### 2.2.3. Stability studies over time

4 and 0.6 mg/mL ziv-AFL clinical solutions, stored in polyolefin bags, were analysed for a period of 14 days in order to assess their stability over time when stored refrigerated (2–8 °C) in darkness. In all cases, Day 0, the day when the clinical solutions were prepared, was established as the control or reference day, and the results from all subsequent experiences were compared to this day.

The stability of the two clinical solutions, i.e. 4.0 and 0.6 mg/mL, was studied by using the analytical techniques included in Table 1 (Supplementary Data), over a period of 14 days. The solutions were analysed on: Day 0 (preparation of the clinical solutions), Day 1, Day 2, Day 7 or 8, Day 10 or 11 and Day 14. All the techniques were used at these intervals, except for the fluorescence spectroscopic

technique, for which the analyses had to be stopped on Day 10, due to technical problems.

## 2.3. Analytical methods

### 2.3.1. Visual inspections

Visual inspections were carried out prior to experimentation in order to detect the formation of large aggregates, turbidity, suspended particles, colour changes and gas formation. To this end, samples were visually inspected using the naked eye.

### 2.3.2. Far UV circular dichroism (CD)

Ziv-AFL secondary structures were studied using a JASCO J-815 spectropolarimeter (JASCO, Tokyo, Japan). The method was optimized at a concentration of 0.25 mg/mL of ziv-AFL. Each spectrum was registered with a scanning speed of 20 nm/min, every 0.2 nm and a total of 5 accumulations were averaged between 200 and 250 nm. A 1 mm quartz cuvette was used throughout the stability study. Temperature was controlled at a constant 20 °C. Raw spectra were smoothed using the Means-Movement method with a convolution width of 25. All the spectra were visually inspected in order to detect changes in the secondary structures of ziv-AFL. The content of the secondary structure was estimated using the Dichroweb website [25].

### 2.3.3. Intrinsic tryptophan fluorescence spectroscopy (IT-FS)

For Emission, spectra measurements were carried out on a Cary Eclipse spectrofluorometer (Agilent, U.S.A) and recorded from 300 to 400 nm with the excitation wavelength set to 298 nm. The temperature of the samples was kept at 20 °C using a thermostatically controlled cell holder. A total of 5 spectral accumulations were averaged per spectrum. The excitation and emission slits were set to 5 nm for the 4 mg/mL bag samples and to 10 nm for the 0.6 mg/mL bag samples. The blank of the appropriate solvent without the antibody was measured and then subtracted from each sample spectrum. Each spectrum was converted mathematically to a number (Spectral Centre of Mass) from 300 to 400 nm, with the following equation:

$$S.C.M. = \frac{\sum(\lambda_i f_i)}{\sum f_i}$$

Where  $\lambda_i$  is the wavelength and  $f_i$  the corresponding intensity

### 2.3.4. Intrinsic protein fluorescence spectroscopy (IP-FS)

Emission spectra measurements were carried out on a Cary Eclipse spectrofluorometer (Agilent, U.S.A) from 300 to 400 nm, with the excitation wavelength set to 280 nm. The temperature of the samples was kept at 20 °C using a thermostatically controlled cell holder. A total of 5 spectral accumulations were averaged per spectrum. Excitation and emission slits were set to 5 nm. The blank of the appropriate solvent without the antibody was measured and then subtracted from each sample spectrum. Each spectrum was converted into a number (Spectral Centre of Mass, C.M.) from 300 to 400 nm using Equation 1.

### 2.3.5. Dynamic light scattering

DLS records were obtained on a Zetasizer Nano-ZS90 Malvern (UK). Particle size distribution was determined on 1 mL of sample volume using 10 mm spectrophotometry disposable cuvettes. Each sample record was a result of 100 accumulated readings taken at a thermostatically controlled temperature of 20 °C and with a time acquisition of 5 s per reading. The average hydrodynamic diameter (HD), polydispersity index (PDI), Z-average and size distribution by volume and intensity were compared and discussed for all the bag samples over the 14-day study period.



### 2.3.6. Size-exclusion high-performance chromatography with diode array detection (SE/HLPC-DAD)

The analysis was performed by liquid chromatography using an Agilent 1100 chromatograph equipped with a quaternary pump, degasser, autosampler, column oven and photodiode array detector (Agilent Technologies, USA).

Samples were evaluated in a SEC-5 column (300Bio, Agilent Technologies, USA) in which temperature was set at 25 °C. The flow rate was 0.35 mL/min and the mobile phase was composed of 150 mM of phosphate buffer pH 7.0. An isocratic elution mode was applied for 17 min. The UV-vis spectra were recorded between 190 nm and 400 nm with a data point every 0.5 nm. Chromatograms were registered at 214 nm with a reference band at 390 nm. This method was previously reported [21].

The column was calibrated in order to establish the relationship between the molecular weight and the retention time of the Fc-protein. The calibration kit (Agilent, USA) was composed of 5 proteins: thyroglobulin (670 kDa),  $\gamma$ -globulin (150 kDa), ovalbumin (45 kDa), myoglobin (17 kDa) and angiotensin II (1 kDa).

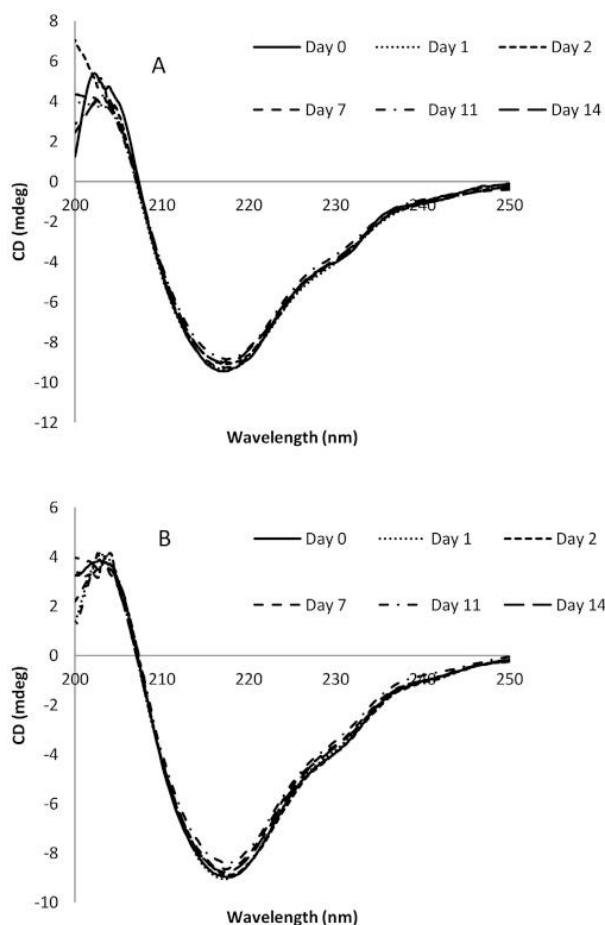
### 2.3.7. Strong cation exchange ultra-high-Performance chromatography (SCX/UHPLC-UV) charge variant analysis

This analysis was conducted using a proper analytical platform (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The chromatographic separation was carried out using a Dionex UltiMate 3000 chromatograph (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), equipped with two ternary pumps, a degasser, an autosampler, a thermostated column compartment, and a multiple-wavelength detector (MWD-3000Vis-UV detector). The method was previously reported [22] and developed to detect changes in the ziv-AFL charge variant profile.

Chromatographic separation was carried out in a MabPac SCX-10 RS 2.1 mm  $\times$  50 mm column with 5  $\mu$ m particles (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The column temperature was 30 °C and the flow rate was 0.4 mL/min. The eluent system was composed of 10 mM of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> at pH 5.0 (mobile phase A) and 10 mM of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 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 maintained at this level for 4 min. The initial conditions were restored in 1 min. The UV chromatograms were registered at 214 nm [22].

### 2.3.8. ELISA

An indirect, non-competitive ELISA based on the specific interaction of ziv-AFL with VEGF was applied to check for ziv-AFL biological activity, and was then used to study the diluted ziv-AFL clinical solutions stored in the bags over a period of 14 days. This method was adapted from our previous works [21,26]. In brief, 96-well Maxisorp immune plates were sensitized with VEGF by incubation overnight (18 h) at 4 °C adding 100  $\mu$ L/well of 0.25  $\mu$ g/mL VEGF diluted in 0.1 M carbonate buffer solution (pH 9.6). The plates were washed (VASHER RT-2600C microplate washer, Comecta, Abrera, Barcelona) four times with PBS-Tween® 20 (pH 7.4 containing 0.3 % (v/v) Tween® 20). They were then treated with 100  $\mu$ L of the blocking buffer (PBS pH 7.4 containing skimmed milk 2 % (w/v)) per well for 2 h at 37 °C to eliminate nonspecific absorptions. Each plate was washed again and filled with 100  $\mu$ L of ziv-AFL control samples and samples from the bags appropriately diluted in 0.1 M carbonate buffer pH 9.6 at several concentrations ranging from 1 ng/mL to 100  $\mu$ g/mL. After incubating for 45 min at 37 °C, the plates were washed four times with PBS and incubated again with 100  $\mu$ L/well of a solution of 10  $\mu$ g/mL of peroxidase-labelled rabbit anti-human IgG prepared in 0.1 M carbonate buffer solu-



**Fig. 1.** Representative Circular Dichroism (CD) spectra of ziv-AFL (Zaltrap®) solutions stored in polyolefin infusion bags over the 14-day stability study period: A) 4 mg/mL bag; B) 0.6 mg/mL bag.

tion pH 9.6 for 30 min at 37 °C. After washing four times with PBS, 100  $\mu$ L of the substrate solution (OPD) was added to each well and incubated for 20 min in darkness at room temperature (25 °C). The reaction was stopped by adding 50  $\mu$ L of 1 M sulfuric acid solution. The absorbance was recorded at 450 nm and 620 nm, and the analytical signal was the difference between the two absorbance values (TECAN SUNRISE™ microplate absorbance reader for 96-well plates connected to a computer loaded with XFluor4 software, Tecan, Austria, GMB). On each test day, the absorbance of the ziv-AFL bag samples was compared to that of freshly prepared ziv-AFL samples.

## 3. Results

### 3.1. Visual inspections

All the solutions remained clear without turbidity throughout the stability study, indicating that no visual aggregates had formed. The solutions also remained colourless throughout the study period.

### 3.2. Circular dichroism spectroscopy (CD)

The two bag replicate samples for each concentration studied showed practically identical spectral features. Therefore, Fig. 1 shows the ziv-AFL representative spectra (from one of the two



**Table 1**  
CD spectral features of ziv-AFL representative bags samples over the stability study period: 4 and 0.6 mg/mL

4 mg/mL	Spectral minima	Wavelength (CD = 0)	Minima Ellipticity	0.6 mg/mL	Spectral minima	Wavelength (CD = 0)	Minima Ellipticity
Day 0	217.4	207.4	-9.3	Day 0	217.8	207.2	-9.0
Day 1	217.4	207.0	-9.4	Day 1	217.4	207.1	-9.1
Day 2	217.2	207.1	-9.1	Day 2	217.6	207.3	-9.0
Day 7	217.4	207.0	-9.3	Day 7	217.2	207.1	-8.7
Day 11	217.4	207.2	-8.9	Day 11	217.6	207.3	-8.5
Day 14	217.0	207.2	-9.0	Day 14	217.0	207.0	-8.8

CD (Circular Dichroism).

**Table 2**  
Representative fluorescence spectral centre of mass (C.M) values of the ziv-AFL bags samples over the stability study.

C.M. (at $\lambda_{exc}$ 298 nm, IT-FS)							
C.M.	Day 0	Day 1	Day 2	Day 7	Day 10	Day 14	
4 mg/mL Bag	346	346	346	346	346	-	-
0.6 mg/mL Bag	345.8	345.7	345.8	345.8	345.8	-	-
C.M. (at $\lambda_{exc}$ 280 nm, IP-FS)							
C.M.	Day 0	Day 1	Day 2	Day 7	Day 10	Day 14	
4 mg/mL Bag	343.9	343.8	343.9	343.9	343.9	-	-
0.6 mg/mL Bag	343.9	343.9	343.9	344.0	343.9	-	-

C.M (Centre of Mass);  $\lambda_{exc}$  (excitation wavelength); IT-FS (Intrinsic Tryptophan Fluorescence Spectra); IP-FS (Intrinsic Protein Fluorescence Spectra).

replicates) for the bag samples from Day 0 to Day 14 for 4.0 and 0.6 mg/mL bag samples. These representative spectra are described in more detail in Table 1 via their spectral features. As can be seen in Fig. 1, the ziv-AFL CD spectra are identical for the 4.0 and 0.6 mg/mL bag samples. The spectral shape remains unchanged over the 14 days. A more detailed analysis of these spectral features of ziv-AFL is shown in Table 1, including the CD spectrum minimum and the wavelength at ellipticity 0. Ziv-AFL has a minimum at 217–218 nm and a wavelength (ellipticity = 0) at 207–207.5 nm. These values were corroborated to remain unchanged in all the bag replicate samples throughout the study, so indicating that no changes had taken place in the secondary structure of the ziv-AFL in any of the bag samples studied. An estimation of the secondary structure content can be found in the Supplementary Data (Tables 2 and 3). These results indicate that secondary structure of ziv-AFL remained unchanged over the 14-day test period for both concentrations assessed.

### 3.3. Intrinsic tryptophan fluorescence spectroscopy (IT-FS)

The tertiary structure of ziv-AFL in the solutions at 4.0 and 0.6 mg/mL was analysed by IT-FS. Representative results of the fluorescence C.M. from one of the bag replicates for each concentration studied are shown in Table 2 since the standard deviation between the two replicates were close to 0 value. These results in Table 2 indicate that this CQA remained unchanged throughout the test period (10 days). The representative C.M. value of the IT-F spectra for the 4 mg/mL ziv-AFL bag samples was 346 nm at Day 0; this value remained constant over the 10-day test period for two replicates. For the two bag samples of 0.6 mg/mL ziv-AFL, this value was 345.8 at Day 0 and also remained unchanged over the 10 days of study.

### 3.4. Intrinsic protein fluorescence (IP-FS)

The fact that the tertiary structure of the ziv-AFL in the clinical solutions remained unchanged was also corroborated similarly by IP-FS. The representative C.M. of the spectra from the 4 mg/mL and the 0.6 mg/mL ziv-AFL solution bag samples was 343.9 at Day 0; value that remained over the 10-day study period for all the samples (Table 2).

**Table 3**  
Z-average and polydispersity index (PDI) values for the representative ziv-AFL bags samples over the stability study.

Day	Z-average		PDI	
	4 mg/mL bag	0.6 mg/mL bag	4 mg/mL bag	0.6 mg/mL bag
0	14 ± 5	0.25	0.32	
1	11 ± 6	0.10	0.46	
2	12 ± 5	0.15	0.28	
7	12 ± 5	0.15	0.28	
10	12 ± 5	0.18	0.16	
14	12 ± 5	0.18	0.22	

PDI (Polydispersity Index).

### 3.5. Dynamic light scattering (DLS)

Representative results for particulates of up to 10  $\mu\text{m}$  in the solutions over time are shown in Fig. 2 (volume size distribution graphs) and in Table 3 (Z-average and PDI values). For Z-average and HD results, statistical comparison was performed on the results from the two bag replicates for each concentration at a confidence level of 95 %, corroborating there was not statistical differences between the two values compared. Therefore, the results show next are from one of these two bag replicates as representative.

In Fig. 2 there are two size distribution graphs (A and B) for the 4 and 0.6 mg/mL ziv-AFL bag samples; in both cases, a single particulate population was detected and was attributed to protein monomers with an average HD of  $11 \pm 3.4$  nm and  $11.3 \pm 3.1$  nm respectively. These values were maintained over the 14 days with no significant differences as can be corroborated in graphs A and B of Fig. 2.

As regards the size distribution by intensity shown in Supplementary Data (Fig. 2); for 4 mg/mL bag samples, the only peak that contributed to the intensity was the protein monomer population. The only exception was on Day 0, in which a peak was detected at 2.5  $\mu\text{m}$ , although this contributed just 0.1 % of total volume, and was therefore considered an artefact, and was not observed in the other bag replicate. For 0.6 mg/mL bag samples, intensity was caused mainly by the peak associated with the protein monomer population, with other peaks contributing just 0.1 %, and therefore being considered as artefacts, and similarly occurs in the other bag replicate.

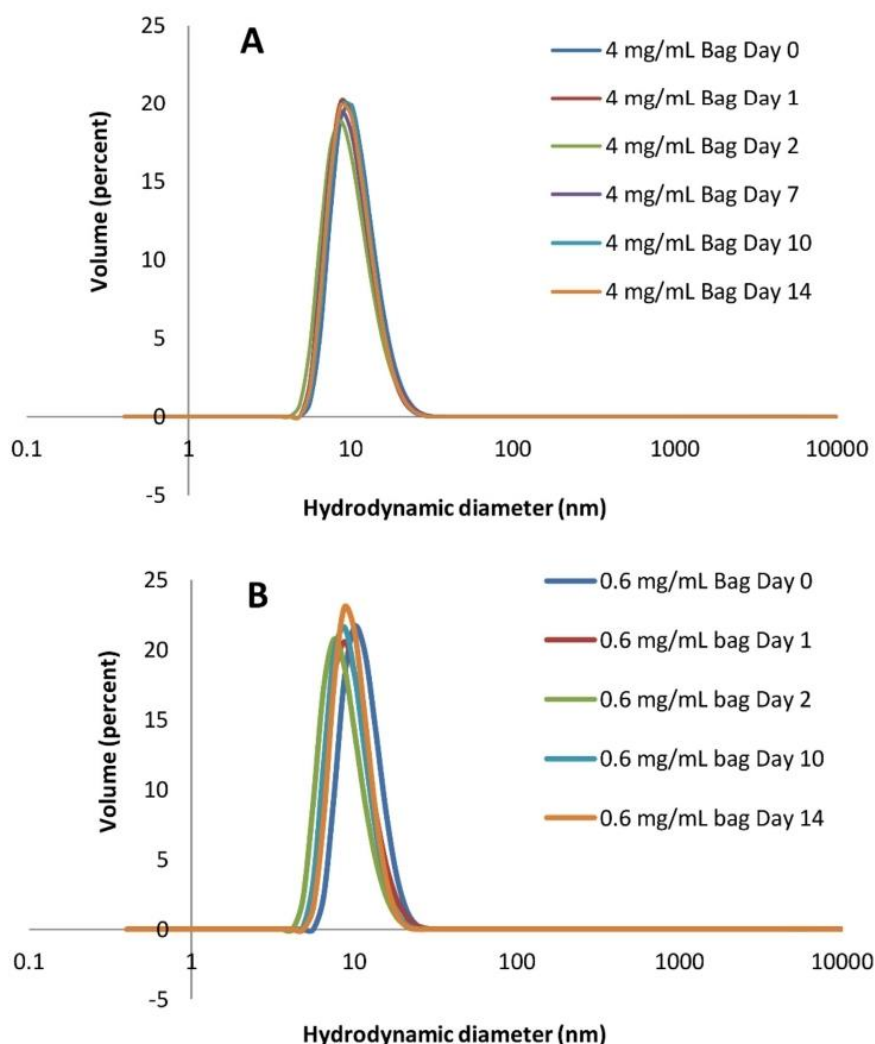


Fig. 2. Representative size distribution by volume of 4 mg/mL A) and 0.6 mg/mL B) ziv-AFL (Zaltrap®) solutions stored in polyolefin bags over 14 days.

The Z-average values for the ziv-AFL 4 mg/mL solutions (Table 3) indicated that no aggregation process was taking place as the values remained similar throughout the 14-day period in all the samples. Results for the most diluted solution at 0.6 mg/mL were discarded as the concentration was too low to enable us to interpret this parameter. As regards the PDI value (Table 3), this ranged between 0.1–0.2 for ziv-AFL 4 mg/mL bag samples and between 0.1–0.5 for 0.6 mg/mL bag samples. These results indicated that there was no significant dispersion in the size of the population, as it was always  $< 0.7$  [27] for all samples. For 0.6 mg/mL samples the higher PDI value obtained in some of the samples (up to 0.5) was also attributed to this higher dilution of the ziv-AFL sample, which could make the results not interpretable, not only for the Z-average but also for the PDI value.

### 3.6. Size-Exclusion chromatography (SE/HPLC-DAD)

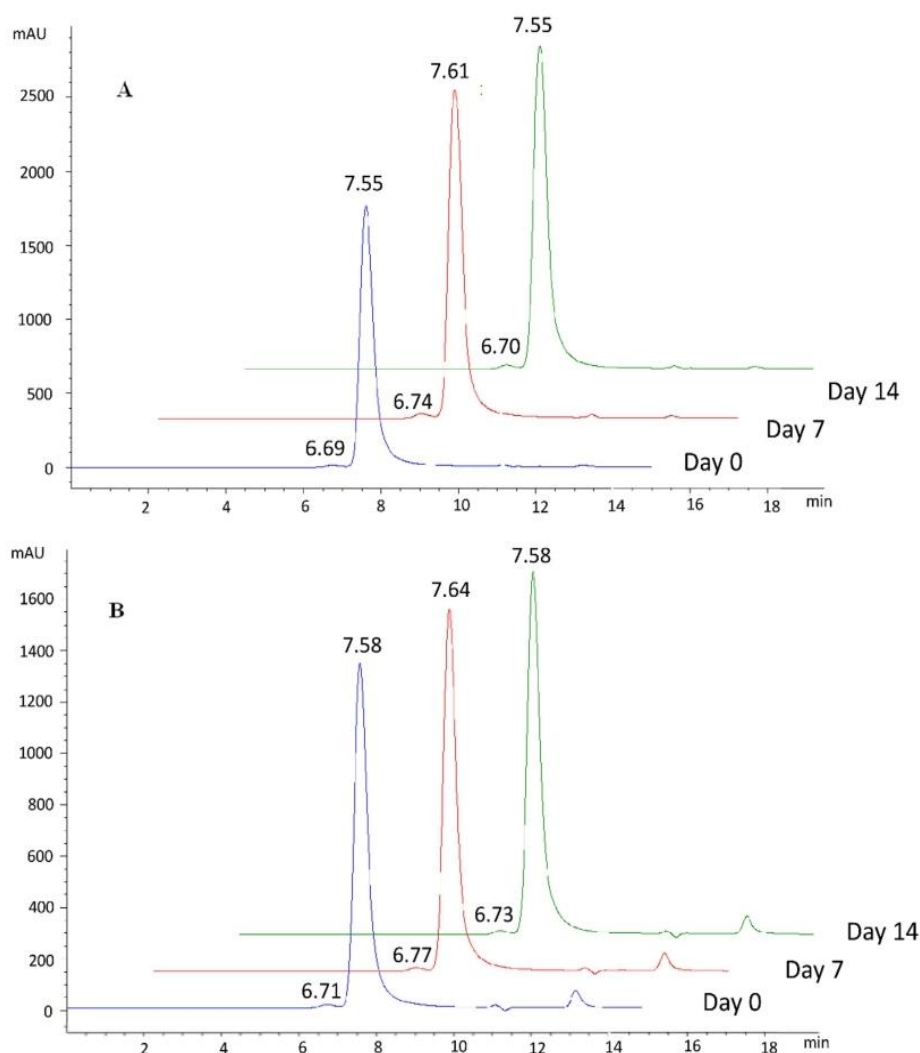
The chromatographic profile for the oligomers was checked using (SE)HPLC-DAD, so as to detect possible incipient aggregation in the ziv-AFL bags (4 and 0.6 mg/mL). Representative control chromatograms (those registered at Day 0) are shown in Fig. 3. Both concentrations tested (considering the two bags replicates, and in

this case two replicates of each bag) were characterised by two peaks: one small peak eluting at  $6.7 \pm 0.2$  min and another, the main peak, eluting at  $7.57 \pm 0.1$  min. The first peak was attributed to the presence of the natural dimer (representing 2% of the total area for ziv-AFL in the chromatogram) and the second peak was attributed to the monomer in accordance with previous works [21] in which this issue was investigated in depth.

Fig. 3 shows the UV-SEC chromatograms corresponding to representative replicates of ziv-AFL in the stability study, showing the results at Day 0 (control), 7 and 14. These chromatographic profiles remained unchanged over the study period, in terms of both the elution time and the area under the peak, as can be seen in Fig. 3 for the two concentrations of ziv-AFL studied. The value of the area of the peaks corresponding to the dimer and the monomer remained constant over the period of study, as did the proportion between them. No new aggregations or fragmentations were detected on any of the test days. The analysis of all chromatographic profiles clearly indicates high stability and a high degree of similarity in the solutions over the study period.

The concentration of the ziv-AFL bags solutions was estimated using the chromatographic area under the peak and this was continued throughout the study period. The concentration estimated





**Fig. 3.** Representative size exclusion high-performance chromatography with diode array detection (SE-HPLC-DAD) chromatograms of Ziv-AFL (Zaltrap®) solutions stored in polyolefin bags over the 14-day study period: A) 4 mg/mL bag. B) 0.6 mg/mL bag.

was always at around  $4 \pm 0.27$  mg/mL and  $0.6 \pm 0.20$  mg/mL. No significant changes were observed, indicating that the concentrations of ziv-AFL remained constant over the 14-day study period, with no adsorption on the wall of the container or degradation.

### 3.7. Strong cation exchange ultra-high-Performance chromatography ((SCX)UHPLC/UV)

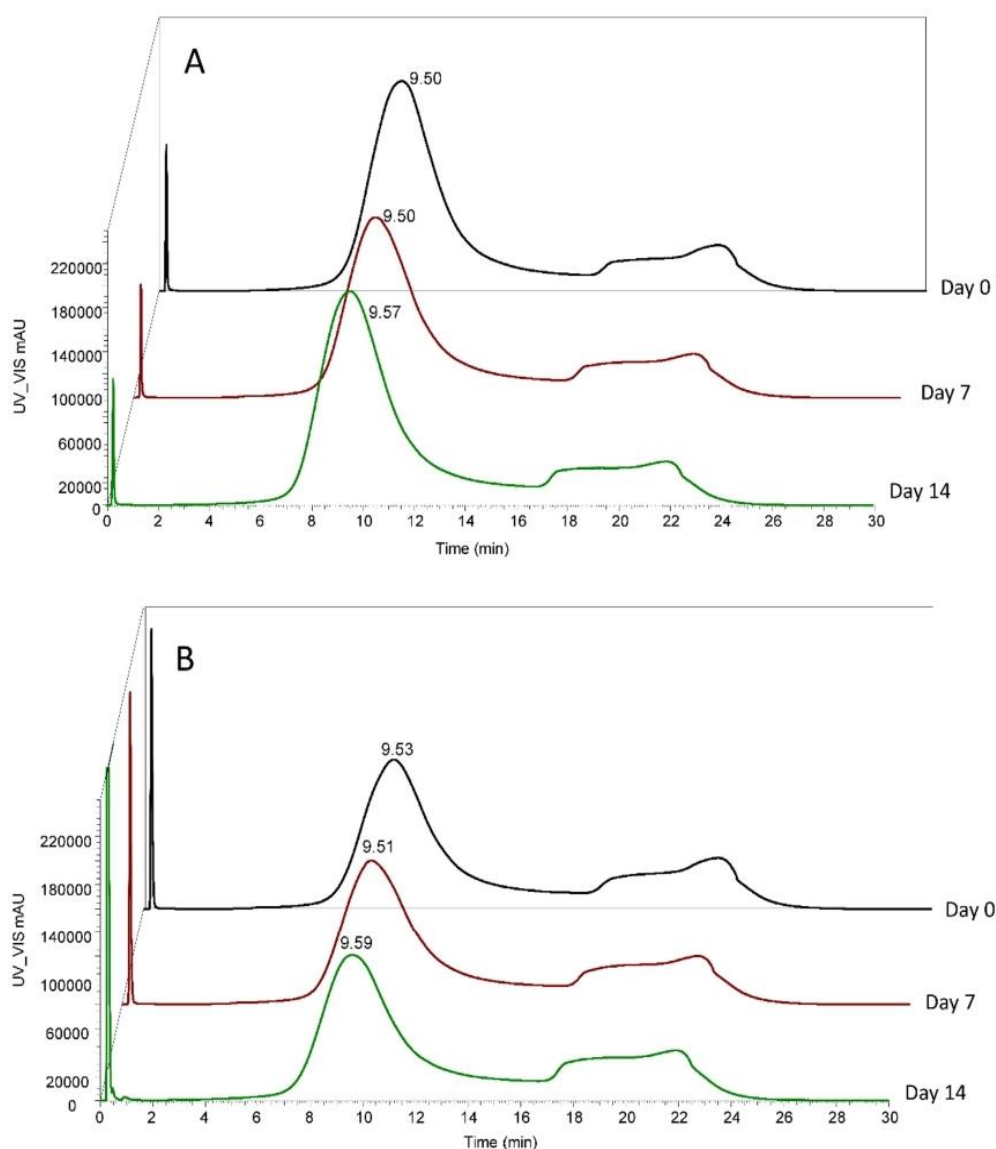
The variant profile is one of the most frequently analysed characteristics in protein stability studies and is related with the presence or absence of different posttranslational modifications. In this paper, the charge variant profile was assessed using the (SCX)UHPLC/UV method, which had previously demonstrated its ability to detect changes when ziv-AFL samples were submitted to different physical stresses [22].

This method was applied to monitor the ziv-AFL charge variants in the clinical solutions at 4 and 0.6 mg/mL during storage in polyolefin bags for 14 days. Fig. 4 shows the (SCX)UHPLC/UV chromatograms for representative replicates of samples from ziv-AFL bags at Day 0, 7 and 14. These chromatograms have very similar profiles with the same peaks as on Day 0. No acidic or basic peaks

appear. The retention times are also similar over time for all the samples ( $9.52 \pm 0.03$  min and  $9.59 \pm 0.05$  min for ziv-AFL 4 mg/mL and 0.6 mg/mL bag samples respectively, estimated using results from the two bag replicates, and in this case two replicates of each bag). A more detailed discussion of this particular charge variant profile of ziv-AFL can be found in [22]. The fact that no changes were detected in the different charge variants of ziv-AFL indicates that no chemical changes had taken place in the clinical solutions.

### 3.8. ELISA

The ELISA method was developed and validated *ad hoc* for the quantification of the specific interaction between ziv-AFL and VEGF, as a mean of checking the functionality of this Fc-fusion protein [21]. Fig. 5 shows the results of the present stability study, in which Ziv-AFL-VEGF binding curves are represented over the 14-day study period for the two concentrations studied (including the results from the two bags). In the graphs, the absorbance  $\pm$  SD is represented as a function of the concentration of ziv-AFL. Control samples (fresh samples prepared “there and then”) were used for comparison purposes each check day and their results are shown in



**Fig. 4.** Representative strong cation exchange high-performance chromatography with ultraviolet detection (SCX/UHPLC-UV) chromatograms of Ziv-AFL (Zaltrap®) solutions stored in polyolefin bags over the 14-day study period: (A) 4 mg/mL bag. (B) 0.6 mg/mL bag.

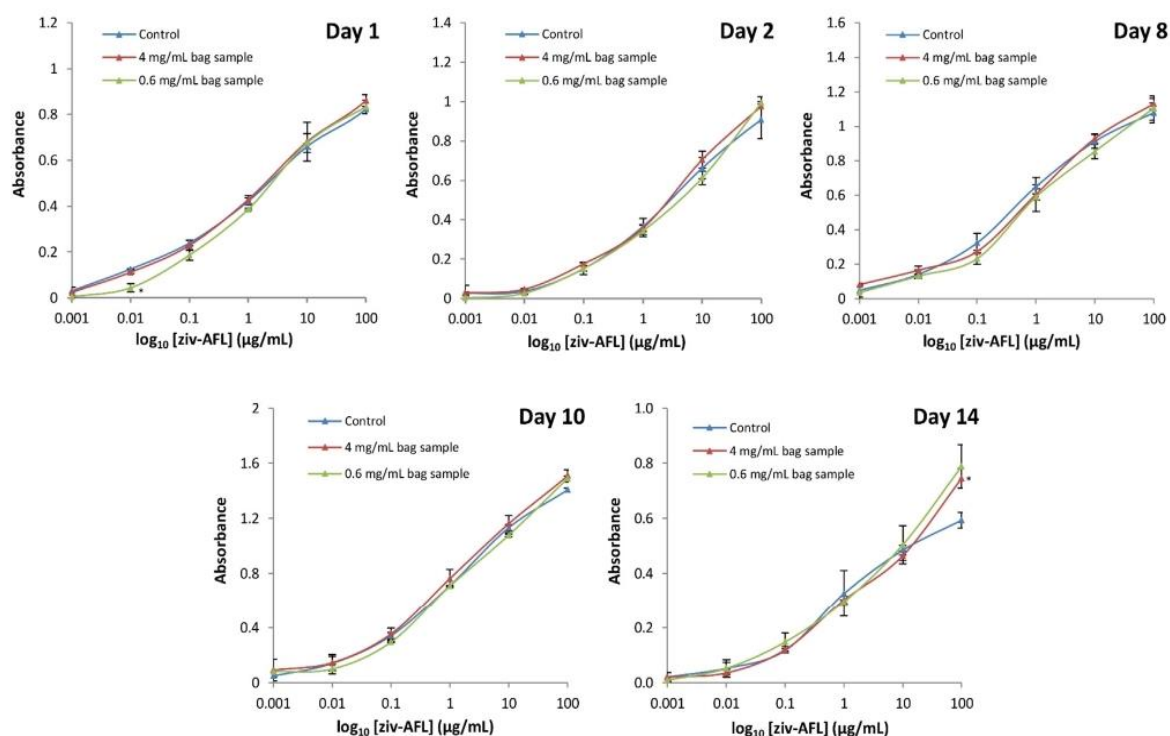
blue; for ziv-AFL 4 mg/mL bag samples the results are displayed in red while the 0.6 mg/mL samples appear in green. Broadly speaking, there is no significant decay in the absorbance of the samples analysed with respect to the control samples at any concentration (4 or 0.6 mg/mL ziv-AFL) or at any time during the study period (14 days), therefore confirming the functional stability of these clinical solutions for at least 14 days. As can be seen in Fig. 5, the behaviour of the immunoreaction ziv-AFL-VEGF was very similar to the control samples, as indicated by the similar tendency in the graph, with no significant differences (see error bars) between the particular experimental concentrations used to build the graph. Only two experimental points (indicated in Fig. 5 with an “\*” in the 0.6 mg/mL bag sample on Day 1 and in the 4 mg/mL bag sample on Day 14) showed significant decay in the absorbance, which was attributed to an unexpected error while manipulating the samples. Nevertheless, these two experimental points do not affect the results, because no significant differences were detected in any

of the other experimental points and the tendency of the graphs clearly indicated similar ziv-AFL-VEGF interaction in the control (fresh) samples and in the bag samples at concentrations of 4 and 0.6 mg/mL.

#### 4. Discussion

A set of previously validated analytical methodologies [21,22] were selected for a comprehensive analysis of the stability of the complex Fc-fusion protein ziv-AFL in real hospital conditions of use – clinical solutions placed in polyolefin infusion bags – stored refrigerated at 2–8 °C for two weeks. In this paper, analytical similarity was assessed in terms of the values of the main CQA of the ziv-AFL samples over the 14 days of the study. Two clinical concentrations of ziv-AFL were evaluated: one at an intermediate level of clinical concentration (4 mg/mL) and the other at a lower level (0.6 mg/mL).





**Fig. 5.** Ziv-AFL (Zaltrap®)-VEGF non-competitive indirect ELISA graphs: absorbance represented as a function of ziv-AFL concentration (0.001-100 µg/mL) over the 14-day study period. Control samples (blue line); 4 mg/mL bag (red line) and 0.6 mg/mL bag (green line) (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

Aggregation was evaluated using three analytical methods: a) by analysing oligomers by SEC, b) by analysing larger soluble particulate populations up to 10 µm by DLS and c) by visual inspection. The results indicated that no changes had taken place in the initial particulate populations in the solutions and therefore that the clinical solutions remained unchanged. The SE-chromatographic profile indicates that oligomerization of ziv-AFL did not occur in any of the bag solutions over the 14-day study period. The particulate profile obtained from DLS indicated that aggregation did not take place in either of the bag solutions over the check period. The solutions remained clear in all visual checks. Therefore, no instability due to aggregation occurred in the 14-day study period in either of the solutions (4 or 0.6 mg/mL), and the ratio between the natural ziv-AFL dimers and monomers remained the same throughout (around 2 % dimers/98 % monomers), an important finding given that in previous research on ziv-AFL it was demonstrated that the main degradation pathway in this therapeutic Fc-fusion protein was dimerization and the formation of high molecular weight aggregates (non-natural) [21]. Nonetheless, our results indicate that the controlled storage conditions applied in this study prevented aggregation.

The secondary structure of the protein was assessed by CD spectroscopy, and it was deduced that in both clinical solutions of ziv-AFL (4 and 0.6 mg/mL) the secondary structure remained stable over the 14-day period. The ziv-AFL CD spectra for the two samples remained unaltered as did the ellipticity. These results indicate that no β-amyloid aggregates were formed during the study period, as in recent research on the same protein we observed, using CD spectroscopy, a clear increase in the negative band associated with the same aggregation process [21]. Moreover, the estimation of the content of secondary structure using Dichroweb [25] indicated a high percentage of β sheet and random coil, which remained unaltered over the 14 days of the stability study.

The tertiary structure of ziv-AFL was assessed by estimating the tryptophan fluorescence spectral centre of mass. This remained constant over the 10 days tested in both ziv-AFL bag solutions. This confirms that the tryptophan environment in the protein conformation was unaltered. This finding, together with the results obtained from the intrinsic protein fluorescence test, allowed us to conclude that protein conformation in these solutions remained unaltered over the 10-day period.

Ziv-AFL is a very complex glycosylated Fc-fusion protein, which has a protein structure with a molecular weight of 97 kDa. According to the manufacturer, the glycosylation part increases the weight of the molecule by 15 % (up to 115 kDa) [21]. This complex glycan structure makes it difficult to develop analytical methods that can properly identify the different AFL charge variants [28]. However, the charge variant profile is a CQA that should be included in any study of stability. In previous research, a (SCX)UHPLC-UV method was shown to be capable of detecting changes in the charge variant profile of ziv-AFL, although it did not manage to identify or separate the different charge variants [28]. We therefore decided to use this method here to track changes in the charge variant profile of ziv-AFL in the clinical solutions, so as to assess the stability of these solutions over time. As these profiles remained constant, with high levels of similarity amongst all the samples regardless of the concentrations studied (4 or 0.6 mg/mL), this indicates that over the 14 days no chemical changes took place that might have affected the charge profile of ziv-AFL in these clinical solutions.

Finally, if we take into account the functionality of ziv-AFL measured as the capacity of the protein to bind to its target, i.e the VEGF; our results show that the Fc-fusion protein maintained its functionality over the 14-day study period, with no evidence of functional loss in either clinical solution. This is also coherent with the results obtained above using fluorescence spectroscopy (once the stability of the other quality attributes had been demonstrated), in that



a decrease in functionality is usually accompanied by a conformational change.

Our results demonstrate high physicochemical and functional stability of ziv-AFL during the 14-day stability study. The values for the CQA of the ziv-AFL samples were very similar to those for the control samples, i.e. the samples analysed immediately after preparation. The analytical results were also highly similar for the two concentrations tested, i.e. 4 mg/mL and 0.6 mg/mL.

## 5. Conclusions

In this study we analysed two concentrations (an intermediate concentration of 4 mg/mL in 0.9 % NaCl and a low concentration of 0.6 mg/mL in 0.9 % NaCl) of ziv-AFL clinical solutions prepared aseptically in polyolefin infusion bags and stored refrigerated in darkness. A specific set of analytical techniques were used to evaluate the main physicochemical CQA in addition to monitoring the functional integrity of the Fc-fusion protein over the 14-day test period by assessing its capacity to bind to its target, the VEGF. These tests revealed very similar results over the two-week period indicating a high degree of stability in both solutions. All the methods and strategies applied in this study had previously been validated to confirm their ability to detect changes in the structure or functionality of ziv-AFL. No changes were detected in the CQA that might impair the efficacy and safety of the medicine. These results will encourage hospital pharmacists to reuse Zaltrap® when stored in the conditions studied here.

## Funding

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).

## Author contributions

N.N. designed and supervised the work and wrote the paper with the contribution of J.H. and R.P.-R., who prepared figures; J.H. performed the spectroscopic experiments and ELISA supervised by S.C. including samples stress and figures supervising; R.P.-R. performed the chromatographic experiments; A.S. and J.C. designed and prepared samples and A.S. designed stability study and supervised stress of the samples, J.H., R.P.-R., A.S., S.C., J.C. and N.N. discussed and approved final version of the manuscript.

## Data Availability

The datasets generated and/or analysed during this research are available from the corresponding author on reasonable request.

## Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

## Acknowledgments

The authors would like to thank the Hospital Pharmacy Unit of the University Hospital San Cecilio (Grenada, Spain) for kindly supplying the medicine samples.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114209>.

## References

- [1] A. Linderholm, S.M. Chamow, Immunoglobulin Fc-fusion proteins part 2: therapeutic uses and clinical development, *Bioprocess Int.* 12 (2014).
- [2] EMA - European Medicines Agency, Zaltrap®, Annex I: Summary of Product Characteristics, 2013, pp. 1–45 (Accessed October 19, 2020) [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zaltrap-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zaltrap-epar-product-information_en.pdf).
- [3] U. Schmidt-Erfurth, P.K. Kaiser, J.F. Korobelnik, D.M. Brown, V. Chong, Q.D. Nguyen, A.C. Ho, Y. Ogura, C. Simader, G.J. Jaffe, J.S. Slakter, G.D. Yancopoulos, N. Stahl, R. Vitti, A.J. Berliner, Y. Soo, M. Anderesi, O. Sowade, O. Zeitz, C. Norenberg, R. Sandbrink, J.S. Heier, Intravitreal aflibercept injection for neovascular age-related macular degeneration: ninety-six-week results of the VIEW studies, *Ophthalmology*. 121 (2014) 193–201.
- [4] C.W. Baker, Y. Jiang, T. Stone, Recent advancements in diabetic retinopathy treatment from the diabetic retinopathy clinical research network, *Curr. Opin. Ophthalmol.* 27 (2016) 210–216.
- [5] M.M.C. Van Beers, M. Bardor, Minimizing immunogenicity of biopharmaceuticals by controlling critical quality attributes of proteins, *Biotechnol. J.* 7 (2012) 1473–1484.
- [6] N.P.Q.A. Committee, A Standard Protocol Introduction for Deriving and Assessment of Stability Part 2 – Aseptic Preparations (Biopharmaceuticals) Incorporating Annex on Antibody Conjugates, 4th edition, 2020, pp. 1–38, Accessed October 19, 2020) <https://www.sps.nhs.uk/wp-content/uploads/2020/08/Stability-Part-2-Biopharmaceuticals-v4-Aug-2020.pdf>.
- [7] G. Le Guyader, V. Vieillard, S. Mouraud, B. Do, Stability of nivolumab in its original vials after opening and handing in normal saline bag for intravenous infusion, *Eur. J. Cancer* 135 (2020) 192–202.
- [8] 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.
- [9] A. Kannan, I.C. Shieh, P. Hristov, G.G. Fuller, In-use interfacial stability of monoclonal antibody formulations diluted in saline i.v. Bags, *J. Pharm. Sci.* 110 (2021) 1687–1692.
- [10] F. Terms, News in brief, expert rev, *Anticancer Ther.* 12 (2012) 1249–1251.
- [11] I. Regeneron Pharmaceuticals, EYLEA (Aflibercept) Injection Receives FDA Approval for Treatment of Diabetic Retinopathy in Patients With Diabetic Macular Edema, *India Pharma News.*, 2015.
- [12] A.M. Mansour, S.I. Al-Ghadban, M.H. Yunis, M.E. El-Sabban, Ziv-aflibercept in macular disease, *Br. J. Ophthalmol.* 99 (2015) 1055–1059.
- [13] M. Schicht, K. Hesse, H. Schröder, E. Naschberger, W. Lamprecht, F. Garreis, Efficacy of aflibercept (EYLEA) on inhibition of human VEGF in vitro, *Ann. Anat.* 211 (2017) 135–139.
- [14] EMA - European Medicines Agency, Eylea®, Annex I: Summary of Product Characteristics, 2012, pp. 1–96 (Accessed October 19, 2020) [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/eylea-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/eylea-epar-product-information_en.pdf).
- [15] S. Cao, J. Cui, J. Matsubara, F. Forooghian, Long-term in vitro functional stability of compounded ranibizumab and aflibercept, *Can. J. Ophthalmol. Can. d'ophtalmologie*. 52 (2017) 273–276.
- [16] J. De Lima Farah, R. Sano, I.M.L. Maugéri, D. Teixeira, M.E. Ishimura, G. Martins, L.M.J. Mimica, C.B. Da Silva, C.H. Meyer, J.R. De Oliveira Dias, G.C. De Andrade, M.E. Farah, Evaluation of aflibercept and ziv-aflibercept binding affinity to vascular endothelial growth factor, stability and sterility after compounding, *Int. J. Retin. Vitre.* 4 (2018) 1–7.
- [17] M.S. Sivertsen, Ø.K. Jørstad, A. Grevys, S. Foss, M.C. Moe, J.T. Andersen, Pharmaceutical compounding of aflibercept in prefilled syringes does not affect structural integrity, stability or VEGF and Fc binding properties, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1–9.
- [18] H.E. Lode, T.T. Gjølborg, S. Foss, M.S. Sivertsen, J. Brustugun, Y. Andersson, Ø.K. Jørstad, M.C. Moe, J.T. Andersen, A new method for pharmaceutical compounding and storage of anti-VEGF biologics for intravitreal use in silicone oil-free prefilled plastic syringes, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–10.
- [19] D.P. Han, C. Skumatz, J.C. Besharse, I.S. Kassem, Sustained anti-vascular endothelial growth factor activity of aflibercept (Eylea) after storage in polycarbonate syringes used for intravitreal injection: a pathway to safety and efficiency, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 35 (2019) 278–282.
- [20] M.R. Moreno, T.S. Tabitha, J. Nirmal, K. Radhakrishnan, C.H. Yee, S. Lim, S. Venkatraman, R. Agrawal, Study of stability and biophysical characterization of ranibizumab and aflibercept, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 108 (2016) 156–167.
- [21] J. Hermosilla, R. Pérez-Robles, A. Salmerón-García, S. Casares, J. Cabeza, J. Bones, N. Navas, Comprehensive biophysical and functional study of ziv-aflibercept: characterization and forced degradation, *Sci. Rep.* 10 (2020) 1–13.
- [22] R. Pérez-Robles, L. Cuadros-Rodríguez, A. Salmerón-García, J. Cabeza-Barrera, N. Navas, Intact charge variant analysis of ziv-aflibercept by cationic exchange

J. Hermosilla, R. Pérez-Robles, A. Salmerón-García et al.

*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 203 (2021) 114209

- liquid chromatography as a proof of concept: comparison between volatile and non-volatile salts in the mobile phase, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 185 (2020).
- [23] S. Oshinbolu, L.J. Wilson, W. Lewis, R. Shah, D.G. Bracewell, Measurement of impurities to support process development and manufacture of biopharmaceuticals, *Trends Analyt. Chem.* 101 (2018) 120–128.
- [24] ICH Expert Working Group, ICH Topic Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products, 1999, pp. 1–17 (Accessed October 19, 2020) <https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-6-b-test-procedures-acceptance-criteria-biotechnological/biological-products-step-5-en.pdf>.
- [25] L. Whitmore, B.A. Wallace, Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases, *Biopolymers*. 89 (2008) 392–400.
- [26] 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 Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1032 (2016) 155–164.
- [27] M. Instruments, *Dynamic Light Scattering: Common Terms Defined*, 2011, pp. 1–6 (Accessed October 18, 2020) <http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/wp-content/uploads/2011/02/DLS.Terms.defined.Malvern.pdf>.
- [28] R. Pérez Robles, *Analytical Strategies for the Structural Characterization of Monoclonal Antibodies and Fusion Proteins Using Mass Spectrometry*, University of Granada, 2020.

## CAPÍTULO III



## **Material suplementario**

---

## CAPÍTULO III

*Supplementary data to:*

**Stability study over time of clinical solutions of ziv-aflibercept prepared in infusion bags using a proper combination of physicochemical and functional strategies**

Jesús Hermosilla <sup>a</sup>, Raquel Pérez-Robles <sup>a</sup>, Antonio Salmerón-García <sup>b</sup>, Salvador Casares <sup>c</sup>, Jose Cabeza <sup>b</sup>, Natalia Navas <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Sciences Faculty, Instituto de Investigación Biosanitaria (ibs.Granada) / University of Granada, E-18071 Granada, Spain.

<sup>b</sup> Department of Clinical Pharmacy / Instituto de Investigación Biosanitaria (ibs.Granada), San Cecilio University Hospital, 18016 Granada, Spain

<sup>c</sup> Department of Physical Chemistry, Sciences Faculty, University of Granada, E-18071 Granada, Spain

<sup>d</sup> Department of Analytical Chemistry, Sciences Faculty / Instituto de Investigación Biosanitaria (ibs.Granada), University of Granada, E-18071 Granada, Spain

\* Corresponding author

E-mail address: natalia@ugr.es (N. Navas)

Fuentenueva Avenue s/n, 18071 Granada, Spain

Telephone / Fax number: ++ 34 958 242868 / ++ 34 958 243328

## CAPÍTULO III

**Table 1.** Stability study work outline.

<b>Forced degradation (stress)</b>	<i>A combination of</i>	<i>Techniques validated</i>
	Exposure to light	All
	High temperature	All
	Freeze/thawing cycles	All
	pH variation	All except by SCX/UHPLC-UV
	Ionic strength	All except by SCX/UHPLC-UV
	Denaturation by Guanidine	All except by SCX/UHPLC-UV
<b>Stability over time</b>	<i>Sample</i>	
Visual characteristics	Visual Inspection	4 and 0.6 mg/mL
Physicochemical properties	Secondary structure (FU-CD)	4 and 0.6 mg/mL
Physicochemical properties	Tertiary structure (IT-F)	4 and 0.6 mg/mL
	Tertiary structure (IP-F)	4 and 0.6 mg/mL
Functional properties	Soluble particulate (DLS)	4 and 0.6 mg/mL
	Aggregates (SE/HPLC-DAD)	4 and 0.6 mg/mL
	Charge variants (SCX/UHPLC-UV)	4 and 0.6 mg/mL
	ELISA	4 and 0.6 mg/mL

**SCX/UHPLC-UV** (*Strong Cation Exchange /Ultra High Performance Liquid Chromatography-UltraViolet*); **FU-CD** (*Far UltraViolet Circular Dichroism*); **IT-F** (*Intrinsic Tryptophan Fluorescence*), **IP-F** (*Intrinsic Protein-Fluorescence*); **DLS** (*Dynamic Light Scattering*); **SE/HPLC-DAD** (*Size Exclusion/ High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection*)

### CAPÍTULO III

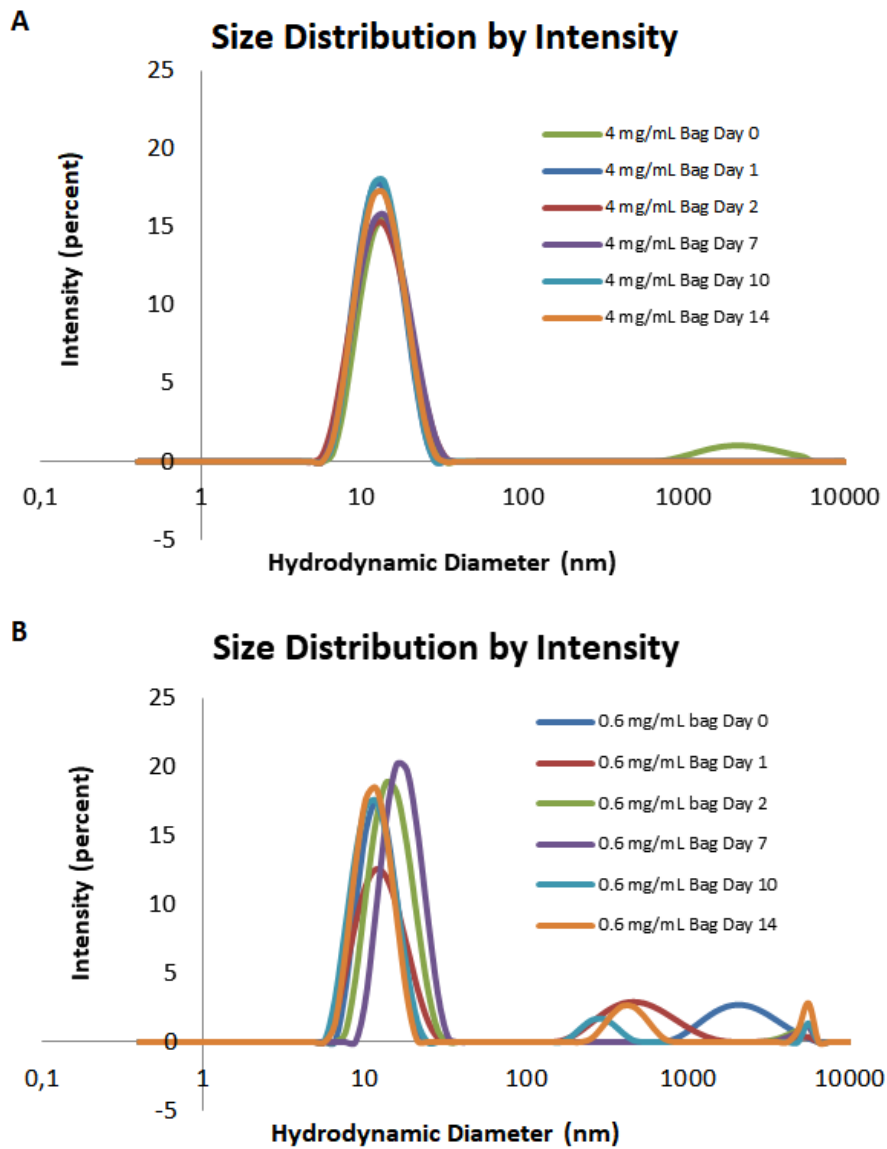
**Table 2:** Estimation of the content in % of secondary structures in ziv-AFL diluted to 4 mg/mL and stored in infusion bags and stored at 2-8°C over 14 days. Results from representative bag sample.

4 mg/ml bag	Alpha helix	B sheet	Random
Day 0	5	47	48
Day 1	5	47	48
Day 2	5	47	48
Day 7	5	47	48
Day 11	5	47	48
Day 14	5	47	48

**Table 3:** Estimation of the content in % of secondary structures in ziv-AFL diluted to 0.6 mg/mL and stored in infusion bags and stored at 2-8°C over 14 days. Results from representative bag sample.

0.6 mg/ml bag	Alpha helix	B sheet	Random
Day 0	5	47	48
Day 1	5	47	48
Day 2	5	47	48
Day 7	5	47	48
Day 11	5	47	48
Day 14	5	47	48

**Figure 1.** Representative size distribution by intensity of 4mg/mL A) and 0.6 mg/mL B) ziv-AFL (Zaltrap®) solutions stored in polyolefin bags over 14 days.







## CONCLUSIONES

---

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

A continuación, se exponen las conclusiones generales que se extraen de los resultados globales de esta Tesis Doctoral, ya que las conclusiones específicas derivadas de las investigaciones particulares expuestas en los capítulos anteriores, han quedado ya recogidas en dichos capítulos.

- ✓ La caracterización analítica comprensiva propuesta en esta Tesis puede ser empleada en estudios de estabilidad de proteínas terapéuticas en condiciones de uso hospitalario, ya que, el perfil de estabilidad propuesto permite evaluar con rigurosidad el conjunto de atributos críticos de la calidad mínimo indispensable para poder establecer conclusiones sobre dicha estabilidad.
- ✓ El perfil de estabilidad propuesto ha permitido determinar el perfil de oligómeros, particulado de las disoluciones, perfil de isoformas y de variantes de carga de las proteínas, caracterizar las estructuras secundarias y terciaria, determinar la concentración de las proteínas y evaluar la funcionalidad a través de la cuantificación de la actividad biológica de dichos anticuerpos monoclonales y de la proteína de fusión-Fc que han sido objeto de estudio.
- ✓ La metodología analítica puesta a punto *ad hoc* para cada proteína estudiada, ha demostrado ser útil para detectar rutas de degradación como agregaciones, modificaciones químicas o estructurales de anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión-Fc terapéuticos.
- ✓ El análisis comprensivo de los resultados propuesto, ha permitido relacionar cambios a nivel químico con cambios estructurales significativos y pérdidas de funcionalidad de las proteínas terapéuticas aquí estudiadas. Esta estrategia puede ser aplicada en el estudio de cualquier otra proteína terapéutica.
- ✓ Los resultados obtenidos permiten concluir la mayor complejidad de la proteína de fusión-Fc ziv-aflibercept con respecto a los anticuerpos monoclonales estudiados, infliximab y CT-P13. Esto ha sido determinante para que no se haya podido determinar aún su perfil de isoformas por espectrometría de masas, dado el elevado porcentaje de glicosilación que presenta, muy superior y mucho más complejo que el de los anticuerpos monoclonales en general.
- ✓ Aunque se concluye que la proteína de fusión ziv-aflibercept es más frágil que los anticuerpos monoclonales estudiados -infiximab y bisomilar CT-P13-, e

## CONCLUSIONES

incluso presenta vías diferentes de degradación con la formación de agregación compleja tipo  $\beta$ -amiloides, en general, los resultados ponen de manifiesto la fragilidad tanto de anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión-Fc terapéuticos frente a distintas condiciones ambientales de estrés, por lo que se incide en la recomendación de una manipulación rigurosa que evite errores.

- ✓ Desde el punto de vista de la estabilidad en el tiempo de las preparaciones farmacéuticas, tanto de los anticuerpos monoclonales como de la proteína de fusión-Fc, han demostrado sus estabilidades más allá del tiempo de uso indicado por los laboratorios fabricantes, siempre y cuando se almacenen refrigeradas y protegidas de la luz a 2-8°C. Por tanto, estos resultados contribuyen a mejorar la eficiencia de los tratamientos, permitiendo una contención del gasto sanitario.
- ✓ Los resultados y conclusiones específicos de los capítulos experimentales (publicaciones), han aportado información valiosa sobre la estabilidad de tres medicamentos biotecnológicos de gran relevancia clínica.
- ✓ Los estudios de estabilidad en condiciones de uso clínico de medicamentos biotecnológicos, cuyos principios activos son anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión-Fc, han demostrado ser de gran utilidad, permitiendo resolver problemas reales en el ámbito hospitalario.

# **PERSPECTIVAS FUTURAS**

---

## PERPSECTIVAS FUTURAS

Dados los resultados satisfactorios obtenidos en esta Tesis Doctoral, el perfil indicador de estabilidad propuesto inicialmente para el estudio de infliximab y su biosimilar CT-P13, y posteriormente empleado con éxito en el estudio de la compleja proteína de fusión ziv-aflibercept, servirá para empelarlo en el estudio de otras proteínas terapéuticas, como por ejemplo, en el estudio del anticuerpo monoclonal nivolumab (Opdivo®, medicamento innovador) o el péptido teduglutide (Revestide®, medicamento innovador), los cuales se encuentran actualmente bajo estudio por nuestro grupo de investigación, utilizando estrategias analíticas similares, y adaptándolas a las particularidades específicas de cada medicamento/proteína biotecnológica. En el caso de ziv-aflibercept, en cuyo estudio han quedado aspectos estructurales no resueltos dada su complejidad (comentados en el capítulo II), se están poniendo a punto estrategias analíticas avanzadas empleando huella dactilar peptídica obtenida por espectrometría de masas de alta resolución y masa exacta (“bottom-up MS strategies”), que permitan, por ejemplo, el estudio de isoformas, la determinación experimental de su masa molecular, así como de otros atributos críticos de la calidad como deamidaciones, oxidaciones o isomerizaciones entre otras.

A pesar de lo expuesto y comentado en esta Tesis, se plantea para un futuro próximo, el uso de otras técnicas analíticas que contribuyan y completen la información sobre otros atributos críticos de la calidad, o sobre los ya estudiados, y que se empleen como técnicas ortogonales. Se plantea el uso de técnicas como el oscurecimiento de la luz (light obscuration), o imagen de microflujo (micro-flow imaging), para el estudio del particulado subvisible, no abordado en esta tesis. Por otro lado, se propone el uso de técnicas complementarias a los ELISA para evaluar la funcionalidad, como la resonancia de plasmones de superficie (SPR) o la termoforesis a microescala (MST) -esta última se está ya evaluando y poniendo a punto metodología para evaluar la funcionalidad de infliximab como modelo-; técnicas que, a diferencia de ELISA, arrojan información sobre la cinética de unión. En lo referente a la funcionalidad de anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión-Fc terapéuticos, esta ha sido abordada desde el punto de vista de la unión a sus dianas terapéuticas (regiones Fab), lo cual es un paso fundamental para desempeñar sus mecanismos de acción. Sin embargo, estos son mucho más complejos (ver Anexo), e involucran otras regiones estructurales, como la Fc. La región Fc se relaciona con las funciones efectoras de los anticuerpos como la citotoxicidad celular

## PERPSECTIVAS FUTURAS

dependiente de complemento (ADCC) o citotoxicidad mediada por complemento (CDC). Rituximab es un anticuerpo monoclonal terapéutico, cuyo mecanismo de acción involucra el reclutamiento de las proteínas del complemento. Se propone realizar métodos ELISA indirectos, basados en la proteína C1q, para evaluar la funcionalidad de anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión-Fc, cuyo mecanismo de acción este fuertemente influenciado por el desencadenamiento de funciones efectoras.



## **ANEXO. LECTURAS SUGERIDAS**

---

## ANEXO. LECTURAS SUGERIDAS

## ANEXO. LECTURAS SUGERIDAS

Esta Tesis Doctoral puede considerarse multidisciplinar y se ha desarrollado en un grupo multidisciplinar. Sin ir más lejos, mis compañeros de laboratorio provienen de diferentes ámbitos, como la bioquímica, la farmacia, la química, o yo mismo, que provengo de los estudios de biotecnología. Es por esto, que he considerado interesante hacer referencia e incluir una serie de contenidos que considero básicos para poder entender en su conjunto el contexto de mi Tesis Doctoral. Estos contenidos son los que expongo a continuación como lecturas recomendadas en este Anexo.

## ANEXO. LECTURAS SUGERIDAS

## ¿Qué son las guías ICH?

---

La conferencia internacional sobre la armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano, es un proyecto que reúne a las autoridades reguladoras de medicamentos de Europa, Japón, EEUU y a la industria farmacéutica, para tratar aspectos científicos y técnicos de registro de productos farmacéuticos. El objetivo de dicho proyecto es reducir o evitar la necesidad de duplicar las pruebas llevadas a cabo durante la investigación y desarrollo de nuevos fármacos y lograr una mayor armonización en la interpretación y aplicación de las directrices técnicas y requisitos para aprobar medicamentos que sean eficaces, seguros y de calidad de una manera lo mayor eficiente posible. Esta armonización debe conducir a (MP Control, 2016):

- 1) Economizar los recursos humanos, animales y materiales.
- 2) Eliminar demoras en la administración de medicamentos nuevos.
- 3) Garantizar la eficacia, calidad y seguridad de medicamentos.
- 4) Proteger la salud pública.

Esto se consigue mediante la elaboración de unas guías específicas (guías ICH). La ICH publica volúmenes extensos de guías que son clasificadas en 4 categorías: calidad (**Q**), seguridad (**S**), eficacia (**E**) y multidisciplinar (**M**). Las guías sobre calidad incluyen la realización de estudios de estabilidad, la definición de los límites para testar impurezas y garantizan un enfoque más flexible para garantizar la calidad. Algunas de las guías ICH más relevantes abordan la estabilidad (Q1A-Q1F), fotoestabilidad (Q1B), validación analítica (Q2), impurezas (Q3A-Q3D), farmacopeas (Q4-Q4B), calidad de los productos biotecnológicos (Q5A-Q5E), especificaciones (Q6A-Q6B), buenas prácticas de fabricación (Q7), desarrollo farmacéutico (Q8), gestión de riesgos de calidad (Q9), sistema de calidad farmacéutica (Q10) o desarrollo y fabricación de sustancias farmacéuticas (Q11). Las guías ICH sobre eficacia han sido fundamentales para la industria, si se considera que los ensayos clínicos son la etapa más costosa y compleja en el desarrollo de medicamentos. Las guías sobre calidad han ayudado a reducir la duplicación de pruebas realizadas durante el desarrollo de fármacos, en particular, en

## ANEXO. LECTURAS SUGERIDAS

las áreas como el establecimiento de límites de impurezas y pruebas de estabilidad. Esto último tendrá también un impacto significativo en cambios que puedan producirse en la fabricación o empaquetado al tras la autorización del medicamento, que necesitan ser apoyados por estudios de estabilidad en curso (Branch, 2005).

## ¿Qué son los biosimilares?

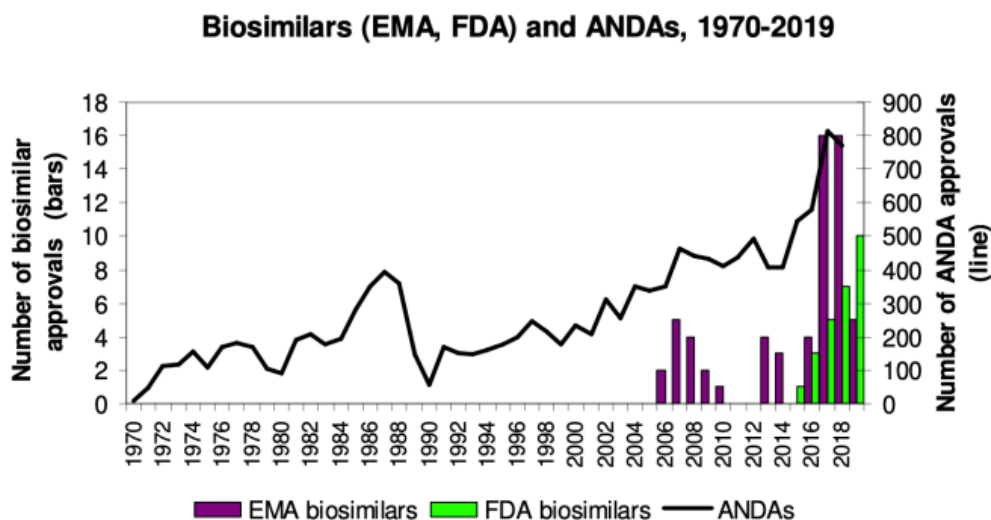
---

El término “biosimilar”, denominado también “medicamento biológico similar” por la EMA, se introdujo en la legislación europea a través de la Directiva 2003/63/EC y Directiva 2004/27/EC. Posteriormente, la OMS y la FDA publicaron sus guías sobre biosimilares (Kay, 2011; World Health Organization-WHO, 2009), siendo conocidos como “similar biotherapeutic products” y “follow-on biologics” por ambos organismos respectivamente. Se define biosimilar como un medicamento biológico similar a otro de origen biológico innovador (medicamento de referencia), que ya ha sido autorizado previamente (European Medicines Agency - EMA, 2014a, 2014b).

Los laboratorios pueden comercializar los biosimilares una vez haya expirado la patente del medicamento biológico original. Las razones para promover el desarrollo y uso de biosimilares radican en la idea de hacer esta clase de medicamentos más accesibles a los sistemas sanitarios, y así aumentar las opciones de tratamiento de los pacientes, ya que el elevado precio asociado al medicamento biológico original derivado de los costes de su desarrollo y producción pueden hacer que el tratamiento sea inaccesible para ciertos colectivos o países (Simoens et al., 2017). Mediante la introducción de biosimilares, se pretende la reducción de costes entre un 15-30 % (El-Bakry, 2017; Simoens, 2011), aunque los precios de los biosimilares pueden variar entre los distintos países europeos (Moorkens, Vulto, et al., 2017). Esta reducción puede deberse a unos ensayos clínicos acortados y a un proceso de producción más avanzado y eficiente. Por ejemplo, se han estimado unos ahorros acumulados de 98 mil millones de euros debido a la introducción de biosimilares de 8 medicamentos biológicos clave (adalimumab, insulina, etanercept, infliximab, rituximab, pegfilgastim, trastuzumab y follitopina) para el año 2020 en cinco países europeos (Alemania, Francia España, Italia y Reino Unido). A pesar de ello, no se consigue la reducción que se alcanza en los medicamentos genéricos, que es cercana al 90 %. Para mayo de 2019, 59 biosimilares habían sido aprobados en Europa, entre ellos: factores de crecimiento, hormonas, anticuerpos monoclonales, proteínas de fusión y heparinas de bajo peso molecular, tal y como se muestra en la figura 5. En ella se establece una comparativa de los biosimilares

## ANEXO. LECTURAS SUGERIDAS

aprobados por la FDA con respecto a la EMA, así como todas las solicitudes aprobadas de medicamentos genéricos desde 1970 (Darrow, 2019).



**Figura 5.** Evolución en las aprobaciones de biosimilares por la EMA y la FDA mostradas en barras de color violeta y verde respectivamente desde 2006 con respecto a la totalidad de solicitudes abreviadas de nuevos medicamentos aprobadas desde 1970 (línea continua) (Darrow, 2019).

La similitud respecto al medicamento de referencia, debe ser establecida mediante un ejercicio de comparabilidad en términos de calidad, actividad biológica, eficacia y seguridad. Un medicamento biosimilar no se considera genérico de un medicamento biológico, principalmente debido a la gran variabilidad natural, complejidad estructural y del proceso de fabricación de sus principios activos. No se puede lograr en ellos una réplica exacta de la microheterogeneidad molecular; es por esta razón que se requieren más estudios para la aprobación de biosimilares que de genéricos. Por ejemplo, los requisitos para la aprobación de un medicamento genérico son principalmente estudios de bioequivalencia farmacocinética. Para aprobar los biosimilares, además de estudios comparativos farmacodinámicos y farmacocinéticos, pueden solicitarse datos relativos a la seguridad y eficacia. Se requiere, en el caso de los biosimilares, de estudios sobre la calidad y de estudios preclínicos y clínicos (International Alliance of Patients' Organizations, 2013). A esto, se suma la necesidad de aportar un plan de gestión de riesgos detallado, que provea información sobre



situaciones de riesgo potenciales e información faltante significativa, así como un plan de farmacovigilancia para gestionar posibles riesgos (Ebbers et al., 2012).

Mención especial merecen los medicamentos biológicos basados en anticuerpos monoclonales o derivados. Debido a sus características ya expuestas, para el desarrollo de biosimilares, se propone un proceso basado en etapas que incluya, en primer lugar, una exhaustiva caracterización fisicoquímica y biológica. La complejidad estructural dada para esta clase de biofármacos puede limitar la precisión de esta caracterización molecular y la identificación de pequeñas diferencias, que puedan tener una repercusión significativa en la seguridad o eficacia (Revers & Furczon, 2010). El segundo paso consiste en la caracterización y comparabilidad de la actividad biológica del biosimilar respecto al de referencia. Este ejercicio, de elevada complejidad, pretende determinar si las diferencias halladas en el paso anterior tienen algún impacto sobre la actividad biológica de la molécula en cuestión. El último paso es la valoración clínica (García Zaragoza et al., 2017).

La extensa documentación exigida sobre el plan de gestión de riesgos y farmacovigilancia, conlleva a interpretaciones erróneas sobre su seguridad y al temor a su implantación en la práctica clínica, así como sobre decisiones en cuanto a la intercambiabilidad. La EMA ha publicado recientemente una guía para profesionales sanitarios sobre biosimilares (European Medicines Agency - EMA, 2017a) que incluye definiciones importantes en referencia a la intercambiabilidad. Según esta guía, la intercambiabilidad es un concepto científico-médico comprensivo, que concierne a la práctica de cambiar un medicamento por otro que se espera tenga el mismo resultado clínico, ya sea original por biosimilar o biosimilar por otro biosimilar. Por un lado, está el concepto de intercambio y por otro el de sustitución. El primero lo aprueba un médico, mientras que la sustitución automática la lleva a cabo un farmacéutico, sin que intervenga el médico. Las decisiones sobre intercambios o sustituciones de medicamentos biosimilares son tomadas a nivel nacional, sin que intervengan las agencias regulatorias. Sin embargo, diferentes enfoques a este respecto se han generado tanto por la EMA, como por la FDA. Según la EMA, a diferencia de la FDA, hay consenso entre los distintos estados miembros sobre la no necesidad de realizar ensayos clínicos para evaluar la intercambiabilidad. Se entiende que los estudios comparativos

## ANEXO. LECTURAS SUGERIDAS

exhaustivos durante el desarrollo de un biosimilar, junto con los datos clínicos recogidos sobre intercambios de original por biosimilar, son suficientes. A pesar de esto, suele haber consenso en que una sustitución automática no es posible para los medicamentos biológicos/biotecnológicos y debe ser una decisión evaluada cautelosamente y supervisada por un médico (Noce & Ernst, 2018).

Un gran número de sustituciones automáticas se han producido países europeos en los últimos años, la mayoría de ellos cambios únicos de original a biosimilar una vez que este ha sido aprobado (Noce & Ernst, 2018). Hay publicadas revisiones sistemáticas que recogen los resultados de ensayos clínicos publicados sobre intercambiabilidad (Barbier et al., 2020; McKinnon et al., 2018). La más reciente (Barbier et al., 2020) recogió estudios publicados sobre la eficacia, seguridad e inmunogenicidad de las prácticas de intercambio entre innovador y biosimilar o viceversa. Un total de 178 ensayos clínicos aleatorizados y observacionales han evaluado la intercambiabilidad. Los autores remarcan que a pesar de que muchos estudios no presentan una metodología robusta, los estudios no parecen indicar problemas de seguridad, eficacia o inmunogenicidad en el intercambio a biosimilares. En particular, diversos estudios de intercambio de infliximab por CT-P13 han sido llevados a cabo en los últimos años (Avouac et al., 2018; Glintborg et al., 2017; Jørgensen et al., 2017; Tweehuysen et al., 2018). Entre ellos, un estudio extenso a 52 semanas, doble ciego y aleatorizado, fue realizado en Noruega y evaluó el efecto del intercambio de infliximab por CT-P13 en 500 pacientes con distintas enfermedades inflamatorias (Jørgensen et al., 2017). El intercambio a CT-P13 demostró no ser inferior al tratamiento original con infliximab en términos de empeoramiento de la enfermedad tras un año, sin haberse presentado problemas de seguridad.

# ¿Por medio de qué mecanismos actúan los anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión terapéuticos?

---

Un anticuerpo monoclonal es aquel que reconoce específicamente una parte del antígeno, es decir, un epítipo concreto y que es producido por un clon de linfocitos B (Ruiz et al., 2008). La eficacia de estas macromoléculas terapéuticas radica en sus funciones naturales en el organismo como: neutralización, ADCC o CDC. Estos también pueden ser utilizados como portadores de otras moléculas con una función específica, como los conjugados anticuerpos-fármaco (ADCs).

Los mecanismos de acción de los anticuerpos monoclonales son muy variados. Entre ellos nos encontramos: alteración de la unión ligando-receptor, eliminación de las células diana mediante diversos mecanismos inmunes como ADCC, CDC y ADCP o la regulación negativa por internalización del receptor entre otras (Strohl & Strohl, 2012b; Zhou & Marks, 2016).

- La unión ligando-receptor conforma el paso inicial en la transducción de señales dentro de la célula, relacionadas con la proliferación celular, adhesión y migración. Algunas de estas están relacionadas con la progresión del cáncer. Los anticuerpos monoclonales que se unen a la interfaz ligando-receptor, impiden que el receptor se active, y en consecuencia, se desencadene la cascada de señalización intracelular que se quiere evitar para frenar el desarrollo de la enfermedad.

Por un lado, se encuentran los que bloquean al ligando, entre los que comúnmente se hayan: factores de crecimiento como VEGF, citoquinas como TNF- $\alpha$  o IL-6, componentes inmunes solubles como IgE, así como receptores de virus y bacterias. Por otro lado, se encuentran los que se unen a receptores celulares. La mayoría de los que tratan el cáncer se unen a receptores celulares, entre los que nos encontramos: CD20, sobre expresado en linfomas de células B no Hodgkings o HER2, sobre expresado en las células malignas del epitelio mamario. Los anticuerpos monoclonales que se unen a

## ANEXO. LECTURAS SUGERIDAS

receptores celulares ejercen tres funciones: inhibición de las señales celulares debido al bloqueo del receptor frente al ligando, regulación negativa y el reclutamiento de las funciones efectoras.

- La actividad terapéutica de un gran número de anticuerpos monoclonales resulta del reclutamiento de funciones efectoras, llevado a cabo por la región Fc, ya sean ADCC, CDC o ADCP.

Entre los que reclutan funciones efectoras están los que se unen al CD20, como es el caso de rituximab, ofatumumab y obinutuzumab. Por ejemplo, rituximab y trastuzumab perdieron la acción terapéutica en ratones modificados genéticamente que no expresaban receptores FcγR (Clynes et al., 2000). También puede lograrse un incremento de estas funciones modificando la región Fc. Por ejemplo, la eliminación de la fucosilación en la Asn 297 o mutaciones puntuales en la región Fc, encargada de unión a receptores Fc. Obinituzumab es un ejemplo de un anticuerpo monoclonal glicosilado no fucosilado, creado con objeto de aumentar la unión a CD16A y la actividad de las células N killer.

Otros anticuerpos monoclonales que activan funciones efectoras son aquellos que se unen a los receptores HER2, como es el caso de trastuzumab; y CD52, como es el caso de alemtuzumab.

- Otro de sus mecanismos de acción proviene de la creación de anticuerpos monoclonales biespecíficos. Estos pueden unirse simultáneamente a dos antígenos distintos al estar formados por dos scFv.

Las células T citotóxicas juegan un papel muy importante como mecanismo efector antitumoral, sin embargo, las células tumorales desarrollan vías para evadir su acción (Rabinovich et al., 2007). Estos anticuerpos monoclonales se dirigen por un scFv a un antígeno de superficie de la célula tumoral sobre expresado y el otro se une al receptor CD3 parte del receptor T. Sirven de puente entre las células tumorales y las células T que son activadas y destruyen el tumor. El primer BiTE aprobado en terapia fue blinatumomab, indicado en el tratamiento de la LLA (Przepiorka et al., 2015).

## ANEXO. LECTURAS SUGERIDAS

- Los anticuerpos monoclonales ejercen también, su acción terapéutica, mediante regulación negativa y la internalización y destrucción del receptor. Puede ocurrir que la unión anticuerpo-receptor induzca la internalización de este y, por tanto, resulte en una regulación negativa. El mecanismo de acción de algunos se basa en este evento, como ocurre en el caso de los anti EGFR y HER2 (Friedman et al., 2005).

Por último, también ejercen otras funciones si se les unen fármacos específicos, buscándose una liberación dirigida de estos (Janthur et al., 2012). Por un lado, están los conjugados anticuerpos-fármacos (ADCs) (Lewis Phillips et al., 2008), cuyo mecanismo de acción consta de varias etapas: 1) unión del anticuerpo monoclonal al antígeno, 2) internalización del complejo anticuerpo monoclonal-antígeno, 3) liberación del fármaco dentro de la célula y 4) actuación del fármaco dentro de ella ejerciendo acciones como la de rotura del ADN y microtúbulos mediante derivados de la calicheamicina o taxano y la interrupción de la síntesis de ADN por doxorrubicina. Por otro lado, se encuentran las inmunotoxinas, moléculas híbridas formada por la unión de una toxina, o parte de ella, a un ligando inmune, que puede ser un anticuerpo monoclonal o citoquinas como la IL-2, creadas para destruir tumores (Kreitman, 2006). Cabe mencionar también los inmunoliposomas, los cuales ofrecen ciertas ventajas frente a los anteriores al encapsular al agente anticancerígeno en una partícula lipídica, como es la mayor penetración en el tejido tumoral y una mayor liberación del fármaco.

Como ha sido mencionado anteriormente, la tecnología del hibridoma (1975) fue la que permitió el desarrollo de los primeros anticuerpos monoclonales. Previo a este descubrimiento, el uso de anticuerpos en terapia y diagnóstico, se basaba en la administración de sueros inmunes, estos eran obtenidos de diversas especies animales y contenían una mezcla de anticuerpos producidos por distintos clones de linfocitos B. A esta mezcla se la denominó suero policlonal.

Los anticuerpos monoclonales han captado gran atención debido a la gran rapidez con la que llegan al mercado. Su importancia radica en su estabilidad, especificidad y adaptabilidad. De hecho, los anticuerpos monoclonales no solo tienen la habilidad de unión a antígenos y receptores celulares endógenos, sino que se prestan

## ANEXO. LECTURAS SUGERIDAS

fácilmente a ser modificados mediante ingeniería de proteínas. Se han conseguido crear derivados de anticuerpos monoclonales como anticuerpos biespecíficos, fármacos inmunoconjugados, fragmentos de anticuerpos o proteínas de fusión-Fc.

# ¿Cómo se producen los anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión terapéuticos?

---

En las décadas de los 70 y 80, ya se poseían el conocimiento y herramientas para el desarrollo de anticuerpos monoclonales terapéuticos: enzimas de restricción para clonar genes en plásmidos, tecnología del hibridoma, ingeniería de proteínas por mutagénesis dirigida, tecnología de presentación sobre fagos (*Phage Display*), PCR y secuenciación/caracterización de los genes de las inmunoglobulinas y su expresión en líneas celulares y *E.coli*. Los primeros anticuerpos monoclonales fueron producidos gracias a los hibridomas: esta tecnología fue desarrollada por Milstein y Kohler en el año 1975 (KÖHLER & MILSTEIN, 1975), siendo ambos galardonados con el Premio Nobel en medicina en el año 1984 junto con Jerne. Inicialmente, la producción de anticuerpos monoclonales mediante la tecnología de hibridoma, se conseguía exclusivamente en ratones, aunque en los años venideros se consiguió desarrollar esta tecnología en conejos y humanos. A continuación, se detallan los pasos para generar hibridomas múridos.

En primer lugar, se desarrolla y optimiza un antígeno inmunogénico. Una vez optimizado, se inmuniza el ratón durante varias semanas junto con adyuvantes. A continuación, se ensaya la reactividad y especificidad del suero del animal inmunizado frente al antígeno, mientras que los animales con títulos elevados de anticuerpos con afinidad, se seleccionan para serles aislados posteriormente los esplenocitos. Estos son fusionados con células de mieloma inmortalizadas. Posteriormente, las células híbridas son seleccionadas en un medio Hipoxantina-Aminopterina-Timidina (HAT): las células de mieloma son sensibles a este compuesto al carecer del gen Hipoxantina Guanina Fosforribosil Transferasa (HGPRT), requerido para la síntesis de nucleótidos por la ruta de novo, mientras que las células B no fusionadas acaban muriendo debido a su corta vida. Las células fusionadas o híbridas, son sometidas a un cribado para seleccionar aquellos hibridomas que producen anticuerpos con especificidad adecuada (Parray et al., 2020).

## ANEXO. LECTURAS SUGERIDAS

En 1986 fue aprobado el primer anticuerpo monoclonal en terapia humana por la FDA, muromonab-CD3 (Reichert, 2012). Se trata de un anticuerpo monoclonal múrido que se une al antígeno CD3 expresado por células T circulantes, induciendo su apoptosis. Se administra para el tratamiento del rechazo agudo de trasplante de riñón. Sin embargo, se observaron efectos adversos en pacientes, como el síndrome de liberación de citoquinas, debido a que este activaba a los linfocitos liberando TNF e IL-2. Además, al tratarse de un anticuerpo íntegramente múrido, el huésped producía anticuerpos anti-ratón neutralizando su actividad (Smith, 1996). La vida media breve en sangre, las funciones efectoras desencadenadas poco eficientes y los problemas inmunológicos (generación de anticuerpos humanos anti-ratón por gran parte de los pacientes, HAMA), dieron lugar al desarrollo de alternativas para la producción de anticuerpos monoclonales: la quimerización, la humanización y la creación de anticuerpos monoclonales íntegramente humanos.

- La quimerización fue desarrollada en 1984 por Morrison y colaboradores (Morrison et al., 1984). En ella, se obtienen anticuerpos monoclonales en los que las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas son de origen múrido, mientras que el resto de la molécula es de origen humano.

Los anticuerpos monoclonales quiméricos pueden generarse por ingeniería genética al unir las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras, procedentes de una hibridoma de ratón, a las regiones constantes de inmunoglobulinas humanas. En primer lugar, se obtiene el bazo de un ratón inmunizado que contiene las células B. Las células B se fusionan con células de mieloma para producir una hibridoma y aislar un clon que produzca de manera específica el anticuerpo monoclonal frente al antígeno deseado. Las secuencias de ADN que codifican para las regiones VH y VL son aisladas del clon, al igual que las regiones constantes procedentes de células humanas. Los genes múridos y humanos son amplificados por PCR y se crea una construcción génica, para posteriormente transformar células de mamífero. Por último, el clon que exprese el anticuerpo monoclonal con mayor afinidad por el antígeno y un alto nivel de producción, es seleccionado. Los anticuerpos monoclonales quiméricos poseen alrededor de un tercio de su secuencia de origen múrido.



## ANEXO. LECTURAS SUGERIDAS

El primer anticuerpo monoclonal quimérico completo utilizado en terapia humana fue rituximab (Rituxan®), aprobado en uso humano en el año 1997 para el tratamiento del linfoma de células B no Hodgkin (European Medicines Agency - EMA, 2008). Desde la aprobación de rituximab, se han ido desarrollando diversos anticuerpos monoclonales quiméricos como infliximab o cetuximab.

Poco tiempo después, llegaron las técnicas de humanización. En los anticuerpos monoclonales quiméricos, un 30-35% de la secuencia es de origen murino, lo que aún sigue desencadenando inmunogenicidad en muchos pacientes. La humanización, o la idea de hacer las cadenas variables aún más humanas, surge en el año 1986 por Winter y colaboradores (Jones et al., 1986). La técnica más empleada para tal fin ha sido la de injertos de regiones CDR murinas o remodelación de anticuerpos monoclonales. Es la tecnología de humanización más empleada para la producción de anticuerpos monoclonales humanizados. Mediante esta tecnología, se introducen las regiones CDR en secuencias humanas estrechamente relacionadas, con la posterior modificación de aminoácidos para estabilizar la construcción. Queen y colaboradores desarrollaron un procedimiento detallado para humanizar anticuerpos monoclonales por el método de injerto de CDR, el cual ha sido la base para producción de diversos anticuerpos monoclonales humanizados en terapia.

Posteriormente, en 1990, surgen los anticuerpos monoclonales humanos producidos mediante la técnica de presentación de proteínas en la superficie de fagos filamentosos o *Phage Display* por McCafferty y colaboradores (McCafferty et al., 1990), lo cual permite producir anticuerpos monoclonales sin utilizar ratones. Los fagos son partículas víricas que infectan bacterias sin causar enfermedades en humanos. La utilidad de éstos reside en:

- ✓ La posibilidad de introducirles genes foráneos mediante el uso de las tecnologías del ADN recombinante.
- ✓ La expresión de dicha proteína: en este caso, la región variable o la región Fab de un anticuerpo monoclonal, en la superficie del fago unido a la proteína P3 en la región amino terminal como proteína de fusión.

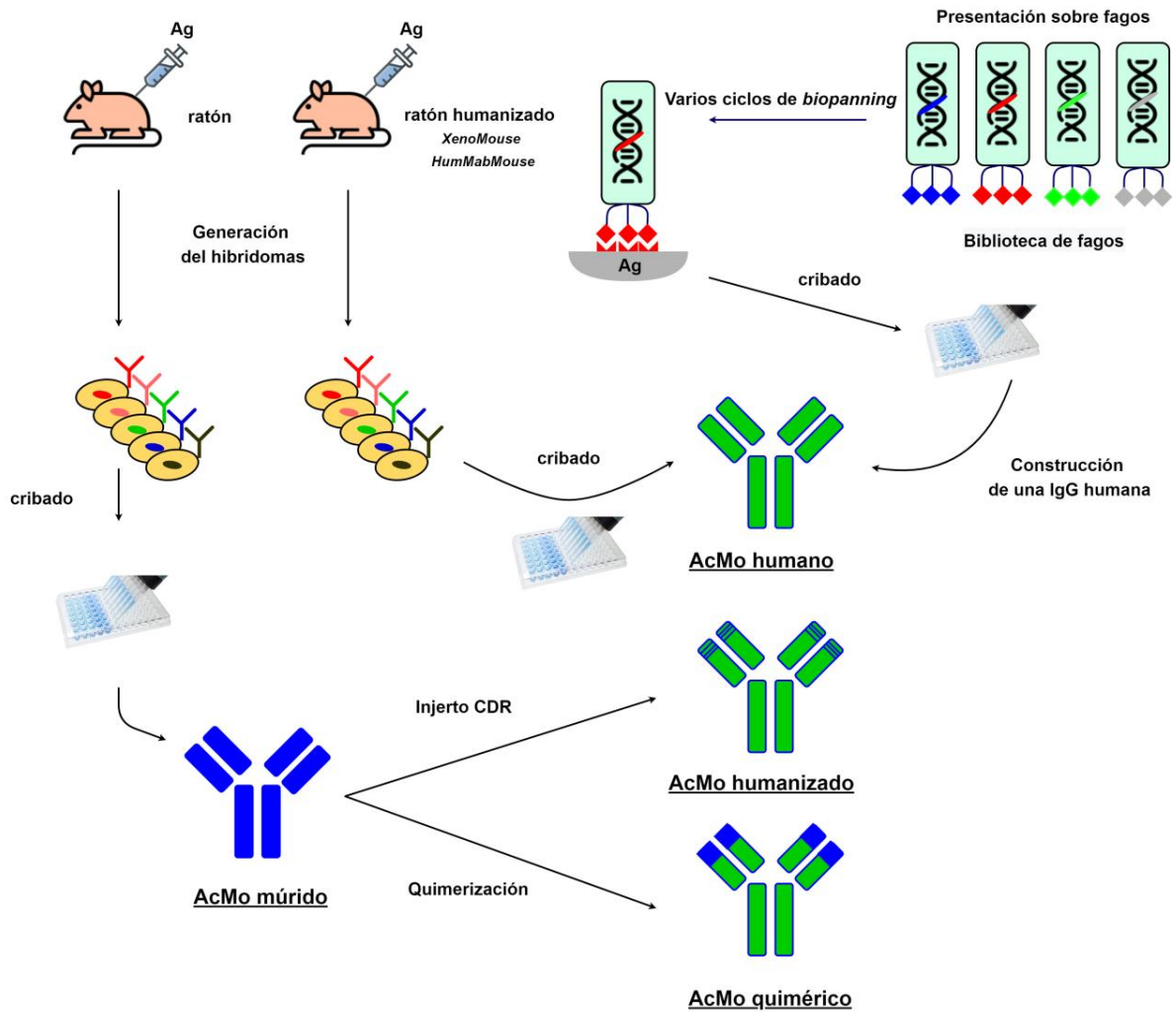
## ANEXO. LECTURAS SUGERIDAS

El procedimiento general se inicia con la creación de una biblioteca de fagos que contenga la diversidad genética del ADN de las inmunoglobulinas. El segundo paso consiste en realizar un cribado y seleccionar el fago que exprese la región variable (scFv) o Fab con más afinidad al antígeno, el cual ha sido inmovilizado en un soporte sólido. Se realizan varios ciclos de selección que incluyen pasos de unión, lavado y elución para amplificar el fago de interés (*biopanning*). Estos fagos unidos son recuperados y usados para infectar bacterias y para su amplificación. Posteriormente, se realizan ensayos ELISA o de citometría de flujo (FACS) para identificar los clones específicos del antígeno de interés. Finalmente, una vez seleccionado el clon que codifique para la región scFv o Fab con mayor afinidad por el antígeno, este gen se ensambla al de la región Fc. La secuencia genética se introduce en células CHO para producirlos. El primer anticuerpo monoclonal producido mediante esta técnica fue adalimumab en 2002 (Lagrán & Díaz-pérez, 2008).

Otro procedimiento para sintetizar anticuerpos monoclonales humanos es por medio de la creación de ratones transgénicos productores de IgG humanas: tecnología desarrollada en el año 1994 por Lonberg y colaboradores (Lonberg et al., 1994) y Green y colaboradores (Green et al., 1994). En estos, se inhibe la capacidad del ratón para producir sus propias inmunoglobulinas y se le insertan los genes que codifican para inmunoglobulinas humanas mediante diversos vectores. Para su creación, ratones transgénicos portadores de inmunoglobulinas humanas se cruzan con ratones en los cuales se han eliminado los genes de inmunoglobulinas endógenas murinas (Castillo, 2015). El primer anticuerpo monoclonal creado mediante esta tecnología fue panitumumab en 2006.

Hay que destacar la creación de proteínas de fusión-Fc. La primera fue creada en 1989 (Capon et al., 1989), al fusionar la región Fc de una IgG1 a la región extracelular de CD4. 9 años después fue aprobada la primera proteína de fusión-Fc en terapia, etanercept. Por otro lado, se encuentran los anticuerpos monoclonales con la región Fc modificada. Eculizumab (2007) fue aprobado 13 años después de que Alegre y colaboradores (1994) describieran la generación y caracterización de las mutaciones alanina-alanina de un OKT3 humanizado, la primera descripción detallada de un

anticuerpo con mutación Fc. En la figura 6 quedan resumidas las principales tecnologías para la producción de anticuerpos monoclonales terapéuticos.



**Figura 6.** Resumen de las principales tecnologías para la producción de anticuerpos monoclonales terapéuticos.

## ¿Qué técnicas analíticas permiten el estudio de la agregación de biofármacos?

---

Uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta durante el desarrollo de biofármacos, es la aparición de agregados proteicos. La agregación es la inestabilidad física más común encontrada durante cualquier etapa del desarrollo y producción (W. Wang, 2005), así como durante su transporte y uso en hospitales. La naturaleza de los agregados es muy variada: atendiendo a su estructura, encontramos agregados en estado nativo y no nativo; atendiendo al tamaño, los agregados pueden ser desde dímeros hasta partículas visibles y subvisibles, que pueden estar formados por la unión de millones de unidades monoméricas, pasando por estados intermedios como oligómeros o agregados de alto peso molecular; atendiendo a la naturaleza de los enlaces intermoleculares, los agregados pueden ser reversibles o irreversibles. A pesar del efecto negativo sobre la funcionalidad, la preocupación de la presencia de agregados proteicos en los medicamentos biotecnológicos se debe a la capacidad de estos de generar toxicidad y respuestas inmunes. En este sentido, los agregados han sido ampliamente estudiados por diversas técnicas analíticas. Según el tipo de información que arrojan, estas pueden clasificarse atendiendo a diferentes criterios: técnicas para detectar y caracterizar particulado visible y subvisible, técnicas de separación para detectar y caracterizar agregados y técnicas para evaluar aspectos estructurales de las mismas. Por otro lado, las técnicas analíticas se clasifican, a su vez, en función del tamaño molecular de los agregados a analizar: agregados solubles que van hasta aproximadamente los 100 nm y agregados insolubles denominados particulado que se clasifican a su vez en particulado subvisible (1-100  $\mu\text{m}$ ) y visible (>100  $\mu\text{m}$ ).

La cromatografía de exclusión molecular (SEC) ha sido y es la técnica estándar para la caracterización de agregados debido a su simplicidad, bajo coste, fácil manejo, poca cantidad de muestra requerida, rapidez y rendimiento elevado. Es una técnica válida para la separación de agregados solubles basada en el volumen hidrodinámico y también para cuantificarlos, presentando limitaciones a la hora de detectar partículas

insolubles. SEC requiere además diluir la muestra, pudiéndose presentar interacciones de la muestra con la fase estacionaria, lo cual puede afectar a la exactitud del método. Junto a SEC se encuentran la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y la electroforesis capilar con dodecilsulfato de sodio (CE-SDS). SDS-PAGE es una técnica bastante robusta, capaz de separar agregados unidos covalentemente por peso molecular. Esta técnica, en cambio, no permite detectar agregados no covalentes, requiere tinción y la cuantificación es difícil. La técnica CE-SDS asegura una cuantificación más robusta, requiriendo, al igual que SDS-PAGE, poca cantidad de muestra y presentando ambos rendimientos medios/altos. Esta técnica tampoco permite la detección de agregados no covalentes y puede darse interacción de la proteína con el capilar. Ambos métodos se utilizan en control de calidad junto a SEC (Den Engelsman et al., 2011).

Otros métodos ortogonales a SEC que se utilizan para validar los resultados obtenidos por dicha técnica son: fraccionamiento en flujo mediante campo de flujo asimétrico (AF4) y ultra centrifugación analítica (AUC). El AF4 separa agregados por su tamaño hidrodinámico. Puede cuantificar agregados mayores que por SEC y detectar agregados insolubles, aunque presenta el inconveniente de ser una técnica menos robusta y madura que SEC, y que, por lo tanto, el desarrollo metodológico es exhaustivo y es poco aplicable en control de calidad. Por otro lado, está la técnica AUC, que separa agregados por su peso molecular y/o forma. Es capaz de detectar agregados de mayor tamaño, permitiendo la cuantificación y ofreciendo una alta resolución. Sin embargo, presenta unos rendimientos bajos, pues se necesitan unos tiempos de análisis elevados, así como personal cualificado para hacer el tratamiento de datos. A pesar de ser más cara que las anteriores, requerir un calibrado constante y un mantenimiento regular del equipo, se utiliza para validar los resultados obtenidos por SEC.

La técnica de dispersión de la luz dinámica (DLS) se emplea para determinar la distribución de tamaños de partículas en disolución. Es una técnica rápida, muy sensible, no destructiva y capaz de detectar agregados de hasta un tamaño de 10  $\mu\text{m}$  (Malvern, 2011). La técnica presenta desventajas a la hora de discriminar oligómeros como dímeros o trímeros. A pesar de ser una técnica muy sensible para detectar particulado en disolución, la cuantificación mediante DLS no es posible, siendo una técnica

## ANEXO. LECTURAS SUGERIDAS

esencialmente cualitativa. Esta técnica es poco adecuada para muestras polidispersas, y es además muy sensible a contaminaciones como polvo.

Para caracterizar el particulado subvisible, las farmacopeas europeas y estadounidenses están armonizadas y contemplan dos técnicas para evaluarlo (European Medicines Agency - EMA, 2017b): el oscurecimiento de la luz y la microscopía. Ambas herramientas presentan criterios de aceptación definidos por el máximo número de partículas subvisibles aceptables por contenedor o por mL en disoluciones inyectables de gran volumen. Los instrumentos de oscurecimiento de la luz son capaces, en su mayoría, de detectar agregados en el intervalo 2-100  $\mu\text{m}$ , con variaciones en su precisión y reproducibilidad, mediante unos análisis rápidos. Esta técnica cuantifica y clasifica por tamaño. Los inconvenientes de dicha técnica tienen que ver con la etapa de preparación de la muestra, que tiene que evitar la presencia de contaminación y artefactos. Las burbujas de aire y las gotas de silicona pueden ser erróneamente contabilizadas y las partículas de naturaleza no esférica no son detectadas correctamente. Además, es incapaz de discriminar partículas proteicas de no proteicas (Rech et al., 2020). La microscopía permite el estudio del tamaño y morfología de partículas. Esta técnica requiere desarrollar métodos laboriosos, ofreciendo bajas resoluciones y con una alta probabilidad de que se produzca contaminación. Esto limita a dicha técnica para su uso rutinario. Las farmacopeas solo fijan criterios para el estudio de partículas subvisibles superiores a 10 y 25  $\mu\text{m}$ , e ignoran aquellas inferiores a 10  $\mu\text{m}$  que se postula que puedan estar involucradas en reacciones inmunogénicas (Carpenter et al., 2009). Estas técnicas presentan ciertas desventajas en cuanto a la robustez, sensibilidad y precisión a la hora de determinar los distintos tipos de partículas. Por lo tanto, la industria está evaluando el uso de tecnologías como imagen de micro-flujo (MFI) o microscopía óptica/análisis de imagen. MFI permite determinar la concentración, tamaño y morfología de partículas. Esta técnica discrimina partículas proteicas de no proteicas. Sin embargo, presenta como desventajas el que solo permite evaluar una parte de la muestra y que es una técnica emergente que genera un gran volumen de datos. Siguen apareciendo nuevos métodos, como la medición de masa resonante (RMM), el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) y las técnicas avanzadas de oscurecimiento de la luz (C.-T. Huang et al., 2009).

## ANEXO. LECTURAS SUGERIDAS

Un análisis de las partículas visibles es fundamental durante las distintas etapas del desarrollo de biofármacos, quedando los métodos establecidos por las diferentes farmacopeas. Las farmacopeas europeas y estadounidenses establecen que las disoluciones inyectables tienen que ser “prácticamente o esencialmente libres de partículas visibles”. Se lleva a cabo por inspección visual, la cual requiere de analistas entrenados y es realizada visualmente o también por equipos semiautomáticos o automáticos (Hawe et al., 2015).

## ¿Qué técnicas analíticas permiten el estudio de las estructuras de orden mayor de biofármacos?

---

Es fundamental estudiar la estructura tridimensional de las proteínas terapéuticas, al estar esta estrechamente ligada a la funcionalidad de las mismas. Las estructuras de orden mayor (secundaria, terciaria y cuaternaria) de las proteínas resultan de la combinación de fuerzas intra/intermoleculares de naturaleza débil en su mayoría, aunque también fuerte, que promueven un estado plegado o de menor energía. Las estructuras secundarias son mantenidas principalmente por puentes de hidrógeno, mientras que la estructura terciaria por interacciones electrostáticas entre aminoácidos de carga opuesta, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro (Roberts, 2014). Las estructuras de orden mayor han de ser caracterizadas mediante métodos fisicoquímicos apropiados y confirmadas a través de su funcionalidad. Las dos técnicas estándares de alta resolución usadas para la determinación de las estructuras de las proteínas son la cristalografía de rayos X y RMN. Sin embargo, ambas técnicas presentan ciertas desventajas en el contexto del desarrollo de biofármacos: la cristalografía de rayos X es poco práctica al requerir que la muestra se encuentre cristalizada, lo cual puede ser complejo o imposible para las proteínas terapéuticas (por la presencia de modificaciones postraduccionales o de regiones con estructura desordenada). Además, se trata de una técnica cara que requiere de extensos tiempos de análisis por lo que la hacen poco aplicable al análisis rutinario de biofármacos. En el caso de RMN; la poca aplicabilidad en la industria se debe al considerable tamaño de las proteínas, la relativa baja sensibilidad de las señales y la poca abundancia de los distintos isótopos (excepto  $^1\text{H}$ ). Una evaluación completa de la estructura química tridimensional es imposible, ya que las dos técnicas mencionadas anteriormente solo dan aproximaciones sobre las estructuras (Berkowitz et al., 2012; Parr et al., 2016). Evalúan el compuesto en un estado no nativo o requieren cristalizar la muestra.



## ANEXO. LECTURAS SUGERIDAS

La caracterización de las estructuras de orden mayor se lleva a cabo mediante la aplicación de una serie de técnicas biofísicas clásicas como dicroísmo circular (DC), espectroscopia de fluorescencia intrínseca (IFS) y extrínseca (EFS), espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), calorimetría diferencial de barrido (DSC), ultra centrifugación analítica (AUC), cromatografía de exclusión molecular (SEC) y distintos ensayos de unión entre otras. Una de las principales desventajas que presentan estas técnicas es que la información que aportan es un promedio de la proteína en general (Parr et al., 2016). Estas técnicas presentan debilidades a la hora de detectar y localizar pequeños cambios estructurales, así como cambios significativos que afectan a un pequeño número de moléculas.

Por último, se encuentran métodos basados en espectrometría de masas. La espectrometría de masas ha demostrado ser una tecnología exacta y reproducible capaz de caracterizar las estructuras de orden mayor con un nivel de resolución sin precedentes (Kaltashov et al., 2020). Por un lado, están las estrategias de marcaje como la espectrometría de masas de intercambio hidrogeno-deuterio (HDX-MS), y las de marcaje covalente. HDX-MS puede dar bastante información sobre las estructuras de orden mayor y la dinámica de proteínas, que pueden ser útiles para la detección de cambios estructurales menores. Otro método que puede dilucidar cambios estructurales en las proteínas terapéuticas es la espectrometría de masas de movilidad iónica (IMS). Estos métodos, a pesar de ser relativamente recientes, están siendo cada vez más aplicados en la industria biofarmacéutica para caracterizar las estructuras de biofármacos complejos como anticuerpos monoclonales.

## ¿Qué técnicas analíticas permiten el estudio de la actividad biológica de biofármacos?

---

La evaluación de las propiedades biológicas de un biofármaco constituye un paso esencial para establecer un perfil de caracterización completo. Una de estas propiedades es la actividad biológica, que se define como la capacidad de un producto de conseguir un efecto biológico determinado en el organismo (European Medicines Agency - EMA, 1999a; World Health Organization-WHO, 2013). La metodología para evaluarla incluye: ensayos biológicos in vivo en animales que registran la respuesta al producto; ensayos biológicos basados en cultivos celulares, que registran respuestas bioquímicas o fisiológicas a nivel celular y ensayos bioquímicos, que miden actividades biológicas como unión al receptor o ligando o velocidad de reacción enzimática. En el caso de anticuerpos monoclonales terapéuticos y derivados, en los cuales, su mecanismo de acción está fuertemente influenciado por el desencadenamiento de diversas funciones efectoras y sumado a la repercusión de estas en la seguridad y eficacia del tratamiento, se requiere un análisis de la actividad biológica que demuestre sus mecanismos de acción concretos: ADCC, CDC, apoptosis, unión a receptores FcRn y Fcγ entre otras. Algunos ensayos basados en líneas celulares son: ensayos de proliferación/anti-proliferación celular, de citotoxicidad, de adhesión, de activación de receptores quinasas, ensayos ADCC, CDC o de liberación de citoquinas.

En el caso de los anticuerpos monoclonales terapéuticos y derivados, la unión anticuerpo-antígeno es crítica para ejercer su función (X. Wang et al., 2018). Un parámetro clave para evaluarla, es la constante de disociación en equilibrio (Kd). Entre las tecnologías que calculan dicho parámetro se encuentran: Resonancia Superficial de Plasmones (SPR), ELISA fluorescente (FL-ELISA) y ensayos de exclusión cinética (KinExA) (Bee et al., 2012). Por otra parte, están los ensayos de unión al ligando, que evalúan la unión del anticuerpo al antígeno, siendo ELISA y SPR las técnicas mayormente usadas para tal fin. Actualmente, los ensayos ELISA y SPR son ampliamente utilizados en el desarrollo de biofármacos. A pesar de que estos métodos no han sufrido grandes

## ANEXO. LECTURAS SUGERIDAS

cambios en las últimas décadas, sí que han sufrido automatizaciones como la introducción de sistemas robóticos que han incrementado el rendimiento de ambas técnicas significativamente (Koulov, 2019).

## ANEXO. LECTURAS SUGERIDAS

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Gader, A., Miles, A. J., & Wallace, B. A. (2011). A reference dataset for the analyses of membrane protein secondary structures and transmembrane residues using circular dichroism spectroscopy. *Bioinformatics*, 27(12), 1630–1636. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr234>
- AlDeghaither, D., Smaglo, B. G., & Weiner, L. M. (2015). Beyond peptides and mAbs—current status and future perspectives for biotherapeutics with novel constructs. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 55(S3), S4–S20. <https://doi.org/10.1002/jcph.407>
- Andrade, M. A., Chacón, P., Merelo, J. J., & Morán, F. (1993). Evaluation of secondary structure of proteins from uv circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Engineering, Design and Selection*, 6(4), 383–390. <https://doi.org/10.1093/protein/6.4.383>
- Astier, A. (2015). Issues in stability of drugs for infusion. *Hospital Pharmacy Europe*. <https://hospitalpharmacyeurope.com/news/editors-pick/issues-in-stability-of-drugs-for-infusion/>
- Avouac, J., Moltó, A., Abitbol, V., Etcheto, A., Salcion, A., Gutermann, L., Klotz, C., Elhai, M., Cohen, P., Soret, P. A., Morin, F., Conort, O., Chast, F., Goulvestre, C., Jeunne, C. Le, Chaussade, S., Kahan, A., Roux, C., Allanore, Y., & Dougados, M. (2018). Systematic switch from innovator infliximab to biosimilar infliximab in inflammatory chronic diseases in daily clinical practice: The experience of Cochin University Hospital, Paris, France. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 47(5), 741–748. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2017.10.002>
- Barbier, L., Ebbers, H. C., Declerck, P., Simoens, S., Vulto, A. G., & Huys, I. (2020). The Efficacy, Safety, and Immunogenicity of Switching Between Reference Biopharmaceuticals and Biosimilars: A Systematic Review. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 108(4), 734–755. <https://doi.org/10.1002/cpt.1836>
- Beck, A., & Reichert, J. M. (2011). Therapeutic Fc-fusion proteins and peptides as successful alternatives to antibodies. *MAbs*, 3(5), 415–416. <https://doi.org/10.4161/mabs.3.5.17334>

## BIBLIOGRAFÍA

- Bee, C., Abdiche, Y. N., Stone, D. M., Collier, S., Lindquist, K. C., Pinkerton, A. C., Pons, J., & Rajpal, A. (2012). Exploring the Dynamic Range of the Kinetic Exclusion Assay in Characterizing Antigen-Antibody Interactions. *PLoS ONE*, 7(4), e36261. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036261>
- Berkowitz, S. A., Engen, J. R., Mazzeo, J. R., & Jones, G. B. (2012). Analytical tools for characterizing biopharmaceuticals and the implications for biosimilars. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(7), 527–540. <https://doi.org/10.1038/nrd3746>
- Branch, S. K. (2005). Guidelines from the International Conference on Harmonisation (ICH). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38(5), 798–805. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.02.037>
- Capon, D. J., Chamow, S. M., Mordenti, J., Marsters, S. A., Gregory, T., Mitsuya, H., Byrn, R. A., Lucas, C., Wurm, F. M., Groopman, J. E., Broder, S., & Smith, D. H. (1989). Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy. *Nature*, 337(6207), 525–531. <https://doi.org/10.1038/337525a0>
- Carpenter, J. F., Randolph, T. W., Jiskoot, W., Crommelin, D. J. A., Russell Middaugh, C., Winter, G., Fan, Y.-X., Kirshner, S., Verthelyi, D., Kozlowski, S., Clouse, K. A., Swann, P. G., Rosenberg, A., & Cherney, B. (2009). Overlooking Subvisible Particles in Therapeutic Protein Products: Gaps That May Compromise Product Quality. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(4), 1201–1205. <https://doi.org/10.1002/jps.21530>
- Carton, J. M., & Strohl, W. R. (2013). Protein therapeutics (introduction to biopharmaceuticals). In R. Ganellin, S. Roberts, & R. Jefferis (Eds.), *Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development* (pp. 127–159). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397176-0.00004-2>
- Castillo, L. V. (2015). Producción de anticuerpos monoclonales. *Panorama Actual Del Medicamento*, 41(409), 1022–1028. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6252649>
- Chan, C. P. (2019). Critical Quality Attributes Assessment and Testing Strategy for Biotherapeutics Development | American Pharmaceutical Review - The Review of American Pharmaceutical Business & Technology. *American Pharmaceutical*



- Review*. <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/359768-Critical-Quality-Attributes-Assessment-and-Testing-Strategy-for-Biotherapeutics-Development/>
- Chi, E. Y., Krishnan, S., Randolph, T. W., & Carpenter, J. F. (2003). Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharmaceutical Research*, 20(9), 1325–1336. <https://doi.org/10.1023/a:1025771421906>
- Cines, D. B., Yasothan, U., & Kirkpatrick, P. (2008). Romiplostim. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(11), 887–888. <https://doi.org/10.1038/nrd2741>
- Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G., & Ravetch, J. V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature Medicine*, 6(4), 443–446. <https://doi.org/10.1038/74704>
- Compton, L. A., & Johnson, W. C. (1986). Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Analytical Biochemistry*, 155(1), 155–167. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90241-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90241-1)
- Darrow, J. J. (2019). *Biosimilar Approvals And The BPCIA: Too Soon To Give Up*. Healthaffairs.Org. <https://www.healthaffairs.org/doi/10.1377/hblog20190718.722161/full/>
- Den Engelsman, J., Garidel, P., Smulders, R., Koll, H., Smith, B., Bassarab, S., Seidl, A., Hainzl, O., & Jiskoot, W. (2011). Strategies for the assessment of protein aggregates in pharmaceutical biotech product development. *Pharmaceutical Research*, 28(4), 920–933. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0297-1>
- DIRECTIVA 2001/83/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 6 de noviembre de 2001 por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano*. (2001). Diario Oficial de Las Comunidades Europeas. <https://www.boe.es/doue/2001/311/L00067-00128.pdf>

## BIBLIOGRAFÍA

- Ebbers, H. C., Crow, S. A., Vulto, A. G., & Schellekens, H. (2012). Interchangeability, immunogenicity and biosimilars. *Nature Biotechnology*, *30*(12), 1186–1190. <https://doi.org/10.1038/nbt.2438>
- Economides, A. N., Carpenter, L. R., Rudge, J. S., Wong, V., Koehler-Stec, E. M., Hartnett, C., Pyles, E. A., Xu, X., Daly, T. J., Young, M. R., Fandl, J. P., Lee, F., Carver, S., McNay, J., Bailey, K., Ramakanth, S., Hutabarat, R., Huang, T. T., Radziejewski, C., ... Stahl, N. (2003). Cytokine traps: multi-component, high-affinity blockers of cytokine action. *Nature Medicine*, *9*(1), 47–52. <https://doi.org/10.1038/nm811>
- El-Bakry, L. (2017). The Future of Biosimilars. *International Journal of Drug Delivery*, *9*(1), 01–02. <https://doi.org/10.5138/09750215.1930>
- ELISA principles and types*. (n.d.). <https://www.abcam.com/kits/elisa-principle>
- European Medicines Agency - EMA. (1999a). *ICH Topic Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products*. Ema.Europa.Eu. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-6-b-test-procedures-acceptance-criteria-biotechnological/biological-products-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-6-b-test-procedures-acceptance-criteria-biotechnological/biological-products-step-5_en.pdf)
- European Medicines Agency - EMA. (1999b). *Remicade: Ficha técnica o resumen de las características del producto*. Ema.Europa.Eu. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/remicade-epar-product-information\\_es.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/remicade-epar-product-information_es.pdf)
- European Medicines Agency - EMA. (2001). *Note for guidance on in-use stability testing of human medicinal products*. Ema.Europa.Eu. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/note-guidance-use-stability-testing-human-medicinal-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/note-guidance-use-stability-testing-human-medicinal-products_en.pdf)
- European Medicines Agency - EMA. (2006a). *Blinicyto: Ficha técnica o resumen de las características del producto*. Ema.Europa.Eu. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zerbaxa-epar-product-information\\_es.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zerbaxa-epar-product-information_es.pdf)

- European Medicines Agency - EMA. (2006b). *Enbrel: Ficha técnica o resumen de las características del producto.* Cima.Aemps. [https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/99126013/FT\\_99126013.pdf](https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/99126013/FT_99126013.pdf)
- European Medicines Agency - EMA. (2007). *Lucentis: Ficha técnica o resumen de las características del producto.* Ema.Europa.Eu. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zerbaxa-epar-product-information\\_es.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zerbaxa-epar-product-information_es.pdf)
- European Medicines Agency - EMA. (2008). *Mabthera: Ficha técnica o resumen de las características del producto.* Cima.Aemps. [https://cima.aemps.es/cima/pdfs/ft/98067002/FT\\_98067002.pdf](https://cima.aemps.es/cima/pdfs/ft/98067002/FT_98067002.pdf)
- European Medicines Agency - EMA. (2009). *Nplate: Ficha técnica o resumen de las características del producto.* Ema.Europa.Eu. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/nplate-epar-product-information\\_es.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/nplate-epar-product-information_es.pdf)
- European Medicines Agency - EMA. (2013a). *Inflectra: Ficha técnica o resumen de las características del producto* Title. Ema.Europa.Eu. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/inflectra-epar-product-information\\_es.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/inflectra-epar-product-information_es.pdf)
- European Medicines Agency - EMA. (2013b). *Remsima: Ficha técnica o resumen de las características del producto.* Ema.Europa.Eu. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/remsima-epar-product-information\\_es.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/remsima-epar-product-information_es.pdf)
- European Medicines Agency - EMA. (2013c). *Zaltrap: Ficha técnica o resumen de las características del producto.* Ema.Europa.Eu. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zaltrap-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zaltrap-epar-product-information_en.pdf)
- European Medicines Agency - EMA. (2014a). *Guideline on similar biological medicinal products.* Ema.Europa.Eu. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-rev1\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-rev1_en.pdf)

## BIBLIOGRAFÍA

- European Medicines Agency - EMA. (2014b). *Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues*. Ema.Europa.Eu. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-monoclonal-antibodies-non-clinical\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-monoclonal-antibodies-non-clinical_en.pdf)
- European Medicines Agency - EMA. (2017a). *Biosimilars in the EU, Information guide for healthcare professionals*. Ema.Europa.Eu. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/leaflet/biosimilars-eu-information-guide-healthcare-professionals\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/leaflet/biosimilars-eu-information-guide-healthcare-professionals_en.pdf)
- European Medicines Agency - EMA. (2017b). *ICH guideline Q4B Annex 3 on evaluation and recommendation of pharmacopoeial texts for use in the ICH regions on test for particulate contamination: subvisible particles general chapter*. Ema.Europa.Eu. <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q4b-annex-3-test-particulate-contamination-sub-visible-particles>
- European Medicines Agency - EMA. (2017c). *ICH guideline Q8 (R2) on pharmaceutical development*. Ema.Europa.Eu. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500002872.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002872.pdf)
- Evans, P., Bateman, O. A., Slingsby, C., & Wallace, B. A. (2007). A reference dataset for circular dichroism spectroscopy tailored for the  $\beta\gamma$ -crystallin lens proteins. *Experimental Eye Research*, 84(5), 1001–1008. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2007.01.016>
- Evens, R., & Kaitin, K. (2015). The Evolution Of Biotechnology And Its Impact On Health Care. *Health Affairs*, 34(2), 210–219. <https://doi.org/10.1377/hlthaff.2014.1023>
- Fekete, S., Beck, A., & Guillarme, D. (2015). Chromatographic Characterization of Biopharmaceuticals: Recent Trends and New Tools. *American Pharmaceutical Review*. <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured->

Articles/177646-Chromatographic-Characterization-of-Biopharmaceuticals-Recent-Trends-and-New-Tools/

Fekete, S., Beck, A., Veuthey, J.-L., & Guillarme, D. (2015). Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *113*, 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.02.037>

Food and Drug Administration - FDA. (2003). *Amevive: Highlights of prescribing information*. Fda.Gov. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2012/125036s0144lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/125036s0144lbl.pdf)

Friedman, L. M., Rinon, A., Schechter, B., Lyass, L., Lavi, S., Bacus, S. S., Sela, M., & Yarden, Y. (2005). Synergistic down-regulation of receptor tyrosine kinases by combinations of mAbs: Implications for cancer immunotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(6), 1915–1920. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409610102>

García Zaragoza, F., Castillo Villaescusa, L., & Corrales, G. P. (2017). *Libro Blanco de los Medicamentos Biosimilares en España: Innovación y sostenibilidad* (Fundación Gaspar Casal, Ed.).

Glintborg, B., Sørensen, I. J., Loft, A. G., Lindegaard, H., Linauskas, A., Hendricks, O., Hansen, I. M. J., Jensen, D. V., Manilo, N., Espesen, J., Klarlund, M., Grydehøj, J., Dieperink, S. S., Kristensen, S., Olsen, J. S., Nordin, H., Chrysidis, S., Dalsgaard Pedersen, D., Sørensen, M. V., ... Hetland, M. L. (2017). A nationwide non-medical switch from originator infliximab to biosimilar CT-P13 in 802 patients with inflammatory arthritis: 1-year clinical outcomes from the DANBIO registry. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *76*(8), 1426–1431. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-210742>

Goulet, D. R., & Atkins, W. M. (2020). Considerations for the Design of Antibody-Based Therapeutics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *109*(1), 74–103. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.05.031>

## BIBLIOGRAFÍA

- Green, L. L., Hardy, M. C., Maynard-Currie, C. E., Tsuda, H., Louie, D. M., Mendez, M. J., Abderrahim, H., Noguchi, M., Smith, D. H., Zeng, Y., David, N. E., Sasai, H., Garza, D., Brenner, D. G., Hales, J. F., McGuinness, R. P., Capon, D. J., Klapholz, S., & Jakobovits, A. (1994). Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nature Genetics*, 7(1), 13–21. <https://doi.org/10.1038/ng0594-13>
- Gudelj, I., Lauc, G., & Pezer, M. (2018). Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cellular Immunology*, 333(July), 65–79. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.07.009>
- Hawe, A., Zöls, S., Freitag, A., & Carpenter, J. F. (2015). Subvisible and Visible Particle Analysis in Biopharmaceutical Research and Development. In D. J. Houde & S. A. Berkowitz (Eds.), *Biophysical Characterization of Proteins in Developing Biopharmaceuticals* (pp. 261–286). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59573-7.00010-5>
- Hernández-Jiménez, J., Salmerón-García, A., Cabeza, J., Vélez, C., Capitán-Vallvey, L. F., & Navas, N. (2016). The Effects of Light-Accelerated Degradation on the Aggregation of Marketed Therapeutic Monoclonal Antibodies Evaluated by Size-Exclusion Chromatography With Diode Array Detection. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(4), 1405–1418. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.01.012>
- Huang, C. (2009). Receptor-Fc fusion therapeutics, traps, and MIMETIBODY™ technology. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(6), 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.10.010>
- Huang, C.-T., Sharma, D., Oma, P., & Krishnamurthy, R. (2009). Quantitation of protein particles in parenteral solutions using micro-flow imaging. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(9), 3058–3071. <https://doi.org/10.1002/jps.21575>
- International Alliance of Patients' Organizations. (2013). *Quick Guide on Biological and Biosimilar Medicines Contents*. <https://www.iapo.org.uk/sites/default/files/files/IAPO Quick Guide.pdf>

- Jafari, R., Zolbanin, N. M., Rafatpanah, H., Majidi, J., & Kazemi, T. (2017). Fc-fusion Proteins in Therapy: An Updated View. *Current Medicinal Chemistry*, *24*(12), 1228–1237. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170113112759>
- Janthur, W.-D., Cantoni, N., & Mamot, C. (2012). Drug Conjugates Such as Antibody Drug Conjugates (ADCs), Immunotoxins and Immunoliposomes Challenge Daily Clinical Practice. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(12), 16020–16045. <https://doi.org/10.3390/ijms131216020>
- Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S., & Winter, G. (1986). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, *321*(6069), 522–525. <https://doi.org/10.1038/321522a0>
- Jørgensen, K. K., Olsen, I. C., Goll, G. L., Lorentzen, M., Bolstad, N., Haavardsholm, E. A., Lundin, K. E. A., Mørk, C., Jahnsen, J., Kvien, T. K., Berset, I. P., Fevang, B. T., Florholmen, J., Kalstad, S., Mørk, N. J., Ryggen, K., Tveit, K. S., Sæther, S. K., Gulbrandsen, B., ... Zettel, C. C. (2017). Switching from originator infliximab to biosimilar CT-P13 compared with maintained treatment with originator infliximab (NOR-SWITCH): a 52-week, randomised, double-blind, non-inferiority trial. *The Lancet*, *389*(10086), 2304–2316. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30068-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30068-5)
- Joshi, V., Shivach, T., Yadav, N., & Rathore, A. S. (2014). Circular Dichroism Spectroscopy as a Tool for Monitoring Aggregation in Monoclonal Antibody Therapeutics. *Analytical Chemistry*, *86*(23), 11606–11613. <https://doi.org/10.1021/ac503140j>
- Kahook, M. Y., Liu, L., Ruzycki, P., Mandava, N., Carpenter, J. F., Petrash, J. M., & Ammar, D. A. (2010). High-molecular-weight aggregates in repackaged bevacizumab. *Retina*, *30*(6), 887–892. <https://doi.org/10.1097/IAE.0b013e3181d50cea>
- Kaltashov, I. A., Bobst, C. E., Pawlowski, J., & Wang, G. (2020). Mass spectrometry-based methods in characterization of the higher order structure of protein therapeutics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *184*, 113169. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113169>
- Kay, J. (2011). Biosimilars: a regulatory perspective from America. *Arthritis Research & Therapy*, *13*(3), 112. <https://doi.org/10.1186/ar3310>

## BIBLIOGRAFÍA

- Kholodenko, R. V., Kalinovsky, D. V., Doronin, I. I., Ponomarev, E. D., & Kholodenko, I. V. (2019). Antibody Fragments as Potential Biopharmaceuticals for Cancer Therapy: Success and Limitations. *Current Medicinal Chemistry*, 26(3), 396–426. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170817152554>
- KÖHLER, G., & MILSTEIN, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), 495–497. <https://doi.org/10.1038/256495a0>
- Kolhe, P., Holding, E., Lary, A., Chico, S., & Singh, S. K. (2010). Large-scale freezing of biologics: Understanding protein and solute concentration changes in a cryovessel - Part 2. *BioPharm International*, 23(7), 40–49. <https://www.biopharminternational.com/view/large-scale-freezing-biologics-understanding-protein-and-solute-concentration-changes-cryovessel-p-0>
- Koulov, A. (2019). Protein Stability and Characterization. In D. Crommelin, R. Sindelar, & B. Meibohm (Eds.), *Pharmaceutical Biotechnology* (pp. 33–56). Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-00710-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-00710-2_3)
- Krämer, I., Tredree, R., & Vulto, A. G. (2008). Points to consider in the evaluation of biopharmaceuticals. *European Journal Of Hospital Pharmacy-Science And Practice*, 14(1), 73–76. <https://lirias.kuleuven.be/1615285?limo=0>
- Kreitman, R. J. (2006). Immunotoxins for targeted cancer therapy. *The AAPS Journal*, 8(3), E532–E551. <https://doi.org/10.1208/aapsj080363>
- Kumru, O. S., Liu, J., Ji, J. A., Cheng, W., Wang, Y. J., Wang, T., Joshi, S. B., Middaugh, C. R., & Volkin, D. B. (2012). Compatibility, Physical Stability, and Characterization of an IgG4 Monoclonal Antibody After Dilution into Different Intravenous Administration Bags. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(10), 3636–3650. <https://doi.org/10.1002/jps.23224>
- Kurki, P., van Aerts, L., Wolff-Holz, E., Giezen, T., Skibeli, V., & Weise, M. (2017). Interchangeability of Biosimilars: A European Perspective. *BioDrugs*, 31(2), 83–91. <https://doi.org/10.1007/s40259-017-0210-0>



- Lagrán, Z. M. de, & Díaz-pérez, S. P. J. L. (2008). Adalimumab : la molécula y el proceso de obtención. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, *99*, 3–9. <https://www.actasdermo.org/es-adalimumab-molecula-el-proceso-obtencion-articulo-13125426>
- Laptoš, T., & Omersel, J. (2018). The importance of handling high-value biologicals: Physico-chemical instability and immunogenicity of monoclonal antibodies (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, *15*, 3161–3168. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.5821>
- le Basle, Y., Chennell, P., Tokhadze, N., Astier, A., & Sautou, V. (2020). Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *109*(1), 169–190. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.08.009>
- Le Guyader, G., Vieillard, V., Mouraud, S., Do, B., Marabelle, A., & Paul, M. (2020). Stability of nivolumab in its original vials after opening and handing in normal saline bag for intravenous infusion. *European Journal of Cancer*, *135*, 192–202. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2020.04.042>
- Lees, J. G., Miles, A. J., Wien, F., & Wallace, B. A. (2006). A reference database for circular dichroism spectroscopy covering fold and secondary structure space. *Bioinformatics*, *22*(16), 1955–1962. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl327>
- Lewis Phillips, G. D., Li, G., Dugger, D. L., Crocker, L. M., Parsons, K. L., Mai, E., Blättler, W. A., Lambert, J. M., Chari, R. V. J., Lutz, R. J., Wong, W. L. T., Jacobson, F. S., Koeppen, H., Schwall, R. H., Kenkare-Mitra, S. R., Spencer, S. D., & Sliwkowski, M. X. (2008). Targeting HER2-Positive Breast Cancer with Trastuzumab-DM1, an Antibody–Cytotoxic Drug Conjugate. *Cancer Research*, *68*(22), 9280–9290. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1776>
- Li, C. H., Nguyen, X., Narhi, L., Chemmalil, L., Towers, E., Muzammil, S., Gabrielson, J., & Jiang, Y. (2011). Applications of circular dichroism (CD) for structural analysis of proteins: qualification of near- and far-UV CD for protein higher order structural analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *100*(11), 4642–4654. <https://doi.org/10.1002/jps.22695>

## BIBLIOGRAFÍA

- Linderholm, A., & Chamow, S. M. (2014). Immunoglobulin Fc-fusion proteins part 2: Therapeutic uses and clinical development. *BioProcess International*, 12(10). <https://bioprocessintl.com/manufacturing/monoclonal-antibodies/immunoglobulin-fc-fusion-proteins-part-2-therapeutic-uses-clinical-development/>
- Liu, H., Gaza-Bulseco, G., Faldu, D., Chumsae, C., & Sun, J. (2008). Heterogeneity of Monoclonal Antibodies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(7), 2426–2447. <https://doi.org/10.1002/jps.21180>
- Liu, L., Braun, L. J., Wang, W., Randolph, T. W., & Carpenter, J. F. (2014). Freezing-Induced Perturbation of Tertiary Structure of a Monoclonal Antibody. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(7), 1979–1986. <https://doi.org/10.1002/jps.24013>
- Lonberg, N., Taylor, L. D., Harding, F. A., Trounstein, M., Higgins, K. M., Schramm, S. R., Kuo, C.-C., Mashayekh, R., Wymore, K., McCabe, J. G., Munoz-O'Regan, D., O'Donnell, S. L., Lapachet, E. S. G., Bengoechea, T., Fishwild, D. M., Carmack, C. E., Kay, R. M., & Huszar, D. (1994). Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature*, 368(6474), 856–859. <https://doi.org/10.1038/368856a0>
- Lorber, B., Fischer, F., Bailly, M., Roy, H., & Kern, D. (2012). Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 40(6), 372–382. <https://doi.org/10.1002/bmb.20644>
- Ltd, F. H.-L. R. (2008). *Biotechnology - new directions in medicine*.
- M. Pabari, R., Ryan, B., Ahmad, W., & Ramtoola, Z. (2013). Physical and Structural Stability of the Monoclonal Antibody, Trastuzumab (Herceptin®), Intravenous Solutions. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 14(2), 220–225. <https://doi.org/10.2174/138920113805219322>
- Malvern. (2011). *Dynamic light scattering: common terms defined*. <https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/Whitepapers/WP111214DLSTermsDefined>

- Matar, P. (2008). Biofármacos y Biosimilares-Riesgos y desafíos en los nuevos desarrollos. *Órgano De Difusión De La Sociedad Argentina De Hematología*, 12(2), 57–59.  
<http://www.sah.org.ar/docs/vol12n2.pdf#page=20%5Cnhttp://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol12.n2.57-59.pdf>
- McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G., & Chiswell, D. J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 348(6301), 552–554. <https://doi.org/10.1038/348552a0>
- McKeage, K. (2014). A Review of CT-P13: An Infliximab Biosimilar. *BioDrugs*, 28(3), 313–321. <https://doi.org/10.1007/s40259-014-0094-1>
- McKinnon, R. A., Cook, M., Liauw, W., Marabani, M., Marschner, I. C., Packer, N. H., & Prins, J. B. (2018). Biosimilarity and Interchangeability: Principles and Evidence: A Systematic Review. *BioDrugs*, 32(1), 27–52. <https://doi.org/10.1007/s40259-017-0256-z>
- Mirasol, F. (2021). Stability Testing of Protein Therapeutics Using DLS. *BioPharm International*, 34(4). <https://www.biopharminternational.com/view/stability-testing-of-protein-therapeutics-using-dls>
- Moorkens, E., Meuwissen, N., Huys, I., Declerck, P., Vulto, A. G., & Simoens, S. (2017). The Market of Biopharmaceutical Medicines: A Snapshot of a Diverse Industrial Landscape. *Frontiers in Pharmacology*, 8(JUN). <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00314>
- Moorkens, E., Vulto, A. G., Huys, I., Dylst, P., Godman, B., Keuerleber, S., Claus, B., Dimitrova, M., Petrova, G., Sović-Brkičić, L., Slabý, J., Šebesta, R., Laius, O., Karr, A., Beck, M., Martikainen, J. E., Selke, G. W., Spillane, S., McCullagh, L., ... Simoens, S. (2017). Policies for biosimilar uptake in Europe: An overview. *PLOS ONE*, 12(12), e0190147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190147>
- Morrison, S. L., Johnson, M. J., Herzenberg, L. A., & Oi, V. T. (1984). Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region

## BIBLIOGRAFÍA

- domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(21), 6851–6855.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.81.21.6851>
- Morrow, T., & Felcone, L. H. (2004). Defining the difference: What Makes Biologics Unique. *Biotechnology Healthcare*, 1(4), 24–29.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3564302/>
- MP Control. (2016). *¿Qué es la ICH (International Conference on Harmonisation)?*  
<http://www.mpcontrol.es/index.php/2016/10/17/que-es-la-ich-definicion/>
- Muhammed, Y. (2020). The best IgG subclass for the development of therapeutic monoclonal antibody drugs and their commercial production: a review. *Immunome Research*, 16, 1–12. <https://www.longdom.org/open-access/the-best-igg-subclass-for-the-development-of-therapeutic-monoclonal-antibody-drugs-and-their-commercial-production-a-review-53117.html>
- National Health Service-NHS. (2020). *A Standard Protocol Introduction for Deriving and Assessment of Stability Part 2 – Aseptic Preparations ( Biopharmaceuticals ) Incorporating Annex on Antibody Conjugates 4th Edition*.  
<https://www.sps.nhs.uk/wp-content/uploads/2020/08/Stability-Part-2-Biopharmaceuticals-v4-Aug-2020.pdf>
- Nejadnik, M. R., Randolph, T. W., Volkin, D. B., Schöneich, C., Carpenter, J. F., Crommelin, D. J. A., & Jiskoot, W. (2018). Postproduction Handling and Administration of Protein Pharmaceuticals and Potential Instability Issues. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 107(8), 2013–2019. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.04.005>
- Nobbmann, U., Connah, M., Fish, B., Varley, P., Gee, C., Mulot, S., Chen, J., Zhou, L., Lu, Y., Sheng, F., Yi, J., & Harding, S. E. (2007). Dynamic light scattering as a relative tool for assessing the molecular integrity and stability of monoclonal antibodies. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 24(1), 117–128.  
<https://doi.org/10.1080/02648725.2007.10648095>
- Noce, A. la, & Ernst, M. (2018). Switching from Reference to Biosimilar Products: An Overview of the European Approach and Real-World Experience So Far. *European*

- Medical Journal*, 3(September), 74–81. <https://emj.europeanmedical-group.com/wp-content/uploads/sites/2/2018/09/Switching-from-Reference....pdf>
- Parr, M. K., Montacir, O., & Montacir, H. (2016). Physicochemical characterization of biopharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 130, 366–389. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.05.028>
- Parray, H. A., Shukla, S., Samal, S., Shrivastava, T., Ahmed, S., Sharma, C., & Kumar, R. (2020). Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives. *International Immunopharmacology*, 85(April), 106639. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106639>
- Pérez Robles, R. (2020). *Analytical strategies for the structural characterization of monoclonal antibodies and fusion proteins using mass spectrometry*. <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/59769/67767.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
- Pérez-Robles, R., Cuadros-Rodríguez, L., Salmerón-García, A., Cabeza-Barrera, J., & Navas, N. (2020). Intact charge variant analysis of ziv-aflibercept by cationic exchange liquid chromatography as a proof of concept: Comparison between volatile and non-volatile salts in the mobile phase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 185.
- Provencher, S. W., & Gloeckner, J. (1981). Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry*, 20(1), 33–37. <https://doi.org/10.1021/bi00504a006>
- Przepiorka, D., Ko, C.-W., Deisseroth, A., Yancey, C. L., Candau-Chacon, R., Chiu, H.-J., Gehrke, B. J., Gomez-Broughton, C., Kane, R. C., Kirshner, S., Mehrotra, N., Ricks, T. K., Schmiel, D., Song, P., Zhao, P., Zhou, Q., Farrell, A. T., & Pazdur, R. (2015). FDA Approval: Blinatumomab. *Clinical Cancer Research*, 21(18), 4035–4039. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0612>
- Qi, P., Volkin, D. B., Zhao, H., Nedved, M. L., Hughes, R., Bass, R., Yi, S. C., Panek, M. E., Wang, D., DalMonte, P., & Bond, M. D. (2009). Characterization of the

## BIBLIOGRAFÍA

- photodegradation of a human IgG1 monoclonal antibody formulated as a high-concentration liquid dosage form. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(9), 3117–3130. <https://doi.org/10.1002/jps.21617>
- Rabinovich, G. A., Gabrilovich, D., & Sotomayor, E. M. (2007). Immunosuppressive Strategies that are Mediated by Tumor Cells. *Annual Review of Immunology*, 25(1), 267–296. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141609>
- Rath, T., Baker, K., Dumont, J. A., Peters, R. T., Jiang, H., Qiao, S.-W., Lencer, W. I., Pierce, G. F., & Blumberg, R. S. (2015). Fc-fusion proteins and FcRn: structural insights for longer-lasting and more effective therapeutics. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(2), 235–254. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.834293>
- Rathore, A. S., & Winkle, H. (2009). Quality by design for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology*, 27(1), 26–34. <https://doi.org/10.1038/nbt0109-26>
- Rech, J., Fradkin, A., Krueger, A., Kraft, C., & Paskiet, D. (2020). Evaluation of Particle Techniques for the Characterization of Subvisible Particles From Elastomeric Closure Components. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109(5), 1725–1735. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.01.026>
- Reichert, J. M. (2012). Marketed therapeutic antibodies compendium. *MAbs*, 4(3), 413–415. <https://doi.org/10.4161/mabs.19931>
- Revers, L., & Furczon, E. (2010). An Introduction to Biologics and Biosimilars. Part II: Subsequent Entry Biologics: Biosame or Biodifferent? *Canadian Pharmacists Journal / Revue Des Pharmaciens Du Canada*, 143(4), 184–191. <https://doi.org/10.3821/1913-701X-143.4.184>
- Rios, M. (2015). Special Report on Product Stability Testing: Developing Methods for New Biologics and Emerging Markets. *BioProcess International*. <https://bioprocessintl.com/manufacturing/formulation/special-report-on-product-stability-testing-developing-methods-for-new-biologics-and-emerging-markets/>

- Roberts, C. J. (2014). Therapeutic protein aggregation: mechanisms, design, and control. *Trends in Biotechnology*, 32(7), 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.05.005>
- Rodríguez Cumplido, D., & Asensio Ostos, C. (2018). Fármacos biológicos y biosimilares: aclarando conceptos. *Atención Primaria*, 50(6), 323–324. <https://doi.org/10.1016/j.aprim.2018.01.002>
- Royer, C. A., Mann, C. J., & Matthews, C. R. (1993). Resolution of the fluorescence equilibrium unfolding profile of trp aporepressor using single tryptophan mutants. *Protein Science*, 2(11), 1844–1852. <https://doi.org/10.1002/pro.5560021106>
- Ruiz, G., Moreno, M., López, M., & Vega, M. (2008). *Anticuerpos monoclonales terapéuticos. Informe de vigilancia Tecnológica*. Fundación Española para el Desarrollo de la Investigación en Genómica. <https://books.google.es/books?id=HXAYQwAACAAJ>
- Samanen, J. (2013). Similarities and differences in the discovery and use of biopharmaceuticals and small-molecule chemotherapeutics. In R. Ganellin, S. Roberts, & R. Jefferis (Eds.), *Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development* (pp. 161–203). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397176-0.00005-4>
- Sautou, V., Bossard, D., Chedru-Legros, V., Crauste-Manciet, S., Fleury-Souverain, S., Lagarce, F., Odou, P., Roy, S., & Sadeghipour, F. (2013). *Methodological guidelines for stability studies of hospital pharmaceutical preparations* (1st Editio). Société Française de Pharmacie Clinique and Groupe d’Evaluation et de Recherche sur la Protection en Atmosphère Contrôlée. [https://www.gerpac.eu/IMG/pdf/guide\\_stabilite\\_anglais.pdf](https://www.gerpac.eu/IMG/pdf/guide_stabilite_anglais.pdf)
- Sekhon, B., & Saluja, V. (2011). Biosimilars: an overview. *Biosimilars*, 1, 1–11. <https://doi.org/10.2147/BS.S16120>
- Simoens, S. (2011). Biosimilar medicines and cost-effectiveness. *ClinicoEconomics and Outcomes Research*, 3(1), 29–36. <https://doi.org/10.2147/CEOR.S12494>

## BIBLIOGRAFÍA

- Simoens, S., Jacobs, I., Popovian, R., Isakov, L., & Shane, L. G. (2017). Assessing the Value of Biosimilars: A Review of the Role of Budget Impact Analysis. *PharmacoEconomics*, 35(10), 1047–1062. <https://doi.org/10.1007/s40273-017-0529-x>
- Sindelar, R. D. (2019). Dispensing Biotechnology Products: Handling, Professional Education, and Product Information. In *Pharmaceutical Biotechnology* (pp. 239–251). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-00710-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-00710-2_10)
- Singla, A., Bansal, R., Joshi, V., & Rathore, A. S. (2016). Aggregation Kinetics for IgG1-Based Monoclonal Antibody Therapeutics. *The AAPS Journal*, 18(3), 689–702. <https://doi.org/10.1208/s12248-016-9887-0>
- Smith, S. (1996). Ten years of Orthoclone OKT3 (muromonab-CD3): a review. *Journal of Transplant Coordination*, 6(3), 109–121. <https://doi.org/10.7182/prtr.1.6.3.8145l3u185493182>
- Sreedhara, A., Glover, Z. K., Piros, N., Xiao, N., Patel, A., & Kabakoff, B. (2012). Stability of IgG1 monoclonal antibodies in intravenous infusion bags under clinical in-use conditions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(1), 21–30. <https://doi.org/10.1002/jps.22739>
- Sreerama, N., Venyaminov, S. Y., & Woody, R. W. (2000). Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Inclusion of Denatured Proteins with Native Proteins in the Analysis. *Analytical Biochemistry*, 287(2), 243–251. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4879>
- Sreerama, N., & Woody, R. W. (1993). A Self-Consistent Method for the Analysis of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism. *Analytical Biochemistry*, 209(1), 32–44. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1079>
- Sreerama, N., & Woody, R. W. (2000). Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. *Analytical Biochemistry*, 287(2), 252–260. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4880>



- Stanfield, R. L., & Wilson, I. A. (2009). Antibody Molecular Structure. In Z. An (Ed.), *Therapeutic Monoclonal Antibodies* (pp. 51–66). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470485408.ch2>
- Stetefeld, J., McKenna, S. A., & Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, *8*(4), 409–427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>
- Strohl, W. R., & Strohl, L. M. (Eds.). (2012a). Introduction to biologics and monoclonal antibodies. In *Therapeutic Antibody Engineering* (pp. 1–595). Woodhead Publishing Series in Biomedicine. <https://doi.org/10.1533/9781908818096.1>
- Strohl, W. R., & Strohl, L. M. (Eds.). (2012b). Monoclonal antibody targets and mechanisms of action. In *Therapeutic Antibody Engineering* (pp. 163–595). Woodhead Publishing Series in Biomedicine. <https://doi.org/10.1533/9781908818096.163>
- Suárez, I., Salmerón-García, A., Cabeza, J., Capitán-Vallvey, L. F., & Navas, N. (2016). Development and use of specific ELISA methods for quantifying the biological activity of bevacizumab, cetuximab and trastuzumab in stability studies. *Journal of Chromatography B*, *1032*, 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.05.045>
- Thiagarajan, G., Semple, A., James, J. K., Cheung, J. K., & Shameem, M. (2016). A comparison of biophysical characterization techniques in predicting monoclonal antibody stability. *MAbs*, *8*(6), 1088–1097. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1189048>
- Tokhadze, N., Chennell, P., Le Basle, Y., & Sautou, V. (2018). Stability of infliximab solutions in different temperature and dilution conditions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *150*, 386–395. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.12.012>
- Tweehuysen, L., van den Bemt, B. J. F., van Ingen, I. L., de Jong, A. J. L., van der Laan, W. H., van den Hoogen, F. H. J., & den Broeder, A. A. (2018). Subjective Complaints as the Main Reason for Biosimilar Discontinuation After Open-Label Transition From

## BIBLIOGRAFÍA

- Reference Infliximab to Biosimilar Infliximab. *Arthritis and Rheumatology*, 70(1), 60–68. <https://doi.org/10.1002/art.40324>
- Vigneron, J. (2017). Stability Studies: A Scientific Mission of the Hospital Pharmacist. *Pharmaceutical Technology in Hospital Pharmacy*, 2(4), 143–144. <https://doi.org/10.1515/pthp-2017-0032>
- Vivian, J. T., & Callis, P. R. (2001). Mechanisms of Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins. *Biophysical Journal*, 80(5), 2093–2109. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)76183-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)76183-8)
- Vulto, A. G., & Jaquez, O. A. (2017). The process defines the product: what really matters in biosimilar design and production? *Rheumatology*, 56(suppl\_4), iv14–iv29. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex278>
- Wang, W. (2005). Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *International Journal of Pharmaceutics*, 289(1–2), 1–30. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.11.014>
- Wang, X., An, Z., Luo, W., Xia, N., & Zhao, Q. (2018). Molecular and functional analysis of monoclonal antibodies in support of biologics development. *Protein & Cell*, 9(1), 74–85. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0447-x>
- Waters, R., & Urquhart, L. (2019). World Preview 2019, Outlook to 2024. In *Evaluate Pharma* (Issue 12th Edition, June). [https://info.evaluate.com/rs/607-YGS-364/images/EvaluatePharma\\_World\\_Preview\\_2019.pdf](https://info.evaluate.com/rs/607-YGS-364/images/EvaluatePharma_World_Preview_2019.pdf)
- Watson, R. (2006). European Medicines Agency gives favourable ruling on NSAIDs. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 333(7574), 873. <https://doi.org/10.1136/bmj.333.7574.873-a>
- Whitmore, L., & Wallace, B. A. (2004). DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Research*, 32(Web Server), W668–W673. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh371>

- Whitmore, L., & Wallace, B. A. (2008). Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers*, *89*(5), 392–400. <https://doi.org/10.1002/bip.20853>
- World Health Organization-WHO. (2009). *Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs)*. [https://www.who.int/biologicals/areas/biological\\_therapeutics/BIOTHERAPEUTIC\\_S\\_FOR\\_WEB\\_22APRIL2010.pdf](https://www.who.int/biologicals/areas/biological_therapeutics/BIOTHERAPEUTIC_S_FOR_WEB_22APRIL2010.pdf)
- World Health Organization-WHO. (2013). *Guidelines on the quality, safety and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology*. [https://www.who.int/biologicals/biotherapeutics/rDNA\\_DB\\_final\\_19\\_Nov\\_2013.pdf?ua=1](https://www.who.int/biologicals/biotherapeutics/rDNA_DB_final_19_Nov_2013.pdf?ua=1)
- Zhang, A., Qi, W., Singh, S. K., & Fernandez, E. J. (2011). A New Approach to Explore the Impact of Freeze-Thaw Cycling on Protein Structure: Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry (HX-MS). *Pharmaceutical Research*, *28*(5), 1179–1193. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0383-z>
- Zhang, A., Singh, S. K., Shirts, M. R., Kumar, S., & Fernandez, E. J. (2012). Distinct Aggregation Mechanisms of Monoclonal Antibody Under Thermal and Freeze-Thaw Stresses Revealed by Hydrogen Exchange. *Pharmaceutical Research*, *29*(1), 236–250. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0538-y>
- Zhang, Y., Vermeulen, L. C., & Kolesar, J. M. (2013). Stability of stock and diluted rituximab. *American Journal of Health-System Pharmacy*, *70*(5), 436–438. <https://doi.org/10.2146/ajhp120035>
- Zhou, Y., & Marks, J. D. (2016). Mechanism of Action for Therapeutic Antibodies. In *Biosimilars of Monoclonal Antibodies* (pp. 85–111). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118940648.ch3>





