

TESIS DOCTORAL

UNIVERSIDAD DE GRANADA



NUEVAS APLICACIONES ANALÍTICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE MEDICAMENTOS BASADOS EN ANTICUERPOS MONOCLONALES. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD EN EL TIEMPO EN CONDICIONES HOSPITALARIAS

Programa de Doctorado en Farmacia

Universidad de Granada

Antonio Martínez Ortega

Granada, 2022

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Antonio Martínez Ortega
ISBN: 978-84-1117-260-8
URI: <http://hdl.handle.net/10481/73619>

**NUEVAS APLICACIONES ANALÍTICAS PARA LA
CARACTERIZACIÓN DE MEDICAMENTOS BASADOS EN
ANTICUERPOS MONOCLONALES. ESTUDIOS DE
ESTABILIDAD EN EL TIEMPO EN CONDICIONES
HOSPITALARIAS**

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor en Farmacia por la
Universidad de Granada por:

D. Antonio Martínez Ortega

Licenciado en Farmacia Y Licenciado en Tecnología de los Alimentos
Universidad de Granada.

Directora:

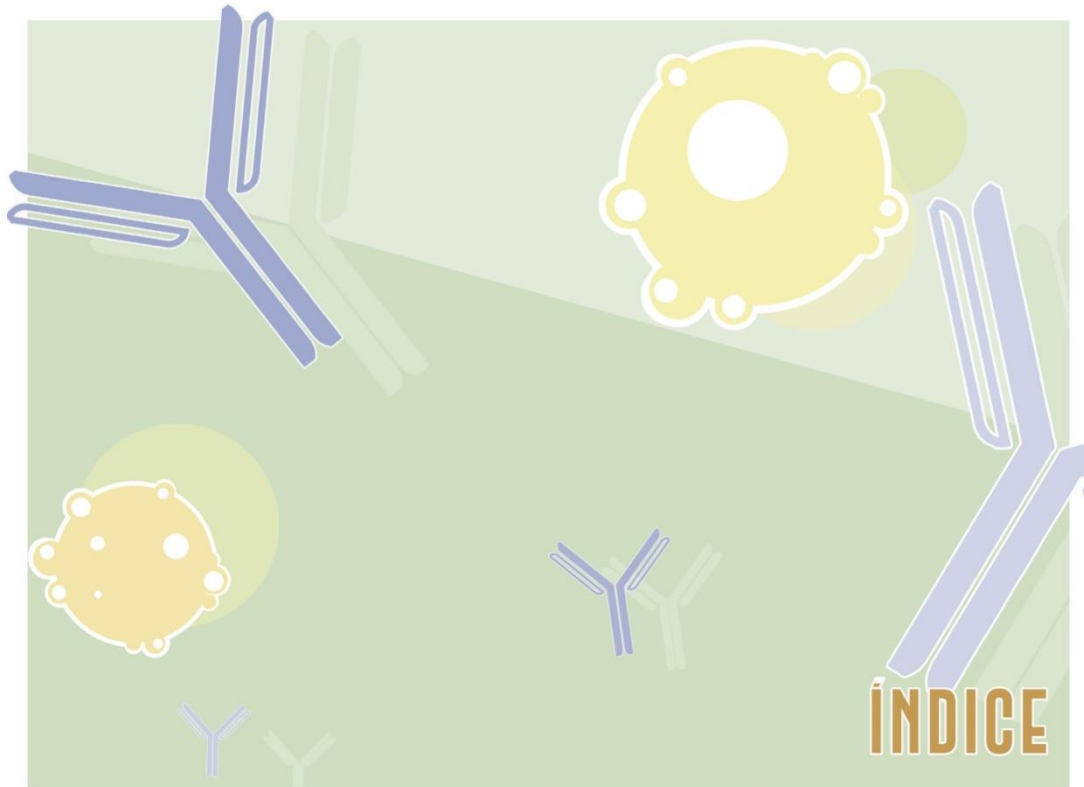
D^a Natalia África Navas Iglesias

Profesora Titular, Departamento de Química Analítica,
Facultad de Ciencias, Universidad de Granada.

Adscrita al Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (ibs.Granada).

*Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto y pensar lo que nadie más ha
pensado.*

Albert Szent-Györgyi



Índice

Acrónimos.....	17
Hipótesis y Objetivos.....	23
Resumen.....	29
Introducción.....	35
1. Medicamentos Biotecnológicos	35
1.1. Definición.....	35
1.2. Características de los medicamentos biotecnológicos. Diferencias con los medicamentos de síntesis química	36
2. Anticuerpos Monoclonales Terapéuticos	39
2.1. Estructura	41
2.2. Nomenclatura	47
2.3. Producción de mAbs. Datos económicos	48
3. Evaluación de Medicamentos Biotecnológicos. Guías ICH	53
3.1. Atributos críticos de la calidad, CQAs (ICH Q8 (R2))	56
3.1.1. <i>Contenido proteico</i>	58
3.1.2. <i>Variantes de carga</i>	58
3.2. Perfil indicador de estabilidad. Estudios de degradación forzada CH Q5C e ICH Q2(R1)	63
3.3. Estudios de estabilidad en condiciones de uso hospitalario. ICH Q5C e ICH Q6B.....	65

4. Técnicas Analíticas para el Análisis y Caracterización de mAbs.....	68
4.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	69
4.1.1. <i>Cromatografía en fase inversa (RPC)</i>	70
4.1.2. <i>Cromatografía de intercambio iónico (IEX)</i>	73
5. Anticuerpos Monoclonales Estudiados	78
5.1. Bevacizumab	78
5.1.1. <i>Características y mecanismo de acción</i>	78
5.1.2. <i>Medicamento: forma farmacéutica y composición</i>	79
5.1.3. <i>Indicaciones terapéuticas</i>	80
5.2. Cetuximab.....	80
5.2.1. <i>Características y mecanismo de acción</i>	80
5.2.2. <i>Medicamento: forma farmacéutica y composición</i>	81
5.2.3. <i>Indicaciones terapéuticas</i>	82
5.3. Infliximab.....	82
5.3.1. <i>Características y mecanismo de acción</i>	82
5.3.2. <i>Medicamento: forma farmacéutica y composición</i>	84
5.3.3. <i>Indicaciones terapéuticas</i>	85
5.4. Rituximab.....	85
5.4.1. <i>Características y mecanismo de acción</i>	85
5.4.2. <i>Medicamento: forma farmacéutica y composición</i>	86
5.4.3. <i>Indicaciones terapéuticas</i>	87
5.5. Trastuzumab.....	88

5.5.1. <i>Características y mecanismo de acción</i>	88
5.5.2. <i>Medicamento: forma farmacéutica y composición</i>	89
5.5.3. <i>Indicaciones terapéuticas</i>	90
Bibliografía	91
PARTE EXPERIMENTAL	106
Capítulo 1	
Materiales, Instrumentación y Metodología	109
1.1. Disolventes, reactivos y disoluciones.....	109
1.2. Medicamentos biotecnológicos y sus preparaciones farmacéuticas	112
1.3. Material de laboratorio.....	116
1.4. Instrumentación analítica	117
1.5. Softwares.....	118
1.6. Estudios de degradación forzada (estrés) de los medicamentos biotecnológicos	118
1.7. Validación de los métodos analíticos	120
1.8. Estudios de estabilidad en el tiempo.....	121
Capítulo 2	
Study and ICH validation of a reverse-phase liquid chromatographic method for the quantification of the intact monoclonal antibody cetuximab	123
2.1. Introducción al Capítulo 2.....	125
2.2. Publicación editada	127
2.3. Conclusiones	153

Capítulo 3

Validated reverse phase HPLC diode array method for the quantification of intact bevacizumab, infliximab and trastuzumad for long-term stability study	155
3.1. Introducción al Capítulo 3.....	157
3.2. Publicación editada.	159
3.3. Conclusiones	192

Capítulo 4

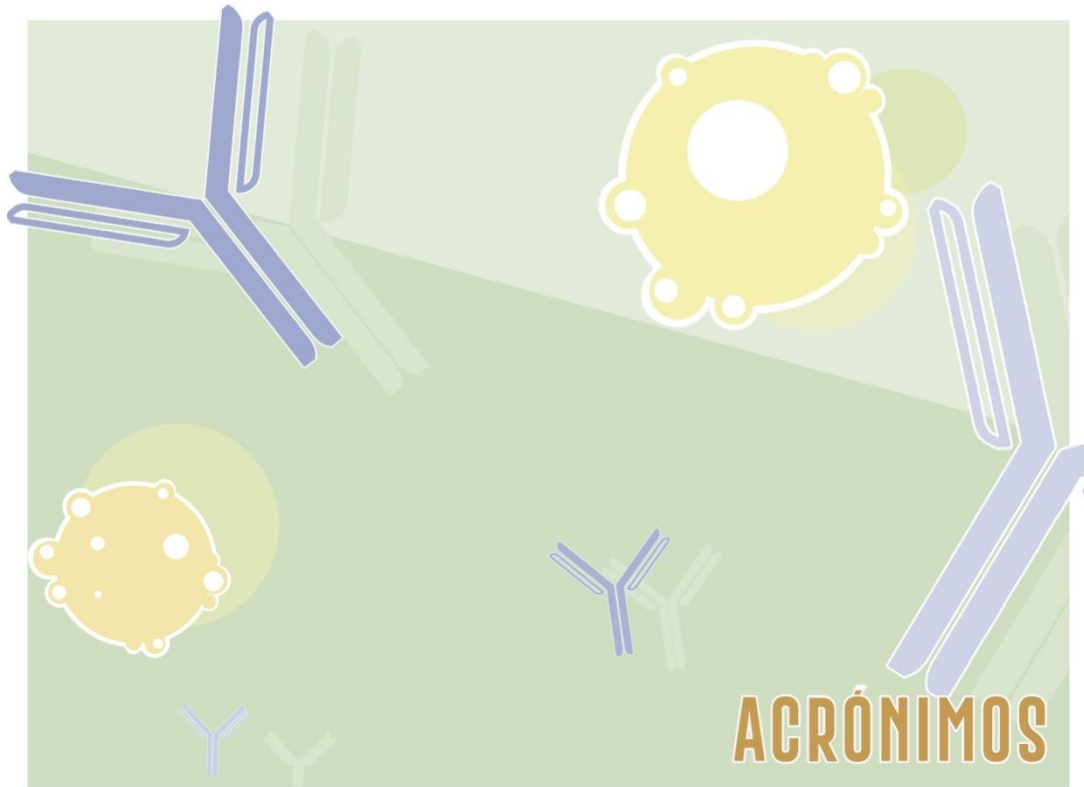
Degradation and in-use stability study of five marketed therapeutic monoclonal antibodies by generic weak cation exchange liquid chromatographic method ((WCX)HPLC/DAD).....	195
4.1. Introducción al Capítulo 4.....	197
4.2. Publicación editada.	199
4.3. Conclusiones	231

Conclusiones finales.....	233
----------------------------------	------------

Comunicaciones y Publicaciones a Congresos	239
---	------------

Anexo. Publicación Científica preliminar a la Tesis

Quantification of an intact monoclonal antibody, rituximab, by (RP)HPLC/DAD in compliance with ICH guidelines.....	243
---	------------



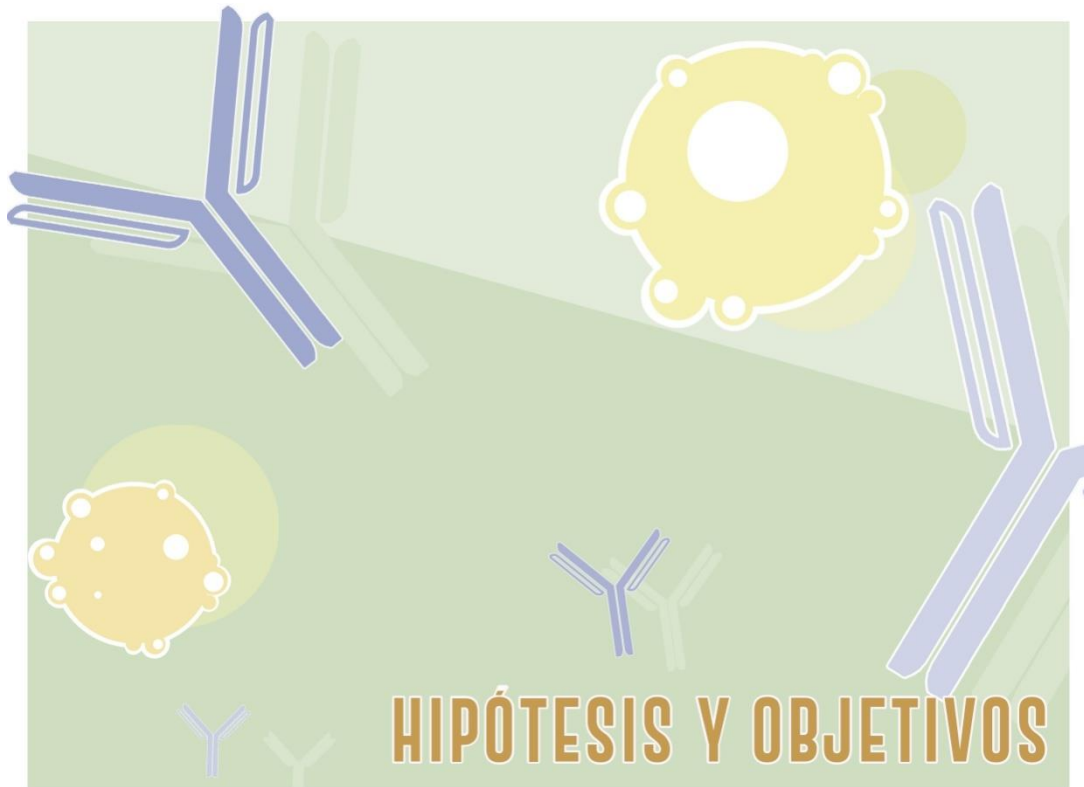


Acrónimos

ADAs	<i>Anti-drug antibodies</i>
ADC	<i>Antibody Drug Conjugate</i>
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
AEX	Cromatografía de Intercambio aniónico (<i>Anion Exchange Chromatography</i>)
Asn	Asparragina
Asp	Aspartato o ácido aspártico
BiTes	Fragmentos de anticuerpo biespecíficos (<i>Bi-specific T-cell engagers</i>)
BLA	<i>Biologics License Application</i>
BVZ	Bevacizumab
CDC	Citotoxicidad Dependiente del Complemento (<i>Complement-Dependent Cytotoxicity</i>)
CDR	Regiones Determinantes de Complementariedad (<i>Complementary determining región</i>).
CE	Electroforesis Capilar (<i>Capillary electrophoresis</i>)
CEX	Cromatografía de intercambio catiónico (<i>Cation Exchange Chromatography</i>)
C _H ¹	Primer dominio de las cadenas pesadas
C _H ²	Segundo dominio de las cadenas pesadas
C _H ³	Tercer dominio de las cadenas pesadas
CHMP	Comité de medicamentos de uso humano (<i>Committee for Human Medicinal Products</i>)
CHO	Ovario de Hámster chino (<i>Chinese hamster ovary</i>)
cIEF	Electroforesis capilar por Isoelectroenfoque (<i>Capillary Isoelectric Focusing electrophoresis</i>)
CQA	Atributos Críticos de Calidad (<i>Critical Quality Attribute</i>)
CTX	Cetuximab
DAD	Detector Diodo Array (<i>Diode Array Detector</i>)
DC	Dicroísmo Circular

DLS	Dispersión Dinámica de la Luz (<i>Dinamic Light Scattering</i>)
EAI	Enfermedad autoinmune
EDQM	Departamento Europeo de control de medicamentos
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
EMA	Agencia Europea del Medicamento
Fab	Región variable de los mAbs (<i>antigen binding Fragment</i>)
FACS	Clasificación de Células Activadas por Fluorescencia (<i>Fluorescence activated cell sorting</i>)
Fc	Región constante de los mAbs (<i>Crystallizable Fragment</i>)
FC	Citometría de Flujo (<i>Flow cytometry</i>)
FcRs	Receptores de Fc
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato o ácido glutámico
HAMA	Anti-murine inmunoglobulin antibody o <i>Human anti-mouse antibody</i>
HPLC	Cromatografía líquida de altas eficacia (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IEF	Electroforesis por Isoelectroenfoque (<i>Isoelectric Focusing Electrophoresis</i>)
INF	Infliximab
IgA	Inmunoglobulina A
IgE	Inmunoglobulina E
IgD	Inmunoglobulina D
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
INN	<i>International Nonproprietary Name</i>
Iso-Asp	Isoaspartato
IT-FS	Espectroscopia de Fluorescencia Intrínseca de Triptófano (<i>Intrinsic Tryptofan Fluorescence Spectroscopy</i>)
K	Kappa
kDa	Kilodalton
λ	Lambda

Lys	Lisina
MAA	<i>Marketing Authorisation Applications</i>
mAb	Anticuerpo Monoclonal (<i>Monoclonal Antibody</i>).
Met	Metionina
MS	Espectrometría de Masas (<i>Mass Spectrometry</i>),
NHS	<i>United Kingdom National Health Service</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
pAbs	Anticuerpo policlonal
pl	Punto isoeléctrico
PTMs	Modificaciones Postraduccionales (<i>Post-translational modifications</i>)
pyroE	Piroglutamato (<i>Pyroglutamate</i>)
QTPP	perfil de calidad de los productos biofarmacéuticos (<i>Quality Target Product Profile</i>)
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RPC	Cromatografía en Fase Inversa
(RP)HPLC	Cromatografía líquida en fase inversa
RT	Tiempo de retención (<i>Retention time</i>)
RTX	Rituximab
TFA	Ácido trifluoracético
TPP	perfil objetivo del producto (<i>Target Product Profile</i>)
TTZ	Trastuzumab
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
V _H	dominio variable: cadena pesada
V _L	dominio variable: cadena ligera



Hipótesis y Objetivos

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) son actualmente un grupo de proteínas terapéuticas clave en el tratamiento de un gran número de enfermedades oncológicas, crónicas y autoinmunes, con su principal aplicación en el ámbito hospitalario. Estos medicamentos biotecnológicos, debido a su gran coste, son los que mayor impacto económico ejercen sobre el sistema sanitario global. Los estudios de estabilidad que se implantan para este tipo de fármacos se realizan para cumplir los requisitos de fabricación y comercialización por parte de la industria farmacéutica. Su estabilidad en condiciones de uso hospitalario establece ventanas de estabilidad muy ajustadas para el uso de los mismos, generalmente de no más de 24 horas, una vez abiertos los correspondientes contenedores. La administración de este tipo de medicamentos se realiza por peso del paciente, por lo que se genera un volumen importante de excedentes en los hospitales que terminan desechados en lugar de reutilizarse, generalmente por falta de estudios de estabilidad relevantes que evidencien su plena eficacia y seguridad, y que finalmente no se llevan a cabo por la complejidad a la hora de evaluar la estabilidad de estas complejas proteínas.

Para estos estudios de estabilidad se requiere, entre otros, disponer de métodos analíticos adecuados que permitan analizar los mAbs en presencia de sus posibles productos de degradación. Por ello, la hipótesis de partida consiste en el desarrollo de nuevos métodos analíticos que permitan evaluar atributos críticos de la calidad de estos biofármacos para abordar con rigurosidad estudios de estabilidad en el tiempo en condiciones de uso hospitalario. De esta manera, se podrá disponer de datos de estabilidad de estos medicamentos biotecnológicos y de sus preparaciones farmacéuticas de uso clínico que contribuyan a la toma de decisiones sobre la reutilización de sus excedentes con total seguridad y eficacia para el paciente, contribuyendo así a la sostenibilidad de los sistemas públicos de salud.

En base a la anterior hipótesis, se plantean los siguientes objetivos generales y específicos:

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es el desarrollo y validación de métodos de análisis como indicadores de la estabilidad de 5 de los mAbs más empleados a nivel nacional y mundial, que son: bevacizumab (Avastin®), cetuximab (Erbix®), infliximab (Remicade®), rituximab (MabThera®) y trastuzumab (Herceptin®); para evaluar dos atributos críticos de la calidad: la determinación del contenido del propio mAb y el análisis de las variantes de carga de los mismos, de manera que, una vez bien establecidos estos métodos de análisis, puedan ser aplicados en estudios de estabilidad en el tiempo de los propios medicamentos y de sus preparaciones farmacéuticas de uso clínico.

Es también objetivo general validar los métodos como indicadores de la estabilidad siguiendo las recomendaciones de organismos internacionales de amplio consenso sobre regulación de medicamentos de uso humano, como lo son las guías de la *Internacional Conference of Harmonization*, conocidas como guías ICH.

Todo esto permitirá conocer pautas de degradación de dichos biofármacos, contribuyendo así a determinar sus mejores condiciones de almacenamiento y su potencial reutilización de forma segura y eficaz para el paciente.

Estos objetivos generales se concretan en los siguientes objetivos específicos:

- Puesta a punto de métodos de análisis basados en cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa y detección con diodos en fila ((RP)HPLC/DAD) para la cuantificación del contenido de bevacizumab (Avastin®), cetuximab (Erbix®), infliximab (Remicade®) y trastuzumab (Herceptin®).
- Validar dichos métodos de (RP)HPLC/DAD como indicadores de la estabilidad para la determinación de los mAbs analizados aplicando las recomendaciones de la ICH, por tanto será objetivo la realización específica de estudios de degradación acelerada *ad hoc* de los 4 mAbs en sus medicamentos innovadores, con el doble objetivo de validar el propio método de análisis y conocer la estabilidad de cada mAb en su medicamento frente

a condiciones ambientales agresivas, proponiendo a su vez posibles vías de degradación.

- Evaluar la estabilidad en el tiempo, en cuanto a contenido de principio activo, de los sobrantes de los medicamentos biotecnológicos Avastin® (bevacizumab), Erbitux® (cetuximab), Remicade® (infiximab) y Herceptin® (tratuzumab) y de sus preparaciones farmacéuticas de uso clínico, almacenados en condiciones hospitalarias habituales.
- Puesta a punto de un único método de análisis basados en cromatografía líquida de alta eficacia de cambio catiónico débil con detección por diodos en fila ((WCX)HPLC/DAD) para el análisis de las variantes de carga de los 5 mAbs propuestos para su estudio: bevacizumab (Avastin®), cetuximab (Erbitux®), infiximab (Remicade®), rituximab (MabThera®) y tratuzumab (Herceptin®).
- Validar dicho método de (WCX)HPLC/DAD como indicador de la estabilidad de las variantes de carga de los mAbs analizados aplicando las recomendaciones de la ICH, por tanto será objetivo la realización específica de estudios de degradación acelerada *ad hoc* de los 5 mAbs en sus medicamentos innovadores, con el doble objetivo de validar el propio método de análisis y conocer la estabilidad del mAb en su propio medicamento frente a condiciones ambientales agresivas, proponiendo a su vez posibles vías de degradación.
- Evaluar la estabilidad en el tiempo, en cuanto a modificación de las variantes de carga de los mAbs, de los sobrantes de los medicamentos biotecnológicos Avastin® (bevacizumab), Erbitux® (cetuximab), Remicade® (infiximab), MabThera® (rituximab) y Herceptin® (tratuzumab) y de sus preparaciones farmacéuticas de uso clínico, almacenados en condiciones hospitalarias habituales.
- Aportar datos de estabilidad en el tiempo en condiciones hospitalarias de los 5 medicamentos y sus preparaciones clínicas estudiadas que proporcionen

información relevante para la toma de decisiones sobre la reutilización de los sobrantes de estos medicamentos en condiciones de total seguridad y eficacia para el paciente, así como proporcionar información sobre su estabilidad frente a posibles degradaciones ambientales.

Los objetivos de esta Tesis Doctoral se enmarcan dentro de la línea de investigación “Estudio de la estabilidad de medicamentos proteicos en condiciones de uso clínico” (FQM-118 e ibs.Granada TEC01); concretamente, dentro de los objetivos de dos proyectos financiados por el Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades; Fondos de Investigación en Salud): FIS PI010-00201 “*Estudio formal y propuesta de validación del perfil indicador de la estabilidad de medicamentos de naturaleza biotecnológica (y química) en condiciones normales de uso hospitalario*” (2011-2014) y FIS PI17-00547 “*Estudios de estabilidad en el tiempo de sobrantes de medicamentos biotecnológicos - anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión-. Estudios conformacionales comprensivos*” (2018-2023). En estos proyectos se propone el estudio de la estabilidad en el tiempo de excedentes de este tipo de medicamentos biotecnológicos, seleccionándose aquellos cuyo impacto en la factura económica del sistema sanitario es elevado. Para ello se requiere previamente el desarrollo y propuesta del perfil indicador de estabilidad de estos medicamentos biotecnológicos, es decir, el conjunto de métodos y estrategias que permiten abordar un análisis integral y comprensivo de los mismos, tal y como indican organismos reguladores internacionales de medicamentos de uso humano.



Resumen y Coherencia entre Capítulos

En esta Tesis Doctoral se han desarrollado y puesto a punto varias metodologías analíticas para la evaluación de diferentes aspectos que afectan a la calidad de cinco medicamentos biotecnológicos cuyos principios activos son mAbs terapéuticos, mediante la utilización de dos modos de la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia: la cromatografía líquida en fase inversa ((RP)HPLC) y la cromatografía líquida de intercambio catiónico débil ((WCX)HPLC), ambas acopladas a detectores tipo DAD (*Diodo Array Detection*) de absorción UV/Visible. Para alcanzar los objetivos propuestos se han llevado a cabo tres amplios estudios experimentales, dos empleando (RP)HPLC y el tercero utilizando la técnica (WCX)HPLC, siguiendo las recomendaciones de las guías ICHs para su validación como métodos indicadores de estabilidad de los mAbs analizados.

La metodología empleada en la realización de los dos primeros trabajos incluidos en esta Memoria -presentados en el **Capítulo 2** y **Capítulo 3**, se basa en la investigación iniciada en un trabajo previo publicado por nuestro grupo de investigación, del cual soy autor, y cuyo título es: *Quantification of an intact monoclonal antibody, rituximab, by (RP)HPLC/DAD in compliance with ICH guidelines* (**Autores:** Natalia Navas, Agustín Herrera, Antonio Martínez-Ortega, Antonio Salmerón-García, José Cabeza, Luis Cuadros-Rodríguez; **Volumen:** 405; **Páginas:** 9351–9363; **Año de publicación:** 2013; **DOI:** 10.1007/s00216-013-7368-1; **Revista:** Analytical and Bioanalytical Chemistry; **Categoría Journal Citation Reports (JCR):** Chemistry, Analytical, Q1; **Índice de impacto (2013) (JCR):** 3.578; **Posición:** 11/76, incluido en esta Memoria en la sección de Anexo. Publicación Científica preliminar a la Tesis). Este trabajo representó el primer método publicado para la cuantificación de un anticuerpo monoclonal terapéutico optimizado y validado como método indicador de la estabilidad según las recomendaciones de la ICH. Fue elegido el rituximab como caso de estudio y, dados los buenos resultados obtenidos, se procedió a la puesta a punto de métodos de análisis basados en él, para la cuantificación de otros cuatro mAbs de amplio consumo a nivel mundial, los

cuales eran objeto de estudio en el marco del proyecto FIS-PI10-00201. La metodología que se desarrolla y valida en el tercer trabajo experimental, presentada en el **Capítulo 4**, tiene como objetivo la puesta a punto de un único método que permita el análisis del perfil de variantes de carga de los cinco anticuerpos estudiados en esta memoria, y que forma parte de los objetivos del proyecto FIS-PI10-00201 (anteriormente indicado) y del PI17-00547.

En cuanto a los medicamentos seleccionados para su estudio, indicar que se encuentran entre los 15 medicamentos más vendidos en los últimos años a nivel mundial y constituyen la base para el tratamiento de enfermedades de gran prevalencia como el cáncer o enfermedades autoinmunes. Dada la imposibilidad de acceder a patrones comercializados de los mismos (no existen como tales), y para garantizar la integridad de estas complejas proteínas en la puesta a punto de los métodos de análisis, todos los estudios presentados en esta Memoria se han llevado a cabo empleando sobrantes hospitalarios diarios de los medicamentos y llevando a cabo los estudios dentro del periodo de caducidad indicado por los respectivos fabricantes, que no excedía de 24 horas tras la apertura y/o reconstitución de los mismos.

La Memoria se ha estructurado en tres secciones principales: **Introducción**, **Parte Experimental** y **Conclusiones**.

La primera parte de la **Introducción** se centra en los medicamentos biotecnológicos, su importancia en la prevención y el tratamiento de enfermedades como el cáncer y enfermedades autoinmunes, las características propias que los diferencian de los medicamentos de síntesis química, así como el marco legal para su regulación. Dentro de este grupo de biofármacos se encuentran los mAbs, cuyo estudio es el objetivo principal de esta Tesis Doctoral, siendo el cuerpo principal de la introducción. Además de describirlos, se comentará de forma detallada su estructura, tipos, importancia en el mercado farmacéutico mundial, así como las guías ICHs necesarias para la evaluación de la calidad. Se completa la introducción con la descripción y características de los cinco mAbs terapéuticos estudiados y de las técnicas analíticas utilizadas en los estudios incluidos en esta Memoria.

La **PARTE EXPERIMENTAL** consta de cuatro capítulos, tres de ellos centrados en los objetivos propuestos al inicio de esta Tesis. El **Capítulo 1** está dedicado a los materiales y métodos junto a la metodología llevada a cabo en la aplicación de los métodos propuestos y los diferentes ensayos de degradación acelerada aplicados a las muestras.

En el **Capítulo 2** y el **Capítulo 3**, se aborda el desarrollo y la validación de métodos cromatográficos como indicadores de estabilidad mediante (RP)HPLC/DAD para la caracterización y cuantificación del mAb terapéutico cetuximab en el primero y de los mAbs terapéuticos bevacizumab, infliximab y trastuzumab en el segundo, todos estudiados en condiciones de uso hospitalario siguiendo las pautas dictadas por la guía ICH (Q2(R1): *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. Concretamente, los métodos han sido validados mediante el estudio de los parámetros de calidad: linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión, exactitud y robustez, incluyendo estudios de degradación forzada que permiten evaluar la especificidad de los métodos y validarlos como indicadores de la estabilidad, tal y como se recoge en la guía ICH Q2(R1), además de determinar las principales pautas de degradación de los mAbs estudiados. Las diferentes condiciones de degradación controlada a las que han sido sometidos los medicamentos y sus preparaciones farmacéuticas han sido: la exposición a alta temperatura, el efecto de la luz visible, medio ácido y básico, medio hipertónico (NaCl) y medio oxidante. Como se ha comentado, el objetivo de estos estudios es, además de determinar las pautas de degradación de cada uno de los mAbs en diferentes condiciones estresantes, la de validar el método como indicador de la estabilidad de forma que sea capaz de detectar modificaciones en los mAbs. Tras la validación de los métodos, se han llevado a cabo estudios de estabilidad en el tiempo en condiciones de uso hospitalario, con el fin de determinar la estabilidad de estos medicamentos tras la apertura de los viales contenedores y/o de sus preparaciones farmacéuticas de uso hospitalario en un periodo de tiempo de 30 días almacenados a 4°C.

En el **Capítulo 4** de esta Memoria se detalla la estrategia analítica para la caracterización y determinación de la heterogeneidad de carga de los cinco mAbs terapéuticos, i.e. bevacizumab, cetuximab, infliximab, rituximab y trastuzumab, preparados en condiciones de uso hospitalario, así como la estabilidad de los mismos en el tiempo. Para ello, se ha desarrollado y validado un método cromatográfico de intercambio catiónico débil ((WCX)HPLC/DAD) como indicador de estabilidad y concebido como un único método para el análisis de cualquier mAb. Este método se ha optimizado combinando el ajuste de la ventana de pH en la fase móvil junto con un gradiente de fuerza iónica. Para la validación del mismo como indicador de estabilidad, se han realizado los estudios de degradación forzada de acuerdo con la guía ICH (Q2(R1)), con el fin de demostrar su capacidad para la detección de cambios cuando los mAbs se degradan a la vez que permite identificar las pautas de degradación mediante el análisis de los cambios en los perfiles de variantes de carga de cada uno de los cinco mAbs estudiados. Este trabajo ha puesto de manifiesto un diferente comportamiento de los mAbs dependiendo de la condición de estrés propuesta, así como diferencias entre los perfiles cromatográficos de sus variantes de carga. Una vez validado el método como indicador de la estabilidad, se ha empleado en un estudio de estabilidad en el tiempo para preparaciones farmacéuticas de los mAbs de uso hospitalario almacenados durante dos meses a 4°C obteniéndose resultados diferentes y característicos para cada uno de los mAbs estudiados.



Introducción

1. Medicamentos Biotecnológicos

1.1. Definición

De manera general, los medicamentos biotecnológicos son aquellos medicamentos biológicos obtenidos a partir de técnicas tales como el ADN recombinante, la expresión génica controlada o la tecnología de hibridomas, y que por lo tanto se ubican como un subgrupo dentro del grupo de los medicamentos biológicos [1][2]. Según el Real Decreto 1345/2007 del 11 de octubre, en el que se regula el procedimiento de autorización, registro y condiciones de dispensación de los medicamentos para uso humano fabricados industrialmente, los medicamentos biológicos se definen como *“aquellos productos cuyo principio activo es biológico y cuyos materiales de partida son toda sustancia de origen biológico tales como los microorganismos, órganos y tejidos de origen vegetal o animal, las células o fluidos (incluyendo sangre y plasma) de origen humano o animal y los diseños celulares biotecnológicos (sustratos celulares sean o no recombinantes incluidas las células primarias)”* [3].

Los medicamentos biotecnológicos, actualmente, están compuestos mayoritariamente por proteínas de distinta naturaleza como proteínas recombinantes, mAbs y fragmentos funcionales de estos últimos, vectores para el transporte de material genético, ácidos nucleicos, oligonucleótidos, vacunas, etc [4][5].

El organismo estatal responsable de la regulación y evaluación de los aspectos de calidad de los medicamentos de origen biológico y biotecnológico para uso humano comercializados en el territorio nacional, es la División de Productos Biológicos, Terapias Avanzadas y Biotecnología de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), en coordinación con el Departamento Europeo de Control de Medicamentos (EDQM) responsable de

aquellos que se comercializan en la Unión Europea [6]. En Europa, los medicamentos provenientes de la tecnología de ADN recombinante son evaluados mediante un procedimiento centralizado (es decir, por decisión unánime de todos los países de la Unión Europea (UE) [7]), donde la Agencia Europea de Medicamentos (*European medicines Agency*, EMA) coordina y regula las autorizaciones llevadas a cabo por los países miembros [8]. Este procedimiento se realiza a través de solicitudes de licencia para comercialización de productos biológicos, llamada *Marketing Authorisation Applications* (MAA) [9] en la Unión Europea y coordinado por la EMA y *Biologics License Application* (BLA) [10] en los Estados Unidos y coordinado por la FDA (*Food and Drug Administration*).

Actualmente, los medicamentos biotecnológicos constituyen la base para la prevención o el tratamiento de importantes enfermedades de gran difusión y prevalencia, como el cáncer y enfermedades autoinmunes y son considerados el grupo terapéutico más innovador y de mayor expansión en la industria farmacéutica global [11].

1.2. Características de los medicamentos biotecnológicos. Diferencias con los medicamentos de síntesis química

Los medicamentos biotecnológicos poseen atributos propios que los diferencian de los medicamentos tradicionales fabricados a partir de síntesis química [11]. Estos atributos se resumen en los siguientes puntos:

❖ **La complejidad y el tamaño de la estructura molecular del principio activo.**

Los medicamentos biotecnológicos tienen, como principios activos, moléculas muy complejas y de mayor tamaño que las moléculas de síntesis química. La mayor parte son de origen proteico, producidas la mayoría con la tecnología de ADN recombinante mediante ingeniería genética en células vivas, como células animales o microorganismos, a diferencia de los medicamentos de síntesis química que utilizan procesos químicos más sencillos. Tales procesos requieren

de etapas muy complejas y sensibles a cambios, de manera que la naturaleza, estructura y propiedades terapéuticas del producto biotecnológico dependerá del proceso de fabricación elegido y de las condiciones de éste, dando lugar a moléculas heterogéneas y variables entre los diferentes lotes de producto (microheterogeneidad) que debe estar dentro del rango aceptable para garantizar una eficacia y seguridad homogéneas.

Por ello, los fármacos biotecnológicos son considerablemente más grandes que los fármacos químicos tradicionales, con estructuras moleculares de hasta 150 kDa como en el caso de los mAbs. Esto hace que se incremente mucho la complejidad de sus estudios de caracterización requiriendo del uso de una amplia variedad de técnicas de análisis y estrategias que van desde el uso de tecnología analítica avanzada como la espectrometría de masas de alta resolución, los ensayos biológicos de potencia, etc [12][13][14].

❖ **La estabilidad.** Debido a la complejidad estructural y al tamaño, la estabilidad de los medicamentos biotecnológicos, tanto física como química, es menor que la de los medicamentos químicos tradicionales. Los fármacos biotecnológicos suelen ser objeto de modificaciones estructurales generadas durante todas las etapas de producción, desde los procesos de *upstream* (elección y preparación de las células, preparación del medio de cultivo y de las condiciones de fermentación) y *downstream* (purificación del producto y tratamiento de los residuos de la fermentación) [15], hasta las etapas finales de formulación y de almacenamiento del producto. Las modificaciones pueden ser físicas, como agregación o fragmentación proteica, que alteran la estructura física del fármaco, o químicas, como la deamidación, la oxidación o la glicosilación, que alteran químicamente la estructura del fármaco [4][12].

❖ **La forma de administración.** Debido tanto al tamaño como a la estabilidad de los productos biotecnológicos, estos medicamentos se administran con mayor frecuencia mediante inyección o infusión en el paciente generalmente en dependencias hospitalarias o similares. [12] [16].

- ❖ **Respuesta inmunogénica o inmunogenicidad.** Los medicamentos biotecnológicos, debido a su forma de administración generalmente parenteral, son detectados por el sistema inmune y en algunos casos son identificados como agentes extraños, desencadenando una respuesta inmunitaria con el fin de neutralizarlos y eliminarlos del organismo. Las causas suelen ser muy diversas, como cambios estructurales en el propio fármaco como son las modificaciones postraduccionales (PTMs), cambios en el patrón de glicosilación proteico, el aumento del tamaño del fármaco por procesos de agregación, el porcentaje de componentes “no humanos”, la dosis administrada del fármaco, sus excipientes o las impurezas del mismo, entre otras [14][17]. Todas estas causas pueden desencadenar autoinmunidad, haciendo que el cuerpo humano genere ADAs o “*Anti-drug Antibodies*”, que neutralizan el efecto terapéutico del fármaco reduciendo su eficacia o incluso con consecuencias clínicas, como reacciones de hipersensibilidad y anafilaxia. Por ello, la inmunogenicidad es uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta para evaluar la seguridad y eficacia de los medicamentos biotecnológicos [18].

- ❖ **Pruebas de control.** El número de pruebas de control que es necesario someter a este tipo de medicamentos es mucho mayor (más de 200 controles) que a los que se someten los medicamentos de síntesis química (alrededor de 50 controles) [16][19].

- ❖ **El precio.** Los medicamentos biotecnológicos, debido a los costes de producción, son mucho más caros que los medicamentos químicos tradicionales. A pesar de ello y gracias a la incorporación en el mercado de los biosimilares, que según la EMA “*son aquellos medicamentos biológicos que contienen una versión del principio activo de un producto biológico original o de referencia, cuya exclusividad en el mercado ha expirado y frente al cual demuestra biosimilitud*” [20], se estima que los tratamientos con bioterapéuticos generaran un menor gasto para los sistemas de salud globales en los próximos años [21]. A pesar de ello, ya sean biosimilares o biofármacos de referencia, siempre tendrán un coste más elevado que los medicamentos de síntesis química tradicionales.

En la Tabla 1 se describen las principales diferencias entre los medicamentos biotecnológicos y los de síntesis química.

Tabla 1. Principales características diferenciales entre los medicamentos de síntesis química y los de origen biológico [12].

Parámetro	Síntesis química	Origen biotecnológico
Peso molecular del principio activo	Bajo (<1 kDa)	Alto (>50 kDa)
Estructura del principio activo	Simple, ampliamente conocida	Compleja, frecuentemente parcialmente desconocida
Susceptibilidad de contaminación durante la fabricación	Baja	Alta
Complejidad	Ingredientes relativamente puros	Ingredientes complejos (impurezas, lixiviables, excipientes, etc.)
Sensibilidad a factores físicos	Baja	Alta
Comportamiento clínico	Mecanismos de acción documentados	Complejos mecanismos de acción, no siempre bien comprendidos
Proceso de fabricación	Relativamente simple	Altamente complejo
Inmunogenicidad	Baja, no antigénica (generalmente)	Alta, antigénica (MW>10kDa)
Estabilidad	Alta	Baja, <24h
Eliminación	Por metabolización	Por degradación
Principal vía de administración	Oral	Parenteral
Coste tratamiento	Menor	Mayor
Alternativas a los medicamentos innovadores	Genéricos	Biosimilares

2. Anticuerpos monoclonales terapéuticos

Los mAbs, como anticuerpos, se definen “*como aquellos que reconocen específicamente una parte del antígeno concreto y que son generados por un solo clon de linfocitos B*” [22]. En la respuesta inmune generada en los organismos superiores como respuesta a agresiones procedentes del exterior, así como del propio organismo, se encuentran implicados numerosos tipos de células que se

distribuyen por todo el organismo, teniendo cada una de ellas su propia acción defensiva. Los linfocitos B son células capaces de reconocer sustancias extrañas o patógenos y producir un tipo de moléculas, los anticuerpos, que identifican y se unen de forma específica a los agentes extraños (antígenos) con el fin de facilitar su eliminación. Los antígenos son en su mayoría proteínas de virus, bacterias y hongos aunque también pueden serlo toxinas o sustancias químicas [22].

Desde el descubrimiento de la habilidad profiláctica y protectora de los anticuerpos a principios del siglo XX, estas moléculas inmunoprotectoras han sido determinantes en el desarrollo de las terapias contra diversos tipos de enfermedades. El origen de estas primeras terapias basadas en anticuerpos se basó en la transmisión de anticuerpos de un animal inmunizado al paciente, proporcionando a este último, inmunidad. Este suero inmunológico que se aislaba, era usado como terapéutico y mejoraba considerablemente la supervivencia del paciente en enfermedades infecciosas como la difteria, el tétanos o la meningitis [23]. Estos sueros terapéuticos son lo que se denominan anticuerpos policlonales (pAbs), que contienen, entre otros muchos compuestos, una mezcla de anticuerpos que son generados por una gran cantidad de clones de linfocitos B. Estos anticuerpos reconocen, en mayor o menor medida, al determinante antigénico o epítopo, pero con distinta especificidad y afinidad para cada uno de ellos. En cambio, los anticuerpos específicos para un solo epítopo y producidos por un único clon de linfocito B se denominan mAbs [22].

Los mAbs son proteínas bifuncionales en las que la capacidad de reconocimiento y unión específica se combinan con funciones efectoras para eliminar patógenos y moléculas extrañas del organismo. La alta especificidad de unión a antígeno junto a su capacidad inmunológica y reclutadora de células plasmáticas ha dado pie a su gran desarrollo como biofármacos terapéuticos y como parte fundamental de terapias de nueva generación. Dentro de estas terapias encontramos, a parte de los propios mAbs, varios derivados de estos biofármacos donde destacan los conjugados de anticuerpos o ADCs (*Antibody Drug Conjugates*) [24], los anticuerpos Biespecíficos (*Bispecific antibodies*) [25], los anticuerpos de un

solo dominio o *Nanobodies* [22] o los fragmentos de anticuerpo biespecíficos como los llamados BiTes (*Bi-specific T-cell engagers*) [26], todos indicados para el tratamiento de enfermedades de gran prevalencia como el cáncer, enfermedades autoinmunes o enfermedades degenerativas.

Desde la comercialización del primer anticuerpo monoclonal en el año 1986 (muromonab-CD3, anticuerpo derivado de ratón -no humano- aprobado para el tratamiento del rechazo del trasplante de riñón [27]) el desarrollo de los mAbs terapéuticos y sus derivados no ha hecho más que aumentar exponencialmente, registrando en la actualidad la mayor parte de las inversiones en I+D de las empresas farmacéuticas más importantes a nivel mundial, convirtiéndose en los grandes protagonistas en el ámbito biotecnológico de la industria farmacéutica [22].

2.1. Estructura

Los mAbs son glicoproteínas del tipo IgG (Inmunoglobulina IgG) de gran tamaño y elevado peso molecular que se caracterizan por una elevada complejidad estructural. Cada molécula de anticuerpo está formada por 4 cadenas polipeptídicas: 2 cadenas pesadas “H” y 2 cadenas ligeras “L”, cada una de ellas idéntica entre sí, que forman una estructura similar a una “Y” llegando a un peso molecular de aproximadamente 150 kDa [22]. Esta estructura está estabilizada por enlaces covalentes de tipo puentes disulfuro, concretamente 16 para el subtipo IgG1 (10 intercatenarios y 6 intracatenarios), e interacciones no covalentes, ambas esenciales para el mantenimiento de la función del mAb y de su estructura tridimensional o terciaria (ver Figura 1) [28].

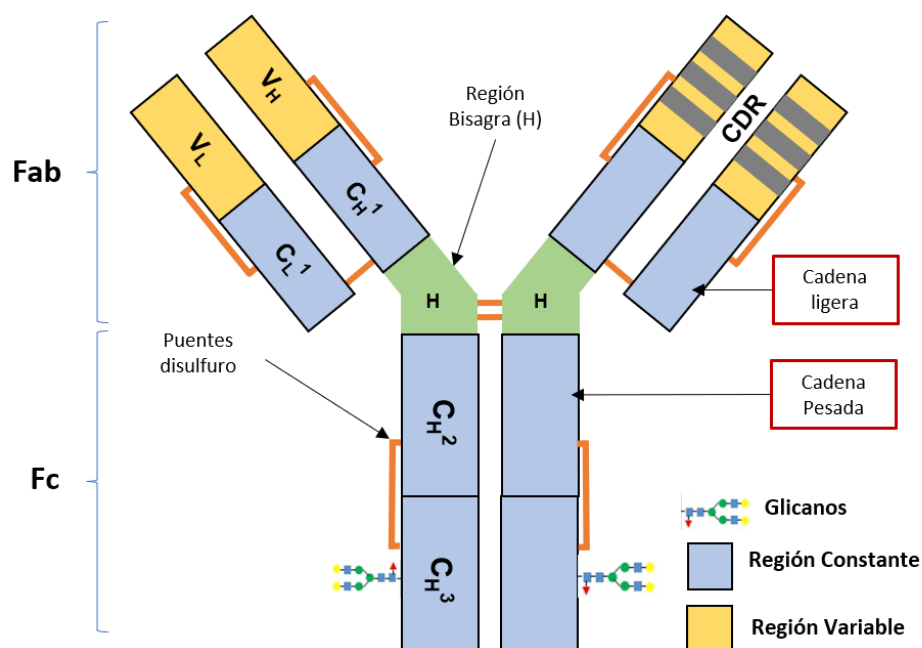


Figura 1. Estructura de un mAb. Fuente: elaboración propia.

Las cadenas pesadas presentan alrededor de 500 aminoácidos, un peso molecular de en torno a 75 kDa, con cuatro dominios diferenciados: un dominio variable N-terminal (V_H) y tres dominios constantes (C_H^1 , C_H^2 y C_H^3). Entre los dominios C_H^1 y C_H^2 de estas cadenas pesadas se encuentra la región bisagra, cuyo aminoácido predominante es la prolina y que posee una longitud variable de entre 10 a 60 aminoácidos según el tipo de anticuerpo. La función principal de esta región del mAb es la flexibilidad, necesaria para la orientación espacial de los paratopos, claves para la eficiencia de la unión antígeno-anticuerpo [29].

Las cadenas ligeras poseen alrededor de 220 aminoácidos y un peso molecular de alrededor de 25 kDa. Presentan dos dominios en total: un dominio variable (V_L) ubicado en posición N-terminal y uno constante (C_L^1) ubicado en posición carboxiterminal o C-terminal. En este dominio constante C_L^1 se distinguen dos variaciones estructurales que dan lugar a dos tipos de cadenas ligeras: kappa (κ) y lambda (λ). En el ser humano, el ratio de expresión de IgG κ /IgG λ es de aproximadamente 2:1, al contrario de lo que pasa en el ratón con un ratio de 20:1

[29]. En los mAbs comerciales el ratio de expresión de estos dos tipos de cadenas ligeras influirá en su inmunogenicidad [30].

Desde el punto de vista funcional, se distinguen dos secciones bien diferenciadas en los mAbs: la región variable o “Fab” (*Antigen Binding Fragment*) de gran importancia desde el punto de vista funcional, ya que es la encargada del reconocimiento y de la unión específica al antígeno, y la región constante o “Fc” (*Crystallizable Fragment*) encargada de las propias funciones del mAb, como la activación de la cascada del complemento (CDC), la mediación de la fagocitosis inmunitaria o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (*Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity, ADCC*) [29].

En la región Fc, concretamente al nitrógeno de la amida presente en el aminoácido asparagina 297 (N297), se unen grupos de oligosacáridos, -glicanos-, que juegan un papel muy importante en la funcionalidad del mAb y que pueden llegar a representar hasta un 18% de su composición total. Entre sus funciones destacan funciones estructurales como el mantenimiento de la estabilidad y la solubilidad del mAb, funciones de transporte celular y aclaramiento plasmático y funciones efectoras, que incluye los mecanismos de ADCC y CDC mediante la modulación de las interacciones Fc – Fc γ R y Fc – C1q [31].

En los extremos N-terminales de la región Fab del mAb se encuentran los paratopos, también llamados lugar específico de unión a antígeno, de los cuales dependen la especificidad y la reactividad cruzada de los mAbs. Éstos se forman entre los dominios V_H y V_L (dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras) y son las regiones encargadas del reconocimiento y de la unión al antígeno. Éstas se encuentran en cada uno de los brazos del mAb, por lo que cada monómero es capaz de unirse a dos epítomos o determinantes antigénicos idénticos que le da un carácter bivalente.

En estos dominios variables se encuentran las regiones determinantes de complementariedad o CDR (*Complementary Determining Region*), también llamadas dominios hipervariables. Hay 6 CDR en ambas regiones variables del

mAb, 3 en las cadenas ligeras (V_L) y 3 en las pesadas (V_H), que proporcionan el sitio de reconocimiento de antígenos específicos en la superficie del anticuerpo. La hipervariabilidad de estas regiones permite que los anticuerpos reconozcan un número casi ilimitado de antígenos. La longitud y la composición de las secuencias de CDR es muy variable, especialmente en el CDR3, debido a la complejidad de los mecanismos genéticos que generan un conjunto altamente variable de anticuerpos a partir de un número relativamente pequeño de genes. Las regiones variables se ensamblan a partir de dos genes (V y J, para cadenas ligeras λ y κ) o tres genes (V, D y J para cadenas pesadas). La variabilidad adicional en la longitud y secuencia de CDR3 se introduce por los mecanismos que permiten la adición o eliminación de nucleótidos en esas uniones y por las hipermutaciones somáticas en los genes recombinados [32][33].

Los anticuerpos o inmunoglobulinas humanas pueden clasificarse por características estructurales o por el isotipo de cadena pesada que presentan. En el caso de los mAbs terapéuticos, también se pueden clasificar según su origen genético.

- ❖ Según **el isotipo de cadena pesada**, los anticuerpos humanos se clasifican en 5 clases que van a proporcionar características y roles diferentes a cada tipo de anticuerpo [22][30]:
 - **IgG**: Presentan cadenas pesadas tipo “ γ ”. Son las más abundantes del organismo, con hasta un 75% del total de inmunoglobulinas. Entre sus características destacan su capacidad de unirse a otras células del sistema inmune, como leucocitos y macrófagos, y la de atravesar membranas plasmáticas como, por ejemplo, durante el embarazo, ya que son transferidos de la madre al feto para la protección de este último.
 - **IgM**: Presentan cadenas pesadas tipo “ μ ”. Tienen una estructura pentamérica. Estos anticuerpos son los primeros en responder en presencia de un antígeno, aunque con menor afinidad que los IgG. Representan el 10% del total de inmunoglobulinas humanas.

- **IgA:** Presentan cadenas pesadas tipo “ α ”. Poseen una estructura dimérica y están presentes en las mucosas y líquidos biológicos, por lo que son abundantes en la mucosa nasal, saliva, leche materna e intestino, representando hasta un 15% del total de inmunoglobulinas humanas.
- **IgE:** Presentan cadenas pesadas tipo “ ϵ ”. Están presentes sobre todo en reacciones alérgicas y representan solo un 0.001% del total de inmunoglobulinas humanas.
- **IgD:** Presentan cadenas pesadas tipo “ δ ”. Están involucrados en la inducción de la producción de anticuerpos en las células B, pero su función exacta sigue siendo desconocida. Constituyen no más del 1% del total de inmunoglobulinas humanas.

Dentro de la clase **IgG** se diferencian cuatro subclases: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. A pesar de que comparten más del 90% de aminoácidos de su estructura, estas subclases se diferencian principalmente en la cantidad de aminoácidos presentes en la región bisagra, en el dominio N-terminal C_H² y en los puentes disulfuro entre cadenas pesadas (Tabla 2). En cuanto a su funcionalidad, cada una posee un perfil diferenciado del resto en cuanto a respuesta a la unión al antígeno, la formación del complejo inmune, la activación del complemento, la activación de las células efectoras, la vida media y el transporte placentario.

Tabla 2. Características de las diferentes subclases de IgGs presentes en humanos [30].

	Peso molecular (kDa)	Aminoácidos en la región bisagra	Puentes disulfuro	Vida media (días)	Abundancia en el organismo (%)	Tipo de respuesta IgG
IgG1	146	15	2	21	60	Proteínas antigénicas solubles y proteínas de membrana
IgG2	146	12	4	21	32	Infecciones bacterianas
IgG3	170	62	11	7/21	4	Respuestas inflamatorias
IgG4	146	12	2	21	4	Procesos alérgicos

La subclase **IgG1**, que es inducida por proteínas antigénicas solubles o proteínas de membrana, constituye la subclase más abundante del organismo con hasta un 60% del total de IgG. Esta subclase es la más utilizada para fines terapéuticos constituyendo la mayor parte de los mAbs comercializados en la industria biofarmacéutica, debido en parte a su mayor vida media y por su fuerte capacidad de interacción con los receptores de Fc (FcRs) presentes en las células inmunes [30].

❖ Los mAbs terapéuticos se pueden clasificar según **el origen genético**, dando lugar a 4 tipos principales (Figura 2):

- **mAbs completamente no humanos (murino)**: son anticuerpos que contienen el 100% de sus dominios variables y regiones constantes procedentes de genes de animales, generalmente de roedor (murino). Debido a que inducen potentes respuestas anti-anticuerpos o HAMA (*Anti-murine Immunoglobulin Antibody*) [34] cuando se dosifica en humanos, su aplicación está muy limitada. El primer mAb comercializado en el mundo en 1986, el Orthoclone OKT3® (muromonab-CD3), pertenece a este grupo. Se identifican mediante el sufijo “**-omab**”.
- **mAbs quiméricos**: Estos mAbs poseen regiones variables (V_H y V_L) no-humanas fusionadas a regiones constantes humanas, con alrededor del 75% de su material genético de origen humano. Ejemplos de este grupo de mAbs son el MabThera® (rituximab), Remicade® (infliximab) y Erbitux® (cetuximab). Éstos pueden generar una respuesta anti-anticuerpo importante dirigida a las secuencias variables no humanas. Se identifican mediante el sufijo “**-ximab**”.
- **mAbs humanizados** Parte de los seis loops de CDRs ubicados en las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras (V_H y V_L) son de origen no humano, por lo que alrededor del 95% lo constituyen secuencias humanas disminuyendo la inmunogenicidad en humanos casi por completo. Ejemplos de este grupo de mAbs son Herceptin® (trastuzumab) y el Avastin® (bevacizumab). Se identifican mediante el sufijo “**-zumab**”.

- **mAbs humanos:** en este tipo de mAbs el 100% de sus secuencias proteicas derivan de secuencias humanas. Debido a la inexistente inmunogenicidad que generan, este tipo de anticuerpos son los que mayor impacto económico tienen en la industria biofarmacéutica. Ejemplos de este grupo de mAbs son Humira® (adalimumab) o Vectabix® (panitumumab). Se identifican mediante el sufijo “-umab” [27].

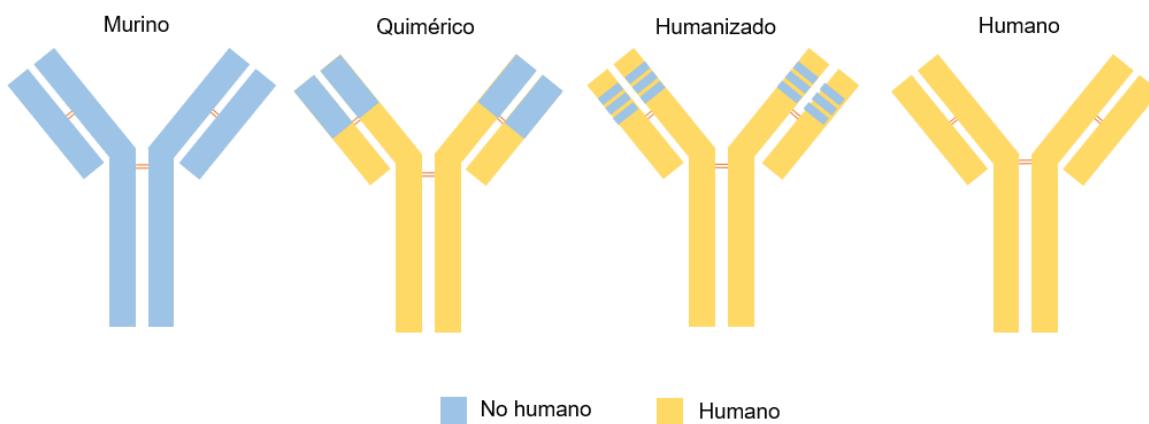


Figura 2. Tipos de mAbs según su origen genético. Fuente: elaboración propia.

2.2. Nomenclatura

En 1950, la Organización Mundial de la Salud (OMS) introdujo un sistema de nombres internacionales no patentados llamado “INN” (*International Nonproprietary Name*) con la finalidad de asignar adecuadamente nombres a sustancias medicinales, de modo que cada sustancia sea reconocida globalmente por un nombre único [27][36]. La “INN” no otorga derechos de propiedad por lo que los nombres se pueden usar libremente como propiedad pública.

Para el caso de los mAbs, en la década de 1990 se implementó un esquema sistemático para nombrarlos, dividiendo al nombre en 4 secciones [37]:

- (1) prefijo + (2) afijo (objetivo) + (3) afijo (origen) + (4) sufijo o raíz.

Si ponemos como ejemplo uno de los anticuerpos objeto de estudio de esta Tesis Doctoral, el cetuximab: **ce- tu- xi-mab**

- ❖ El prefijo “**ce**” es específico para este anticuerpo y debe ser distintivo de cada uno.
- ❖ El primer afijo “**tu**” identifica el tipo de objetivo del mAb, en este caso su uso para el tratamiento contra el cáncer. Otros mAbs poseen afijos como “ba” (objetivo bacteriano), “li” (función inmunomoduladora) o “c” (función cardiovascular), entre otros.
- ❖ El segundo afijo “**xi**” identifica su origen, en este el mAb es quimérico. Los otros afijos son “o” (murino), “zu” (humanizado) y “u” (humano).
- ❖ El sufijo “**mab**”, que lo identifica como anticuerpo monoclonal. Esta raíz se utiliza para nombrar a todas las sustancias que contienen un dominio variable de inmunoglobulina que se une a un objetivo definido, y que se componen de un solo componente farmacológicamente activo [36].

2.3. Producción de mAbs. Datos económicos

Los mAbs constituyen una parte muy importante del mercado farmacéutico mundial con un total de 61 mAbs aprobados para su uso en los últimos 7 años (desde enero 2014 hasta noviembre 2020) por las autoridades reguladoras como la FDA en EE.UU. y la EMA en Unión Europea [38] (Figura 3).

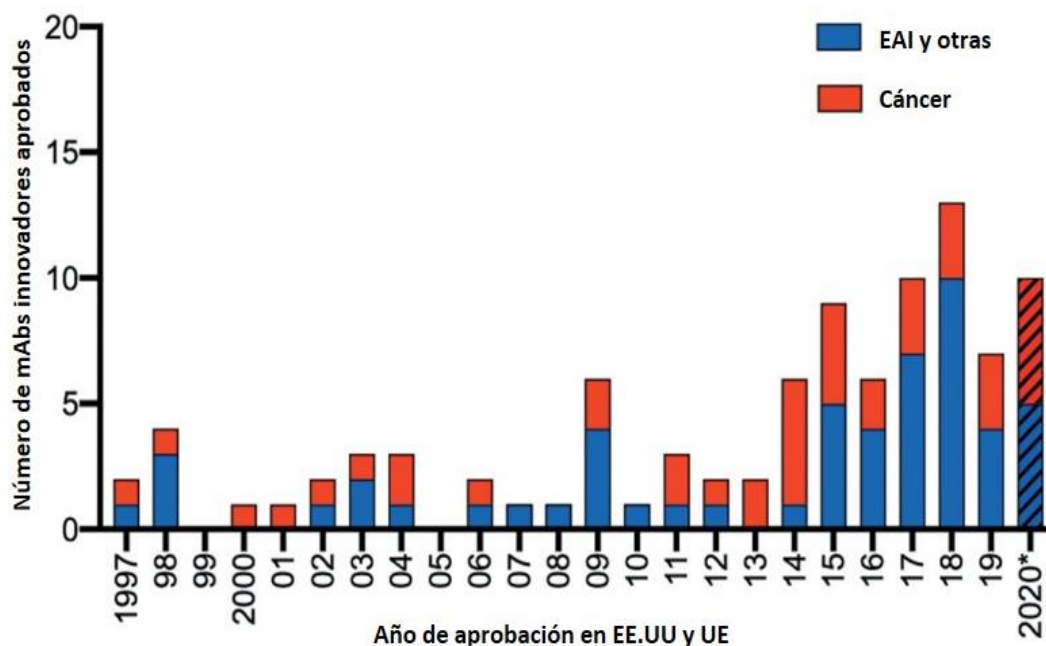


Figura 3. Número de mAbs innovadores aprobados en los Estados Unidos y la Unión Europea entre los años 1997-2020 para cáncer y enfermedades autoinmunes (EAI). Fuente: [38].

A principios de 2021, otros 16 mAbs estaban en proceso de revisión por parte de estas autoridades regulatorias, 11 de ellos para indicaciones no cancerosas como el tanezumab (Pfizer, dolor lumbar crónico) o el aducanumab (Biogen, Alzheimer) y 5 de ellos para potenciales tratamientos contra el cáncer como el margetuximab (Margenza, cáncer de mama). Además, 82 mAbs se encontraban en ensayos clínicos en fases 3, de los cuales al menos 19 obtendrán la autorización de licencia a principios de 2022. Otros 300 mAbs han avanzado a estudios de Fase 2 y más de 450 están siendo sometidos a evaluaciones iniciales en estudios de Fase 1 (Figura 4) [38].

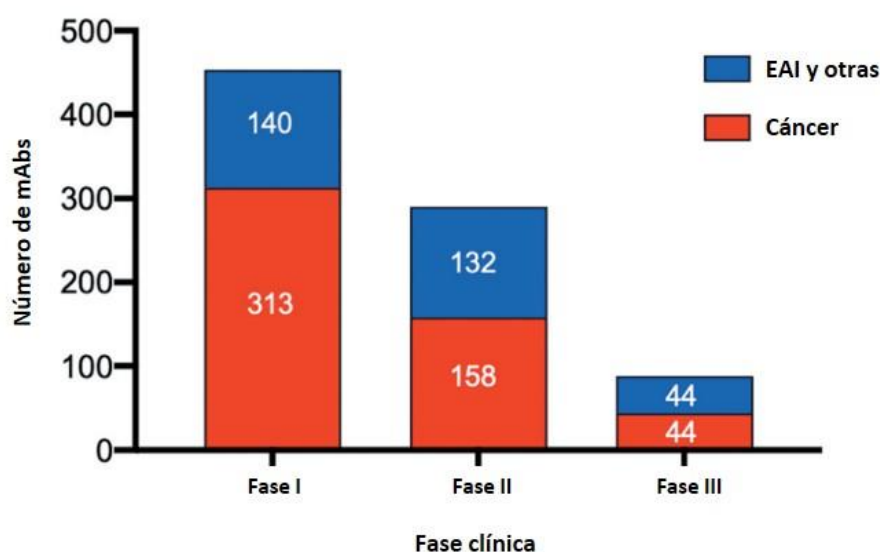


Figura 4. Número de mAbs en ensayos clínicos a nivel mundial a principios de 2021 (datos proporcionados el 15 de febrero de 2021 [38]).

El auge en el desarrollo y comercialización de nuevos mAbs se debe a varios factores: en primer lugar, a la creciente prevalencia del cáncer y otras enfermedades crónicas como las enfermedades cardiovasculares o la diabetes, que según la OMS se estima que matan a 41 millones de personas cada año. De éstos, casi 10 millones corresponden a muertes por cáncer (datos de 2020) [39] lo que ha llevado a cambios importantes en las políticas gubernamentales de los países de la UE junto con EEUU, Canadá y Japón, dando lugar a un aumento en los presupuestos para investigación y desarrollo en este campo. En segundo y tercer lugar, los avances en tecnología biotec, sobre todo en los sistemas de producción de mAbs basados en bioreactores, junto con la expiración de muchas patentes de moléculas innovadoras, han favorecido el aumento de compañías farmacéuticas interesadas en la producción de este tipo de biofármacos, sobre todo en la producción de mAbs biosimilares, que suponen un ahorro de entre 20-25% con respecto a los innovadores tanto para los sistemas nacionales de salud como para los pacientes [40].

A pesar de esta gran expansión, el mercado global de los mAbs sufrió una disminución en la tasa de crecimiento anual del 12% en el año 2020 con respecto a 2019, pasando de 114.6\$ mil millones en 2019 a 100.9\$ mil millones en 2020. Este retroceso se debió principalmente a la aparición de la pandemia por el virus SARS-CoV-2 y a la demanda mundial de medicamentos y vacunas para el tratamiento de esta enfermedad. Además, la situación de pandemia mundial ha dado lugar a restricciones impuestas por los gobiernos de muchos países para el cierre de fábricas o de funcionamiento con personal mínimo con el fin de contener la propagación del virus y mantener a salvo al personal, lo que ha generado una producción ralentizada de medicamentos biotecnológicos, en especial de mAbs y sus derivados. A pesar de ello, se espera que este mercado se recupere y crezca con una tasa anual del 14,8% a partir de 2021 y alcance los 198,2\$ mil millones en 2023 [41].

En cuanto al tipo de mercado, el de los mAbs ha sufrido importantes cambios en los últimos 10 años, en los que ha pasado a ser dominado por los mAbs 100% humanos -son los que presentan el precio de venta más elevado-, y con la incorporación de alternativas innovadoras como los mAbs biespecíficos, los ADCs y la irrupción de los biosimilares. Actualmente, el 79% de los mAbs comercializados pertenecen a la subclase IgG1 y al menos el 70% presentan una cadena ligera K [39]. Además, el 54% de los IgG1 corresponden a mAbs humanos, el 32% corresponden a humanizados y el 14% a quiméricos, estos últimos desarrollados para evitar la respuesta inmune por anticuerpos humanos anti-ratón o HAMA en pacientes con cáncer tratados con anticuerpos murinos [34].



Figura 5. Medicamentos más vendidos en 2020 de acuerdo a los beneficios obtenidos (billones de dólares). Fuente: [31].

Teniendo en cuenta el mercado global de ventas, los medicamentos biológicos tienen un peso importante, formando parte de los medicamentos más vendidos, según beneficios, de los últimos años. Concretamente, en 2020 10 de los 15 medicamentos más vendidos (Figura 5) fueron biológicos, de los cuales a su vez 6 eran mAbs, 2 proteínas de fusión y una vacuna; siendo ya el resto de origen químico, como Eliquis (apixaban), Revlimid (lenalidomida), Inbruvica (ibrutinib) y Xarelto (Rivaroxabán) [42].

Los 5 mAbs estudiados en esta Tesis también forman parte de los medicamentos más empleados a nivel mundial en las últimas dos décadas. Desde su aprobación en 1998 (Remicade[®], MabThera[®] y Herceptin[®]) y 2004 (Avastin[®] y Erbitux[®]), estos medicamentos se han mantenido en los primeros puestos de los medicamentos con mayores ventas globales con unos beneficios medios anuales de 34.2\$ mil millones en 2014 [43]. Con la pérdida de sus patentes a partir de 2014, sus beneficios se han visto reducidos un 39% (20.9\$ mil millones de beneficio en 2021), debido a la aparición en el mercado de nuevas terapias basadas

en mAbs humanos y a la irrupción de sus correspondientes biosimilares (ver sección de Anticuerpos Monoclonales Estudiados) [43][44].

3. Evaluación de Medicamentos Biotecnológicos. Guías ICH

La ICH o “*Consejo Internacional para la Armonización de los requerimientos para la comercialización de medicamentos de uso humano*” [45] es un organismo internacional nacido en abril del 1990, que tiene como objetivo coordinar las actividades reguladoras de los organismos europeos, japoneses y estadounidenses para discutir y acordar los aspectos científicos y técnicos derivados del registro de productos farmacéuticos para uso humano. Entre sus actividades, está la elaboración de guías, pautas o recomendaciones unificadas que son implementadas por los laboratorios farmacéuticos para asegurar la calidad de los medicamentos que producen [45]. Por ello, la misión principal de la ICH es lograr una mayor armonización tanto en la interpretación como en la aplicación de los requisitos para el registro de nuevos productos, lo que ayuda a la industria a reducir los tiempos de desarrollo, ahorrar recursos y beneficiar al paciente [46]. Organismos internacionales como la FDA [47] y la EMA [48] e incluso sistemas nacionales europeos de salud como el NHS (*United Kingdom National Health Service*) [49] también establecen recomendaciones para la evaluación de medicamentos biotecnológicos, todos basándose en las guías elaboradas por este organismo y que se conocen comúnmente como guías ICHs.

Estas guías ICH se dividen en 4 grupos principales: las guías enfocadas a la seguridad (S), a la calidad (Q), a la eficacia (E) y un grupo multidisciplinar (M) para tratar temas de naturaleza diversa. Todas reflejan los principales criterios para la aprobación y autorización de nuevos medicamentos. Parte de las ICHs relacionadas con la calidad (Q) (Tabla 3) han sido las principales referencias para la realización del trabajo de investigación llevada a cabo en esta Tesis Doctoral.

Tabla 3. Guías ICH de calidad de productos biotecnológicos [45].

Codificación	Título
Q1A(R2) [50]	Pruebas de estabilidad de nuevos fármacos y productos farmacéuticos.
Q1B [51]	Guía de estabilidad: prueba de foto estabilidad de nuevas sustancias y productos farmacéuticos
Q2(R1) [52]	Validación de procedimientos analíticos: texto y metodología
Q5A(R1) [53]	Guía para la calidad de productos biotecnológicos: Evaluación de seguridad viral de productos biotecnológicos derivados de líneas celulares de origen humano o animal.
Q5A(R2) [54]	Evaluación de la seguridad viral de productos biotecnológicos derivados de líneas celulares de origen humano o animal
Q5B [55]	Análisis de la expresión creada en líneas celulares usadas para la expresión de r-ADN derivado de productos proteicos
Q5C [56]	Análisis de estabilidad de productos biotecnológicos/biológicos
Q5E [57]	Comparabilidad de productos biotecnológicos/biológicos sujetos a cambios en su proceso de fabricación.
Q6B [58]	Guía de especificaciones: procedimientos de ensayo y criterios de aceptación para productos biotecnológicos/biológicos.
Q8 (R2) [59]	Desarrollo farmacéutico

Dentro de las guías de calidad, existen un grupo de ellas enfocadas exclusivamente a los productos biológicos y biotecnológicos, desde proteínas y polipéptidos hasta vacunas de origen natural o recombinante (Tabla 3). Éstas son las guías **ICH Q5**, que se crean en 1995 como respuesta a las exigencias de la industria farmacéutica donde los productos biológicos y biotecnológicos tienen una importancia cada vez mayor. Estas guías **Q5** tratan temas de diferente índole, desde la evaluación de la seguridad (**Q5A(R1&R2)**) hasta la comparabilidad entre productos (**Q5E**) [45] [46].

Otra importante guía concebida especialmente para productos biológicos y biotecnológicos es la **Q6B** [58]. Esta guía ofrece pautas sobre qué tipo de caracterización y métodos analíticos deben aplicarse y qué límites de aceptación deben establecerse para garantizar la identidad, el contenido, la calidad y la pureza del fármaco biotecnológico. Estos requerimientos son importantes tanto para las entidades regulatorias como para las propias empresas biofarmacéuticas. Se puede destacar en ella las recomendaciones para la evaluación de las propiedades físico-

químicas de medicamentos y productos biotecnológicos, concretamente el uso de las técnicas de cromatografía líquida en fase inversa y de cromatografía líquida de intercambio iónico para el estudio de la identidad, homogeneidad y pureza de los mAbs [58]. Estas técnicas han sido utilizadas en el trabajo experimental incluido en esta Memoria para la caracterización de los mAbs terapéuticos objeto de estudio.

En el proceso de desarrollo del método analítico, se deben definir los atributos críticos de calidad (*Critical Quality Attribute*, CQA) propios del producto biotecnológico para la evaluación de su impacto en la calidad del mismo. La elección de CQAs que deben incluirse en el desarrollo farmacéutico de los biofármacos están descritos en la guía **Q8 (R2)** [59]

Una vez establecidas las pautas a seguir para la caracterización de productos biotecnológicos, la guía **Q2(R1)** proporciona una descripción general de los criterios necesarios para validar completamente un procedimiento analítico. La validación de un método analítico tiene como objetivo “*demostrar que es adecuado para el propósito previsto y es un requisito formal de las agencias regulatorias*” [46] [52]. Además, en esta guía se incluye la realización de estudios específicos de degradación forzada como requisito para la validación de un método analítico aplicado a la caracterización de un producto biotecnológico.

Actualmente, la guía **Q2(R1)** se encuentra en proceso de revisión, con el fin de incluir nuevos enfoques para la validación de métodos analíticos basados en técnicas novedosas como las técnicas cromatográficas acopladas a la espectrometría de masas (GC-MS y LC-MS) y las técnicas espectroscópicas (Espectroscopía del Infrarrojo Cercano (NIR) o Espectroscopia Raman) que utilizan técnicas quimiométricas para el tratamiento de los datos analíticos y que son utilizadas comúnmente en procesos de control de calidad de productos biológicos y biotecnológicos [60].

Por último, se destacan como parte clave de esta Tesis Doctoral el grupo de guías relacionadas con la realización de estudios de estabilidad en el tiempo de los productos biológicos y biofarmacéuticos, entendiendo ésta como “*la capacidad para*

permanecer inalterados durante su vida útil". En este sentido, la guía **Q5C** tiene como propósito la armonización de los requerimientos para la evaluación de la estabilidad de los biofármacos en apoyo de las solicitudes de autorización de comercialización [45][56]. Esta guía complementa otra guía más general, la **Q1A(R2)** [50], que define los datos requeridos para la estabilidad de un nuevo fármaco o producto farmacéutico y que es necesaria para la solicitud de registro dentro de la UE, Japón y los Estados Unidos.

El trabajo experimental de la presente Tesis Doctoral ha sido diseñado siguiendo las pautas indicadas en las guías comentadas anteriormente. A continuación, se detallarán las guías ICH que han sido aplicadas en el desarrollo y validación de los métodos propuestos y su aplicación en estudios de estabilidad de los mAbs terapéuticos.

- Atributos críticos de calidad, CQAs, (**ICH Q8 (R2)**).
- Estudios de degradación forzada (**ICH Q1(R2)**) y Perfil indicador de estabilidad (**ICH Q5C**).
- Estudios de estabilidad en condiciones de uso hospitalario (**ICH Q5C**).

3.1. Atributos críticos de la calidad, CQAs (ICH Q8 (R2))

Un atributo crítico de la calidad o CQA se define, según la guía ICH Q8 (R2) [59], como "una propiedad o característica física, química, biológica o microbiológica que debe estar dentro de un límite, rango o distribución adecuados para garantizar la calidad del producto deseado". Estos pueden estar asignados a sustancias relacionadas con el producto, a sustancias relacionadas con el proceso o a las propias impurezas del producto. La identificación de los CQAs es un paso indispensable para el desarrollo de un producto biofarmacéutico ya que para ello se requiere definir y conocer los potenciales CQAs que puedan afectar a la seguridad y la eficacia del producto y que influyan en el rendimiento esperado del mismo [61].

El proceso de identificación de los CQAs de un mAb implica varios pasos previos que comienzan con la definición del perfil de calidad de los productos biofarmacéuticos o QTPP (*Quality Target Product Profile*) [59][61] que enumera los atributos del producto necesarios para ofrecer el rendimiento esperado según lo definido por el perfil objetivo del producto o TPP (*Target Product Profile*). Con la ayuda del QTPP y las fuentes adicionales de información sobre atributos de calidad del producto (información específica proveniente de la caracterización analítica, estudios de degradación forzada, observaciones clínicas, estudios de moléculas similares y publicaciones científicas, entre otros [61] [62]), se construye un listado de todos los posibles atributos críticos de calidad (*potential Quality Critical Attributes*, pCQA), que generalmente comprende variantes de productos e impurezas relacionadas con el proceso, que pueden afectar potencialmente a los mecanismos de acción, a la toxicidad de la molécula, a la seguridad general o a sus propiedades farmacocinéticas.

Este proceso de identificación comienza en las etapas tempranas del desarrollo farmacéutico y se confirma en las etapas finales del proceso comercial, lo que aporta un control más profundo de la relación estructura-función de los CQA y su impacto en la eficacia y seguridad del producto. Algunos de estos CQA se establecen obligatoriamente por parte de los organismos reguladores internacionales para productos biotecnológicos como los mAbs terapéuticos.

En los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral se han evaluado dos CQAs en los 5 medicamentos biotecnológicos seleccionados. Para ello, se han desarrollado y validado métodos cromatográficos adecuados para cada uno de estos CQAs. Así pues, el CQA contenido proteico, ha sido estudiado mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa y detección de diodos en fila ((RP)HPLC-DAD) y el CQA variantes de carga se ha evaluado mediante cromatografía líquida de alta resolución de intercambio catiónico débil ((WCX)HPLC-DAD). A continuación, se comentan más a fondo estos CQAs estudiados.

3.1.1. Contenido proteico

La cuantificación del contenido proteico que constituye el principio activo de un producto biotecnológico es un procedimiento que debe llevarse a cabo durante todas las fases de fabricación del mismo: caracterización, ensayos funcionales y durante evaluaciones cuantitativas como, por ejemplo, el proceso de interacción proteína-proteína y proteína-ligando y debe realizarse mediante técnicas analíticas de naturaleza físico-química [58][63]. En mAbs terapéuticos, la cuantificación generalmente se ha llevado a cabo mediante técnicas inmunoquímicas tradicionales, como ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) [64] o ensayos de Bradford [65], pero debido a la baja precisión, a los límites de cuantificación inadecuados y la escasa robustez de estas técnicas en comparación con las técnicas físico-químicas, la guía **ICH(Q6B)** recomienda la utilización de estas últimas para la cuantificación de este tipo de productos [58][65]. Por ello, metodologías basadas en cromatografía en fase inversa (*Reverse Phase Chromatography*, RPC) o en cromatografía de afinidad (*Affinity Chromatography*, AC) [65], así como técnicas espectrofotométricas de absorción UV-Vis [63], son las principales técnicas para cuantificación del contenido proteico en los mAbs terapéuticos.

3.1.2. Variantes de carga

Los mAbs son moléculas heterogéneas (glicoproteínas) que experimentan una gran variedad de modificaciones químicas y enzimáticas a través de diversos mecanismos que pueden ocurrir durante prácticamente todas las etapas de la vida del producto: producción, formulación y almacenamiento. Estos mecanismos, que se definen como modificaciones postraduccionales (*Post-translational Modifications*, PTMs) [14], pueden estar presentes en el mAb en mayor o menor medida y son muy variadas, ya que pueden afectar a la proteína de múltiples formas: modificando grupos químicos presentes en las cadenas laterales de los residuos de los aminoácidos, mediante la ruptura proteolítica de subunidades peptídicas o

proteicas o alterando la estructura del mAb [66] [67]. De entre todas las PTMs, las de mayor interés en la industria biofarmacéutica son las que afectan a la funcionalidad del producto, como la deamidación de asparagina (Asp)/ glutamina (Gln), la oxidación de metionina (Met) o el patrón de glicosilación, entre otras. [67].

Algunas de estas modificaciones pueden alterar la heterogeneidad de carga propia del mAb modificando la distribución de la carga superficial, ya sea de forma directa (modificando el número de grupos cargados) o indirecta (alterando la estructura y modificando la carga neta), lo que da lugar a diferentes variantes o isoformas cargadas [68]. Estas variantes son detectadas generalmente mediante técnicas analíticas basadas en la separación de cargas, como las técnicas electroforéticas de isoelectroenfoque (*Isoelectric Focusing Electrophoresis*, IEF) e isoelectroenfoque capilar (*Capillary Isoelectric Focusing Electrophoresis*, cIEF) o las técnicas cromatográficas de intercambio catiónico (*Cation Exchange Chromatography*, CEX) o intercambio aniónico (*Anion Exchange Chromatography*, AEX). Las variantes de carga se identifican como variantes ácidas o básicas, dependiendo de su posición con respecto a las formas proteicas principales debido a cambios en su punto isoeléctrico (pI), en el caso de las técnicas electroforéticas, o a cambios en el tiempo de retención (*Retention Time*, RT) del pico principal, en el caso de las técnicas cromatográficas, donde el RT de las variantes ácidas será menor (elución anterior) que el correspondiente al del pico principal, y en el caso de las variantes básicas el RT será mayor (elución posterior) [69] [70].

La variación en la heterogeneidad de carga puede tener múltiples consecuencias, afectando a la capacidad de unión a antígenos o a la membrana celular, influyendo en la penetración tisular, la distribución tisular o la farmacocinética, impactando directamente en la eficacia y en la funcionalidad del mAb [71][68][69]. Algunas de las PTMs más importantes que afectan a la heterogeneidad de carga observadas en mAbs se describen en la Tabla 4 y se comentan a continuación [72].

Tabla 4. PTMs presentes en los mAbs que afectan a la heterogeneidad de carga.

Modificaciones que generan variantes ácidas	Modificaciones que generan variantes básicas
Deamidación Asn/ Gln	Presencia de Lys C-terminal
Glicosilación (Formación de ácidos siálicos)	Glicosilación (Formación de α -Galactosa)
Ciclación de Gln N-terminal a pyroGlu	Formación de Succinimida
Reducción de puentes disulfuro	Oxidación de residuos de Met
Fragmentación	Agregación y fragmentación

A. Deamidación de residuos de asparagina/glutamina

La deamidación es un proceso degradativo no enzimático muy común en proteínas terapéuticas, que afecta a los residuos del aminoácido asparagina (Asn) presentes tanto en las CDR de las regiones variables como de las regiones constantes de los mAbs, que dan lugar a una mezcla de aspartato (Asp) e isoaspartato (iso-Asp) en una proporción de aproximadamente 1:3, a través de un intermediario de succinimida inestable. Esta reacción se ve favorecida cuando existen glicinas o serinas en posición N+1 y por condiciones de alta temperatura y pH básico (Figura 6) [73]. También se produce la deamidación de residuos del aminoácido glutamina (Gln), pero tiene lugar a un ritmo más lento que en Asn, por lo que su interés es menor.

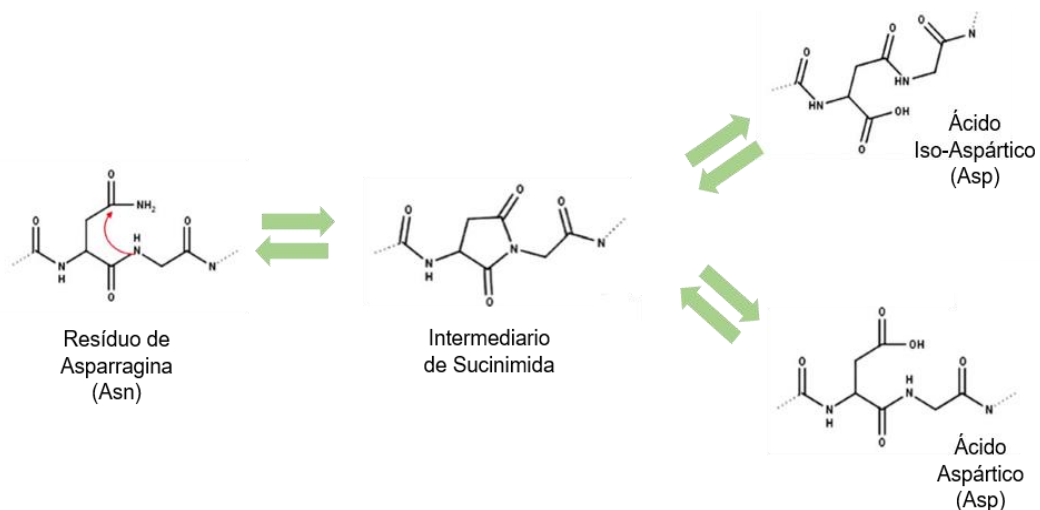


Figura 6. Vía mediada por succinimida para la degradación no enzimática de asparagina y residuos de aspartato. Fuente: Elaboración propia.

La deamidación es una de las principales causas de degradación de las proteínas terapéuticas, sobre todo en los casos en los que se realiza una formulación o un almacenamiento inadecuados, y afecta a la actividad biológica del mAb reduciendo su potencia en hasta un 70%. La reacción de deamidación genera, por tanto, un aumento de variantes ácidas, lo que contribuye al aumento de la heterogeneidad de carga de la proteína [74][75].

B. Formación de piroglutamato

Ésta es una PTM no enzimática muy común en IgG1 que no tiene mucho impacto en la potencia del fármaco, pero que es usada como un indicador de la calidad del proceso de producción, al igual que la presencia de lisina (Lys) terminal. Esta reacción se produce por formación del metabolito piroglutamato (pyroGlu), a partir de la ciclación del aminoácido Gln N-terminal. Esta reacción genera una pérdida de NH_3 , lo que da lugar a la formación de variantes ácidas en el mAb (Figura 7) [76][77][78].

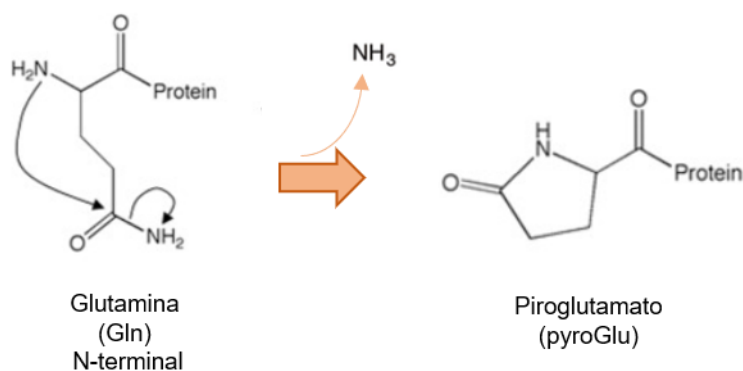


Figura 7. Formación de piroglutamato por ciclación del aminoácido Gln. Fuente: elaboración propia.

C. Glicosilación

La glicosilación es una reacción enzimática que ocurre dentro de las células eucariotas. Es además una de las modificaciones más comunes y una de las más importantes, siendo crucial para la funcionalidad del mAb. Esta PTM consiste en la unión de unidades de monosacáridos (α -galactosa, fucosa, manosa, ácidos siálicos, etc.) a la cadena polipeptídica proteica, concretamente a residuos de Asn [71].

De entre los tipos de glicosilaciones que se dan en los mAb, la formación de ácidos siálicos y la formación de α -galactosa son las que mayor impacto tienen en la heterogeneidad de carga de la proteína. La presencia de ácidos siálicos genera un aumento de variantes ácidas mientras que la presencia de α -galactosa genera un aumento de variantes básicas. Por ello, la glicosilación es una PTM determinante en la heterogeneidad de carga de los mAbs [79].

D. Presencia de Lys C-terminal

La eliminación o truncamiento del aminoácido lisina (Lys) en posición C-terminal de las cadenas pesadas es una modificación que causa la formación de variantes básicas, debido a la pérdida del aporte de cargas positivas de las Lys terminales. Este proceso de truncamiento de Lys se lleva a cabo de forma natural durante los procesos de producción de anticuerpos, concretamente en los cultivos celulares de células eucariotas como las células de ovario de hámster chino (*Chinese Hamster Ovary*, CHO) por medio de carboxipeptidasas endógenas que en ocasiones realizan este truncamiento de forma incompleta, dejando Lys residuales en el mAb [71][69]. Esta heterogeneidad de Lys C-terminal ha demostrado no tener impacto negativo en la potencia o en la seguridad del producto, por lo que no se le considera un CQA aunque se le considera una causa predominante de la heterogeneidad de carga de los mAbs [80][77], y por ello tiene que ser controlado y monitorizado.

La caracterización y monitorización de todas estas PTMs permite diseñar estrategias de estabilidad que eviten la degradación temprana o los cambios prematuros en la heterogeneidad de carga de los mAb, favoreciendo el control de estos productos, así como su vida útil.

3.2. Perfil indicador de estabilidad. Estudios de degradación forzada. ICH Q5C e ICH Q2(R1)

El concepto del perfil indicador de estabilidad se basa en los parámetros o atributos propios de cada fármaco que permiten la detección de pequeños cambios en la identidad, pureza y potencia del producto, debido a procesos degradativos durante su fabricación, almacenamiento, transporte o manipulación [56]. Las estrategias para la evaluación de la estabilidad de fármacos, incluidos los productos biotecnológicos, requieren conocer las vías de degradación y los atributos de

calidad de las moléculas de interés con el fin de desarrollar e implantar métodos indicadores de estabilidad. Estos métodos deben garantizar que todos los compuestos de degradación generados en el producto, debido a procesos degradativos como la deamidación, la oxidación o la agregación, sean completamente monitoreados, identificados y evaluados, asegurando que cualquier cambio en las propiedades físico-químicas, o funcionales sean detectadas. Al conjunto de metodologías y estrategias desarrolladas y validadas para tal fin es lo que se denomina perfil indicador de estabilidad (*Stability-Indicating Profile*, punto 5 de la ICH Q5C).

Por tanto, una vez definidos los CQAs, se puede construir el perfil indicador del medicamento biotecnológico cuyo principio activo es un mAb. Los métodos empleados para el análisis de estos CQAs deben de ser validados como métodos indicadores de la estabilidad, tal y como indica la ICH Q5C, siguiendo las directrices de la ICH Q2(R1) [52]. En este contexto, esta guía indica la necesidad de realizar estudios de degradación forzada con el objetivo de evaluar la especificidad de los mismos, y demostrar la capacidad del método analítico de analizar el principio activo del medicamento en presencia de sus posibles productos de degradación.

Los estudios de degradación forzada, también llamados de estrés acelerado o degradación controlada, consisten en someter al medicamento a condiciones de degradación durante un corto período de tiempo. Éstas condiciones, en comparación con las de almacenamiento propias de cada medicamento, pueden generar productos de degradación por lo que son seleccionadas en función de la probabilidad de exposición de cada producto a esas condiciones perjudiciales durante el procesamiento, envasado, envío y manipulación [81] [82]. Éstas incluyen estrés por temperatura y humedad, estrés oxidativo, estrés por concentración salina elevada y la evaluación de la susceptibilidad del medicamento a la hidrólisis en un amplio intervalo de pH (estrés ácido y básico) [50]. Asimismo y dada la importancia de la degradación por acción de la luz visible (fotoestabilidad), existe una guía específica que recoge las recomendaciones para realizar esta degradación acelerada de manera estándar, la **ICH Q1B** [51]. En esta guía se incluyen las

características de fotoestabilidad que se deben evaluar para evitar daños por exposición a la luz inadecuada y que permitirán detectar alteraciones estructurales o degradaciones fotoquímicas, que en productos biotecnológicos como los mAbs promueven principalmente la oxidación y la agregación de proteínas y la consiguiente pérdida de la seguridad y eficacia del producto [83][84].

Los estudios de degradación forzada tienen tres objetivos fundamentales:

- Determinar las pautas de degradación de cada producto farmacéutico para la mejor comprensión de los mecanismos degradativos, con el fin de mejorar el conocimiento de la estructura de la propia molécula y así establecer recomendaciones de uso de la misma.
- Proporcionar los datos necesarios para justificar la aceptabilidad de un producto farmacéutico sometido a una desviación ocasional en sus condiciones de almacenamiento, que puedan haber comprometido su seguridad y eficacia [46][82][85].
- La validación del método analítico desarrollado para un objetivo dado, así como la validación de la capacidad del método como indicador de estabilidad [50].

Por tanto, para el desarrollo y la validación de los métodos empleados para determinar el perfil indicador de estabilidad, son indispensables los estudios de degradación forzada, ya que permiten evaluar las rutas de degradación de los mAbs e identificar las diferentes variantes heterogéneas, degradadas y no degradadas, presentes en los mismos para posteriormente aplicar estos métodos a cualquier estudio de estabilidad al que deba de ser sometido el medicamento biotecnológico.

3.3. Estudios de estabilidad en condiciones de uso hospitalario. ICH Q5C e ICH Q6B

La estabilidad de los medicamentos se define como *“la capacidad que tiene un medicamento o un principio activo de mantener por determinado tiempo sus*

propiedades originales dentro de las especificaciones de calidad existentes” [86][56][50]. El concepto de estabilidad está íntimamente relacionado con el concepto de fecha de caducidad, que se define como *“el periodo de tiempo en el cual el medicamento mantiene un mínimo de 90% de principio activo sin que se aprecien modificaciones en sus propiedades físicas ni desarrollo microbiano”* [86][87].

Desde el punto de vista farmacéutico hospitalario, los estudios de estabilidad de los medicamentos biotecnológicos son también de gran interés por varios aspectos. Por un lado, debido a las repercusiones organizativas que supone para los propios servicios de farmacia y por otro lado, por el gran impacto económico que originan, ya que generan sobranes debido a las cortas fechas de caducidad establecidas por los fabricantes, y a que la mayoría precisan de dosificación ajustada por peso de paciente [86].

Como ya se ha comentado en apartados anteriores, los componentes activos de los medicamentos biotecnológicos son típicamente proteínas, cuya conformación molecular puede verse afectada por procesos degradativos de diversa índole que impactan tanto en los medicamentos como en sus preparaciones farmacéuticas cuando son manipulados en ámbito hospitalario, previamente a su administración al paciente, y que finalmente afectan a su seguridad y eficacia. Por ello y para garantizar el mantenimiento de su actividad biológica y evitar la degradación, son necesarias condiciones estrictas de almacenamiento [56]. La inestabilidad que pueden sufrir los biofármacos puede ser de diferentes tipos, como se indica en la Tabla 5.

Tabla 5. Tipos de inestabilidad de los medicamentos.

Tipo de inestabilidad	Consecuencias en el Medicamento
Física	Cambios en las propiedades mecánicas y en la apariencia del producto
Química	Posibles vías degradativas del fármaco que generan una pérdida de eficacia del mismo, además de la formación de productos de degradación que pueden tener riesgos para el paciente.
Biológica	Pérdida de la actividad biológica y proliferación microbiana por encima de lo permitido
Biofarmacéutica	Perdida de biodisponibilidad del producto

Considerando la diversidad de factores que pueden impactar en estos medicamentos, la puesta en marcha de estudios de estabilidad en condiciones de uso hospitalario es muy aconsejable para seguir asegurando su calidad y eficacia en su última etapa, es decir, durante su manipulación hospitalaria previa a la administración al paciente. Por ejemplo, una preparación farmacéutica de este tipo de medicamentos debe evaluarse en condiciones típicas de almacenamiento hospitalario, de manera que se pruebe su estabilidad térmica y de humedad. Las condiciones de almacenamiento y la duración de los estudios elegidos deben ser suficientes para cubrir el almacenamiento, el envío y el uso posterior [50].

Son las guías ICH Q5C y Q6B (Tabla 3) las que deben ser aplicadas para una rigurosa evaluación de los resultados tras los estudios de estabilidad en las preparaciones farmacéuticas de uso hospitalario. Esto va a requerir por tanto, la aplicación de un gran número de métodos basados en técnicas analíticas fisicoquímicas, bioquímicas e inmunoquímicas para el análisis estructural de la proteína y la caracterización y cuantificación de los productos de degradación [56].

Durante el trabajo experimental de esta Tesis Doctoral se llevaron a cabo varios estudios de estabilidad en el tiempo en condiciones de almacenamiento típicas hospitalarias para los 5 medicamentos biotecnológicos estudiados y sus preparaciones farmacéuticas de uso clínico.

4. Técnicas Analíticas para el Análisis y Caracterización de mAbs

Durante estos últimos 20 años, el aumento significativo en la producción y comercialización de mAbs y derivados ha generado un aumento de las necesidades analíticas por parte de la industria biotecnológica, que han dado lugar a grandes avances tecnológicos enfocados a la búsqueda de métodos más precisos, robustos y sensibles para detección e identificación de CQAs de los mAbs [88], con el fin de asegurar su seguridad y eficacia.

En la actualidad, numerosas técnicas de análisis son utilizadas para la caracterización de mAbs terapéuticos, que pueden ser divididas en dos grandes grupos: **técnicas para evaluar la funcionalidad**, entre las cuales destaca la técnica inmunológica ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), el tipo de inmunoensayo más común utilizado para evaluar la actividad biológica de los mAbs [89], la citometría de flujo (*Flow Cytometry*, FC) y su variante especializada de clasificación de células activadas por fluorescencia (*Fluorescence Activated Cell Sorting*, FACS) y las **técnicas para evaluar las propiedades físico-químicas**. Este tipo de técnicas son muy numerosas y entre las que se pueden citar el dicroísmo circular (DC), la dispersión dinámica de la luz (*Dinamic Light Scattering*, DLS), la espectroscopia de fluorescencia en su modalidad de fluorescencia intrínseca de triptófano (*Intrinsic Tryptofan Fluorescence Spectroscopy*, IT-FS), la espectrometría de masas (*Mass Spectrometry*, MS) y técnicas de separación tales como la electroforesis capilar o la cromatografía líquida analítica [90]. Ésta última, la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*), es ampliamente utilizada para la caracterización y análisis de mAbs y ha sido utilizada en esta Tesis Doctoral para el estudio de mAbs terapéuticos en los modos cromatográficos de fase inversa e intercambio catiónico débil.

4.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El HPLC es una técnica indispensable para el análisis y caracterización físico-química de mAbs terapéuticos, desde las etapas de investigación y desarrollo hasta las de producción y control de calidad [91] [92] donde se aprovechan los diferentes modos de trabajo cromatográficos para analizar CQAs específicos de los mAbs. Para ello y en función de las interacciones producidas entre las proteínas disueltas en la fase móvil y la fase estacionaria, pueden ser evaluadas diferentes propiedades físico-químicas de estos biofármacos. Concretamente, el HPLC es muy eficaz para el análisis intacto de mAbs, en el que se incluyen la determinación del contenido de principio activo o la determinación de las variantes de carga (CQAs estudiados en esta Tesis Doctoral), para la determinación del perfil de N-glicanos o para la separación de péptidos (*Peptide Mapping*) tras digestiones enzimáticas, entre otros [91].

Los principales modos cromatográficos utilizados para análisis de mAbs son:

- La cromatografía en fase inversa (*Reverse Phase Chromatography*, RPC) utilizada para la cuantificación de mAbs, el análisis del perfil de impurezas, determinación del perfil de péptidos e identificación y caracterización de PTMs, esta última acoplada a un detector de MS.
- La cromatografía de exclusión molecular (*Size Exclusion Chromatography*, SEC) utilizada para la determinación de impurezas de alto y bajo peso molecular como los agregados tipo oligómeros y los fragmentos de mAbs.
- La cromatografía de intercambio iónico (*Ion Exchange Chromatography*, IEX) muy utilizada para la determinación de las variantes de carga en mAbs.
- La cromatografía de interacción hidrofílica (*Hydrophilic Interaction Chromatography*, HILIC) utilizada para el análisis del perfil de glicanos.

- La cromatografía de afinidad (*Affinity Chromatography*, AC) utilizada para la cuantificación de los mAbs.

A continuación, se describen los dos modos cromatográficos incluidas en esta Memoria.

4.1.1. *Cromatografía en fase inversa (RPC)*

La separación cromatográfica en RPC se basa principalmente en interacciones hidrofóbicas reversibles entre la molécula y la fase estacionaria, la cual tiene una polaridad menor que la fase móvil [93]. El uso de gradientes de composición de las fases móviles para la elución de los analitos es muy frecuente para la separación de proteínas debido a la naturaleza anfipática de las proteínas que, a diferencia de las moléculas de bajo peso molecular, interaccionan con la fase estacionaria solo por el extremo hidrofóbico, mientras que las partes hidrofílicas de la misma están en contacto con la fase móvil (Figura 8) [91].

Generalmente, el gradiente comienza con una composición mayoritariamente acuosa en la que las proteínas están retenidas o adsorbidas en la columna por interacciones hidrofóbicas, mediadas por los grupos hidrofóbicos arilos o alquilos apolares que pueden contener grupos funcionales polares (fenilos, amidas, $-\text{NH}_2$, $-\text{CN}$ o $-\text{NO}_2$), e interacciones secundarias, estas últimas producidas entre los grupos polares de las proteínas y los grupos silanoles residuales presentes en las partículas de sílice de la columna, cargados negativamente debido a la composición mayoritariamente acuosa de la fase móvil que favorece la ionización de estos grupos [94]. Durante el avance del gradiente y con el aumento del porcentaje de disolvente orgánico en la fase móvil, la polaridad de la misma disminuye cambiando la distribución de los solutos hacia la fase móvil hasta que a una concentración específica de disolvente orgánico la proteína se desorberá totalmente de la fase estacionaria y se producirá su elución (Figura 8) [91] [92].

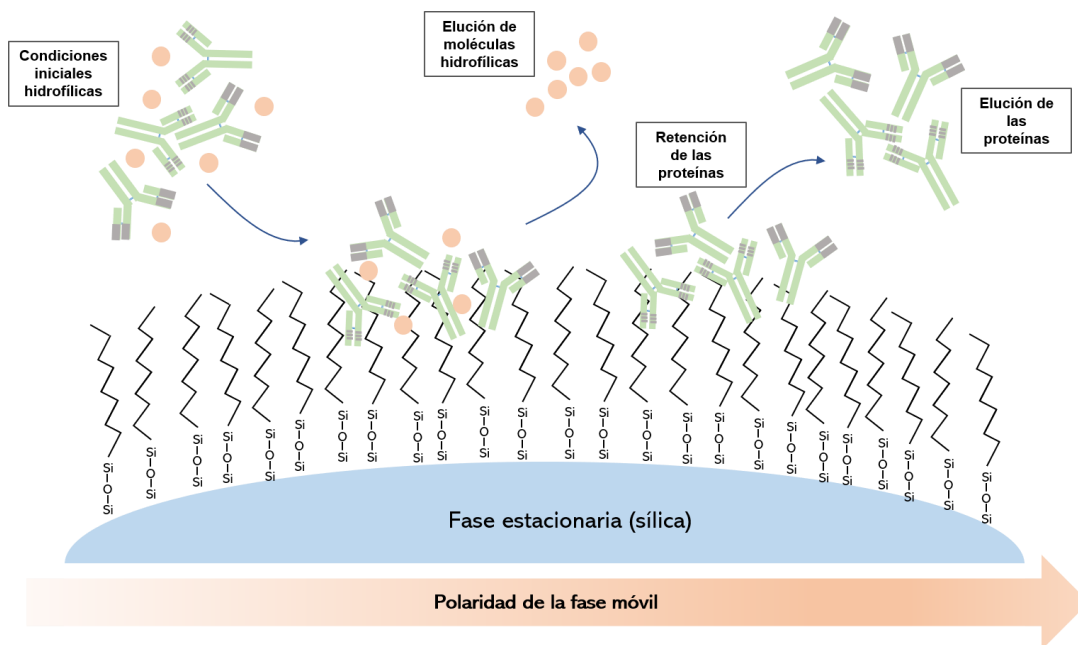


Figura 8. Fundamento de la técnica cromatográfica en fase inversa. Fuente: Elaboración propia.

A pesar de todas estas ventajas que aporta este modo cromatográfico, son muy frecuentes los problemas asociados a la adsorción de las proteínas a la fase estacionaria, a la aparición de interacciones secundarias y a los bajos coeficientes de difusión de los analitos en la fase móvil, sobre todo en el análisis de mAbs intactos que desembocan en la pérdida de sensibilidad y resolución, en la aparición de efectos de contaminación cruzada (*carry-over*), ensanchamiento de los picos (*broadening*) y factor de cola (*peak tailing*) en los picos cromatográficos [92][95]. Estas dificultades son solventadas mediante el diseño de métodos cromatográficos avanzados con condiciones especiales para la caracterización de mAbs, como son:

- A. Uso de **fases estacionarias** menos hidrófobas con cadenas de alquilo más cortas (octil o C_8 y butil o C_4) en lugar de las fases C_{18} (octadecil) convencionales [92][95], basadas en matrices de sílica de naturaleza hidrofóbicas fabricadas con materiales porosos de tipo núcleo fundido (*fused-core*) con partículas de sílice de alta pureza de 3 μm de diámetro [96] y con grandes tamaños de poro de 300 \AA [92][97]. Este tipo de materiales menos porosos, en comparación con los completamente porosos, poseen tasas de difusión mucho menores debido a que

su núcleo es poco penetrable por los analitos, lo que minimiza el ensanchamiento de los picos [92].

- B. Uso de **fases móviles** compuestas por mezclas de disolventes orgánicos como el metanol, el isopropanol y el acetonitrilo [98][99] y con la adición de aditivos de tipo “*ion-pairing*” como el ácido trifluoroacético (*Trifluoroacetic Acid*, TFA) a una concentración baja, entorno al 0.1% [91][92]. A esa concentración de ácido, el pH de las fases móviles estará en torno a 2.5. A este pH, los grupos carboxílicos de las proteínas están protonados y el anión TFA se une a los grupos amino cargados positivamente, formando complejos no cargados y disminuyendo de esta manera la aparición de interacciones secundarias mediadas por grupos silanoles. Éstos pueden tener un impacto negativo en la separación cromatográfica y dar lugar a factor de cola y al ensanchamiento de los picos [92]. Sin embargo, una desventaja de TFA es que puede reducir significativamente la sensibilidad en la detección por espectrometría de masas (ESI/MS), debido a una atenuación de la señal espectrométrica por mala ionización de los analitos. Por esta razón, en cromatografía acoplada a detectores de espectrometría de masas se prefiere el uso de ácido fórmico [100].
- C. El aumento de la **temperatura de las fases móviles** hasta 90°C para la mejora del rendimiento cromatográfico, debido a que con este aumento se reduce la viscosidad de las fases móviles, la difusión del analito en la fase móvil aumenta y la cinética de adsorción se acelera [92][95][101]. Sin embargo, las proteínas son moléculas termolábiles que son fácilmente desnaturizables si se someten a altas temperaturas, por lo que este aumento debe llevarse a cabo mediante un control estricto.

La RPC es por tanto una técnica separativa muy versátil, capaz de acoplarse tanto a detectores de espectrofotometría de absorción UV/Vis (DAD) como a detectores de espectrometría de masas, generalmente con ionización por electrospray (*Electrospray Ionization*, ESI-MS) [102].

Las aplicaciones de la RPC en el ámbito de las proteínas terapéuticas son, en consecuencia, muy numerosas debido a su gran eficiencia, sensibilidad y versatilidad en comparación con otros modos cromatográficos, que la han convertido en una técnica separativa muy usada en la industria biofarmacéutica a varios niveles de caracterización, desde el análisis de proteína intacta, pasando por la determinación de impurezas o la detección de procesos de degradación hasta la secuenciación y composición aminoacídica por espectrometría de masas [95] [103] [104].

Como desventaja de este modo cromatográfico en el análisis de proteínas terapéuticas, mAbs incluidos, está la desnaturalización de la proteína como consecuencia de la composición de la fase móvil, compuesta en parte por disolventes orgánicos, por lo que este modo se clasifica entre los modos cromatográficos desnaturalizantes de análisis de proteínas. Por otro lado, el empleo de disolventes orgánicos presenta como ventaja su idoneidad para el acoplamiento a un detector de espectrometría de masas, ya que la composición de las fases móviles es compatible con este tipo de detectores

4.1.2. Cromatografía de intercambio iónico (IEX)

La IEX es utilizada ampliamente en la separación de moléculas biológicas cargadas como proteínas, péptidos, aminoácidos o nucleótidos. La separación se produce en función de la carga iónica de los analitos gracias a ligandos de intercambio iónico fijados en la superficie de la fase estacionaria que retienen los analitos cargados con carga contraria mediante fuerzas electrostáticas, produciendo una competencia entre los analitos con una carga superficial determinada y los grupos con carga contraria de la columna [105].

En los mAbs, como en la mayoría de las proteínas terapéuticas, los residuos de aminoácidos cuyas cadenas laterales presentan grupos químicos pueden estar cargados positiva y negativamente dependiendo del pH del entorno (fase móvil) y del punto isoeléctrico (pI) propio del mAb. Cuando el pH de la fase móvil sea mayor

al pI ($\text{pH} > \text{pI}$), la carga global neta de la proteína va a ser negativa, y será positiva cuando el pH sea menor al pI ($\text{pH} < \text{pI}$), al igual que no presentará carga neta cuando el pH sea igual al pI ($\text{pH} = \text{pI}$) [106]. Gracias a esta relación entre pH-pI surgen dos modalidades de cromatografía de intercambio iónico para el análisis de las proteínas terapéuticas (Figura 9):

- **Cromatografía de intercambio catiónico o CEX:** en esta modalidad el pH inicial de la fase móviles es menor que el pI de la proteína a analizar ($\text{pH} > 4$). A este pH, las cargas negativas en los grupos carboxílicos de las cadenas laterales de los residuos de los aminoácidos ácidos (que suelen disponerse en la superficie de la misma) se protonan, por lo que “pierden” su carga negativa, mientras que los grupos amino de las cadenas laterales de los residuos de los aminoácidos básicos están protonados, generando así una carga neta positiva en la superficie de la proteína y por tanto una afinidad por las cargas negativas de la resina de intercambio catiónico de la fase estacionaria (Figura 9).
- **Cromatografía de intercambio aniónico o AEX:** por el contrario, en esta modalidad el pH de partida de la fase móvil es mayor al pI de la proteína de interés ($\text{pH} < 10$), lo que implica que los grupos carboxílicos de los residuos de los aminoácidos ácidos estén desprotonados y por tanto cargados negativamente, mientras que grupos amino de las cadenas laterales de los residuos de lo aminoácidos básicos están desprotonados, por tanto sin carga, generando así en la superficie de la proteína una carga neta negativa y una afinidad por las cargas positivas de la resina de intercambio aniónico de la fase estacionaria [92] [106] (Figura 9).

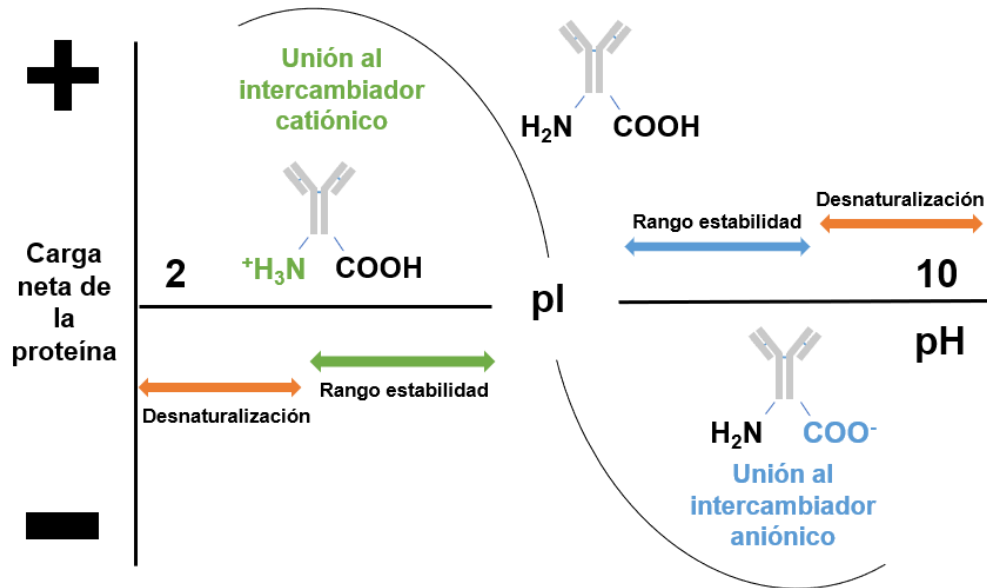


Figura 9. Fundamento de la cromatografía de intercambio iónico en el análisis de mAbs. Fuente modificada: [106].

El empleo de un modo u otro (CEX o AEX) dependerá del predominio de residuos de aminoácidos básicos o ácidos en la proteína terapéutica en cuestión. En el caso concreto de los mAbs (IgG), predominan los aminoácidos básicos, por lo que la CEX es ampliamente utilizada en industria biofarmacéutica para la caracterización de sus variantes de carga, hasta el punto que es considerada como la técnica de referencia para la evaluación cualitativa y cuantitativa de la heterogeneidad de carga de los mAbs [73][105]. Como ya se comentó en la sección 3.1.2, la heterogeneidad de carga de los mAbs es generada por PTMs que ocurren en estas moléculas especialmente durante las etapas de producción y almacenamiento y que son capaces de producir cambios en la carga neta de la proteína dando lugar a las variantes de carga. Estas variantes son isoformas cargadas de la proteína principal que al ser analizadas por CEX, son separadas en variantes ácidas (proteínas con mayor carga positiva y menor RT), variantes principales o neutras (forma mayoritaria de la proteína) y variantes básicas (proteínas con mayor carga negativa y mayor RT) [70]. En la modalidad de AEX, el orden de elución de una proteína terapéutica es el inverso [92][105].

La elección de la resina de intercambio iónico de la fase estacionaria es clave para el desarrollo del método analítico. En CEX, podemos distinguir dos tipos de intercambiadores iónicos: intercambiadores iónicos fuertes (*Strong Ion Exchangers*, SCX), que generalmente contienen grupos fuertemente ácidos como sulfonatos ($-\text{SO}_3^-$) que mantienen su carga negativa incluso a valores de pH por debajo de 2. En cambio, los intercambiadores iónicos débiles (*Weak Ion Exchangers*, WCX), formados generalmente por grupos ácidos débiles como carboximetilos ($-\text{COO}^-$), pueden mantener su capacidad de intercambio iónico en un intervalo de pH más estrecho ($5 \leq \text{pH} \leq 9$) [106][107].

Actualmente, para conseguir adecuadas separaciones de las variantes de carga de los mAbs, se desarrollan métodos CEX empleando un gradiente salino y un gradiente de pH simultáneamente en las fases móviles:

- Gradiente salino: se aplica un gradiente salino creciente, generalmente de cloruro de sodio (NaCl), que compite con las interacciones iónicas entre la proteína y la fase estacionaria, de forma que aquellas que presenten pocos grupos cargados eluirán a bajas concentraciones de sal (RT menores), mientras que las proteínas con muchos grupos cargados eluirán a mayores tiempos de retención, por tanto, a altas concentraciones de sal (RT mayores).
- Gradiente de pH: se aplica en la fase móvil un gradiente de pH lineal alrededor del pI de la proteína, de manera que ésta eluirá cuando el pH del gradiente alcance su pI al cambiar su carga neta que le permitía interactuar con la columna. Para el ajuste del pH se emplean generalmente sales no volátiles tipo tampones fosfatos. El gran inconveniente de este tipo de disoluciones es su imposibilidad de acoplamiento a espectrometría de masas. Por ello, la utilización de sales volátiles a bajas concentraciones, se está empleando como una novedosa alternativa compatible con este tipo de detectores [107] [108] [109]. No obstante, no siempre es posible su utilización debido a que con estas condiciones se dificulta la separación cromatográfica de las variantes de carga proteicas [110]

Por todo esto, la naturaleza de las sales, la concentración de las mismas y el pH de las fases móviles son fundamentales para la eficiencia de la separación cromatográfica, por lo que son parámetros que requieren una adecuada optimización.

En cuanto a la detección, la absorción UV/visible, principalmente mediante DAD, suele ser el sistema de detección más utilizado en estos modos cromatográficos debido al empleo de sales no-volátiles, como se comentó anteriormente. Actualmente y a pesar de los esfuerzos que se realizan para proponer métodos empleando bajas concentraciones de sales volátiles, los métodos más empleados en la industria biofarmacéutica se basan en gradientes de pH o combinaciones de métodos de gradiente salino y de pH, ya que se obtiene una mejor separación y son aplicables a un amplio número de mAbs (con amplio intervalo de pI) como se discute en el capítulo 4 de esta Memoria de Tesis Doctoral.

A diferencia del modo de RPC, una gran ventaja de la modo cromatográfico IEX es que las fases móviles empleadas permiten el análisis de las proteínas en su estado nativo, sin desnaturizar, por lo que se incluye dentro de los modos de cromatografía no desnaturizantes [110].

5. Anticuerpos Monoclonales Estudiados

Los mAbs objeto de estudio de esta Tesis Doctoral son 5 mAbs terapéuticos presentados en su formato comercial del medicamento innovador:

- Bevacizumab (Avastin ®, Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Alemania).
- Cetuximab (Erbix ®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).
- Infliximab (Remicade ®, Janssen Biotech, Horsham, USA).
- Rituximab (MabThera ®, Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlmen, Alemania).
- Trastuzumab (Herceptin®, Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlmen, Alemania).

5.1. Bevacizumab

5.1.1. Características y mecanismo de acción

BVZ es un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado de tipo IgG1 producido por medio de la tecnología de ADN recombinante en células CHO con un peso molecular final del anticuerpo de 149 kDa. Presenta un 93% de regiones humanas y un 7% de regiones murinas donde se localizan las regiones complementarias (CDR) responsables de la unión al VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) [111].

El VEGF se encuentra en el endotelio de vasos sanguíneos y linfáticos y está directamente relacionado con la regulación de la angiogénesis, es decir, del crecimiento de las células endoteliales vasculares derivadas de arterias, venas y vasos linfáticos y de la vasculogénesis, además de tener un papel clave en la permeabilidad vascular, que constituye un factor importante en el proceso de inflamación, sobre todo en los tumores.

Este factor se sobre expresa en numerosos tumores en humanos, entre los que se incluyen los de pulmón, pecho, gastrointestinal, renal y ováricos, aunque de

forma variable. Esta sobreexpresión genera angiogénesis dentro del tumor que provoca el crecimiento incontrolado de vasos sanguíneos que lo oxigenan y lo suplen con nutrientes.

El BVZ se une a la isoforma A (VEGF-A) del factor de crecimiento endotelial con una afinidad similar al anticuerpo original y neutraliza su actividad, impidiendo la unión de éste con sus receptores de membrana VEGFR-1 y VEGFR-2 y por consiguiente produce una regresión de la vascularización del tumor, inhibiendo su expansión y crecimiento (Figura 10). [111][112][113].

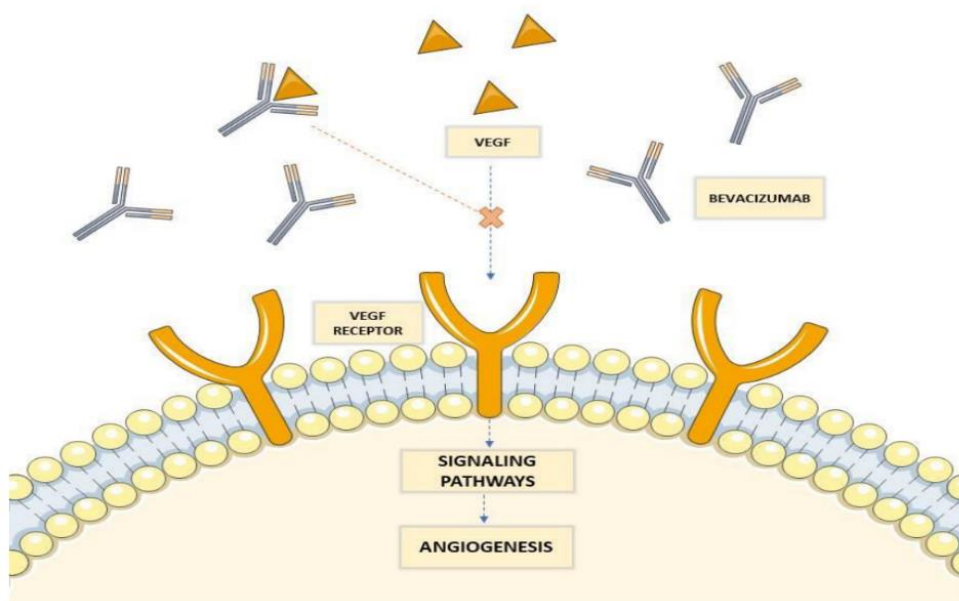


Figura 10. Mecanismo de acción del bevacizumab. Fuente: [113].

5.1.2. Medicamento: forma farmacéutica y composición

Avastin® (Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlmen, Alemania) es el medicamento innovador para el biofármaco BVZ y se presenta como un concentrado de 25 mg/mL para solución por perfusión. Los excipientes en su composición son: trehalosa dihidrato, fosfato disódico, fosfato monosódico monohidratado, polisorbato 20 y agua para inyectables [112].

Actualmente hay dos biosimilares en el mercado europeo: Mvasi® (Amgen Technology, Dublin, Irlanda), [114], autorizado en enero de 2018 y Zirabev® (Pfizer Europe MA EEIG, Bruselas, Bélgica) [115], autorizado en febrero de 2019. Ambos han sido autorizados por la EMA al evaluar los ensayos de bioequivalencia tras la expiración de la patente del medicamento Avastin en 2018 [116]. Todos estos datos se consideraron suficientes para concluir que ambos medicamentos se comportarán de la misma manera que el innovador en términos de efectividad y seguridad en sus usos autorizados.

5.1.3. Indicaciones terapéuticas

Avastin® fue aprobado por la FDA en 2004 y por la EMA en enero de 2005 para el tratamiento de cáncer metastásico colorrectal avanzado en combinación con quimioterápicos de tipo fluoropirimidínico [112]. En la actualidad posee muchas indicaciones terapéuticas, tales como el tratamiento de cáncer de mama metastásico en combinación con paclitaxel, para el tratamiento de cáncer de pulmón no microcítico metastásico, cáncer de células renales, cáncer de ovario epitelial, de trompa de Falopio y peritoneal primario [111].

5.2. Cetuximab

5.2.1. Características y mecanismo de acción

CTX es un anticuerpo monoclonal recombinante quimérico de tipo IgG1 producido a partir de la tecnología de ADN recombinante. Éste se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), con una afinidad mucho mayor que los ligandos endógenos, de hasta 10 veces superior [117].

El EGFR se encuentra en la superficie de todas las células y está implicado en numerosas funciones relacionados con la proliferación tumoral como la migración

celular, la angiogénesis, la metástasis tumoral y la supervivencia celular. El CTX realiza una función triple sobre el EGFR: bloquea los receptores del EGFR en la superficie de los tumores evitando la proliferación celular y favoreciendo la muerte de las células tumorales, favorece la internalización del EGFR lo que provoca una disminución de los receptores en su superficie y desencadena la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) contra las células cancerosas que sobre expresan EGFR, mediante la unión a receptores tipo FCyRIII expresados en células NK (*Natural Killer*) y macrófagos (Figura 11) [117][118][119].

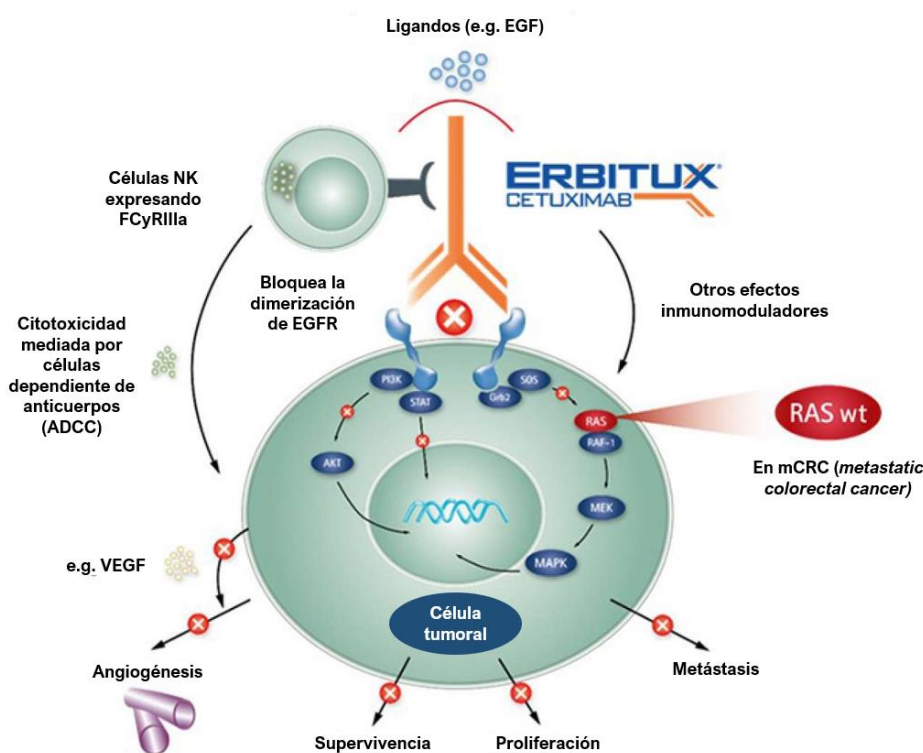


Figura 11. Mecanismo de acción del cetuximab. Fuente adaptada: [119].

5.2.2. Medicamento: forma farmacéutica y composición

Erbix® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) es el medicamento innovador para el biofármaco cetuximab que se presenta en solución para perfusión con una

concentración de 5 mg/mL. Los excipientes que forman parte de su composición son: Cloruro de sodio, glicina, polisorbato 80, ácido cítrico mono hidrato, hidróxido de sodio y agua para preparaciones inyectables [117].

Erbix® fue aprobado en febrero de 2004 por la FDA y en junio de ese mismo año por la EMA, y posteriormente sus patentes han expirado en 2016 para el mercado americano y en 2014 para el mercado europeo [120][116]. Multitud de compañías biofarmacéuticas se encuentran desarrollando biosimilares de este biofármaco, aunque la mayoría de los candidatos están todavía en desarrollo preclínico como el ABP 494 (Amgen Technology, Dublín, Irlanda), CT-P15 (Celltrion Healthcare, Inchon, Corea del Sur) o Mabion EGFR (Mabion S.A, Konstantynów Łódzki, Polonia). Solo el candidato biosimilar STI-001/CMAB009 (Sorrento Therapeutics/ MabTech Inc., Estocolmo, Suecia) ha completado satisfactoriamente ensayos clínicos en fase 3, en combinación con irinotecan, un quimioterápico utilizado para el tratamiento de cáncer de colon y de recto [121].

5.2.3. Indicaciones terapéuticas

CTX está indicado principalmente para el tratamiento de dos tipos de cánceres:

- Cáncer colorrectal metastásico con gen RAS nativo y con expresión de EGFR.
- Cáncer de células escamosas de cabeza y cuello combinado en radioterapia para casos avanzados [118].

5.3. Infliximab

5.3.1. Características y mecanismo de acción

INF es un anticuerpo monoclonal de tipo IgG1 quimérico humano-murino, con alrededor de un 25% de su estructura murina y un 75% humano, generado a partir

de células de hibridoma murinas mediante la tecnología de ADN recombinante [122].

Este mAb forma parte del grupo terapéutico de los inmunosupresores e inhibidores del factor de necrosis tumoral α o TNF α (*Tumor Necrosis Factor*). El TNF α es una citoquina secretada por una gran variedad de células del sistema inmune como los linfocitos T, los macrófagos, las células NK o los mastocitos y no inmunes como los fibroblastos, las neuronas o los queratinocitos. Está implicada en una gran variedad de procesos biológicos, tanto fisiológicos como patológicos como la necrosis y apoptosis celular de células tumorales, la mediación en procesos inflamatorios agudos y crónicos y la estimulación de la producción de otras citoquinas como las Th1 y quimioquinas proinflamatorias, por lo que tiene una relación directa en los procesos patológicos inflamatorios y autoinmunes. Por ello, el TNF α se ha convertido en un importante factor de riesgo de tumorigénesis, progresión tumoral, invasión y metástasis [123][124][125].

INF se une con una gran afinidad al TNF α , tanto a su forma soluble (sTNF) como a la forma transmembrana (tmTNF) y tiene la capacidad de unirse a la forma monómero de 17kDa y a la forma de trímero de 51kDa del sTNF, uniéndose cada molécula de INF a dos trímeros, al ser una molécula bivalente [124]. Al unirse forma complejos estables con el TNF α que desembocan en una inhibición de la actividad de esta citoquina, interrumpiendo la reacción inflamatoria tisular que desencadena (ver Figura 12). Además, el INF es capaz de unirse directamente a células del sistema inmunitario, como los linfocitos T o macrófagos.

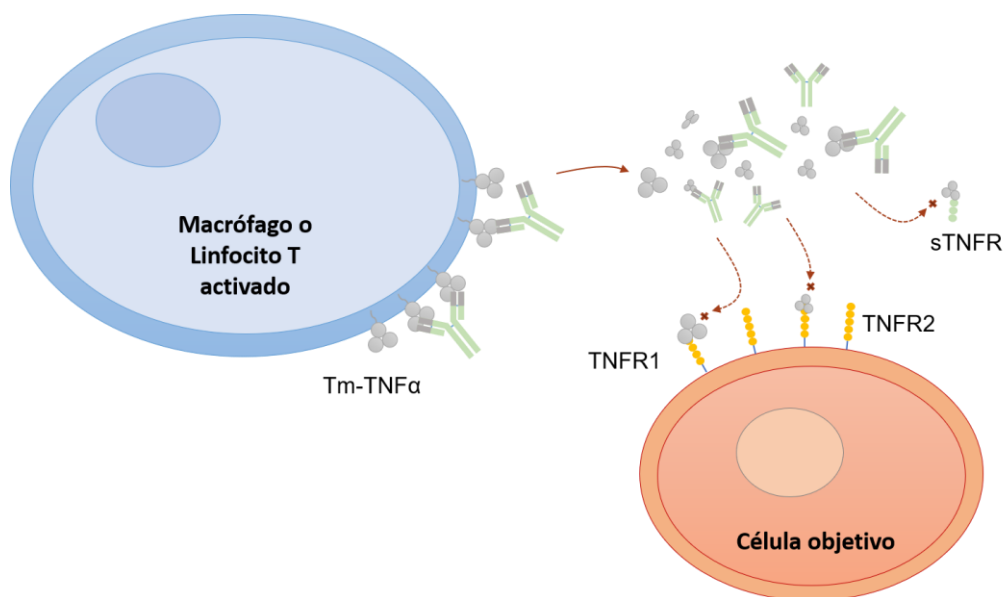


Figura 12. Mecanismo de acción del infliximab. Fuente: Elaboración propia.

5.3.2. Medicamento: forma farmacéutica y composición

Remicade® (Janssen Biotech, Horsham, Pennsylvania, USA) es el medicamento innovador para el biofármaco INF que se presenta en polvo liofilizado para concentrado (100 mg) para solución para perfusión. Los excipientes que forman parte de su composición son: sacarosa, polisorbato 80, fosfato sódico monobásico y fosfato sódico dibásico [122]. Este medicamento fue aprobado en el año 1998 por la FDA y en agosto de 1999 por la EMA. La patente de este medicamento expiró en Europa en 2015 y hasta 2018 no expiró para EEUU, por lo que hasta 4 biosimilares han sido aprobados tanto en Europa como en EEUU hasta la fecha [116]:

- Flixabi® (Biogen Netherlands B.V, Badhoevedorp, Países Bajos). Fecha de autorización 26/05/2016 [126].
- Inflectra® (Pfizer Europe MA EEIG, Bruselas, Bélgica). Fecha de autorización 10/09/2013 [127].
- Remsima® (Celltrion Healthcare Hungary Kft, Budapest, Hungría). Fecha de autorización 10/09/2013 [128].

- Zessly® (Sandoz GmbH, Langkampfen, Austria). Fecha de autorización 18/05/2018 [129].

5.3.3. Indicaciones terapéuticas

INF es un medicamento usado para tratamiento de enfermedades autoinmunes relacionadas con procesos inflamatorios. Por lo general, se usa en adultos cuando otros medicamentos o tratamientos han fallado, para las siguientes enfermedades: Artritis Reumatoide, Enfermedad de Crohn, Colitis ulcerosa, Espondilitis anquilosante, Artritis psoriásica y Psoriasis [122][125].

5.4. Rituximab

5.4.1. Características y mecanismo de acción

RTX es un anticuerpo monoclonal glicosilado de tipo IgG1 quimérico murino/humano anti-CD20 con un gran eficacia en tratamientos a pacientes con enfermedades linfoides que sobre expresan el antígeno CD20, expresado en los linfocitos B maduros y que está presente en más del 95% de los linfomas no Hodgkin de células B en los linfocitos B, incluyendo formas agresivas de este linfoma [130].

Este mAb se une al antígeno CD20 a través de las regiones variables murinas (región Fab) con una gran especificidad y elimina a las células afectadas por este antígeno mediante 4 vías diferentes (ver Figura 13) [76][131]:

- Citotoxicidad dependiente de complemento o CDC. La fracción Fc del RTX se une al CD20 de la célula tumoral, que genera una reorganización de las moléculas de CD20 en dominios lipídicos que activan el sistema del complemento que da lugar a la lisis de la célula y el aumento de la fagocitosis.
- Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos o ADCC. Ocurre como resultado de la interacción de la fracción Fc del RTX unidas a las células

tumorales y los receptores FcRs presentes en la superficie de las células del sistema inmune como NK.

- Fagocitosis celular dependiente de anticuerpos. La fracción Fc del RTX y los fragmentos de complemento depositados en la célula tumoral permiten el reconocimiento de ambos FcR y receptores del complemento por macrófagos, lo que conduce a la fagocitosis y ADCC.
- Apoptosis no clásica: La unión de RTX al antígeno CD20 se cree que induce la muerte celular por apoptosis no clásica por *crosslinking* o reticulación de moléculas de RTX y CD20 en los dominios lipídicos.

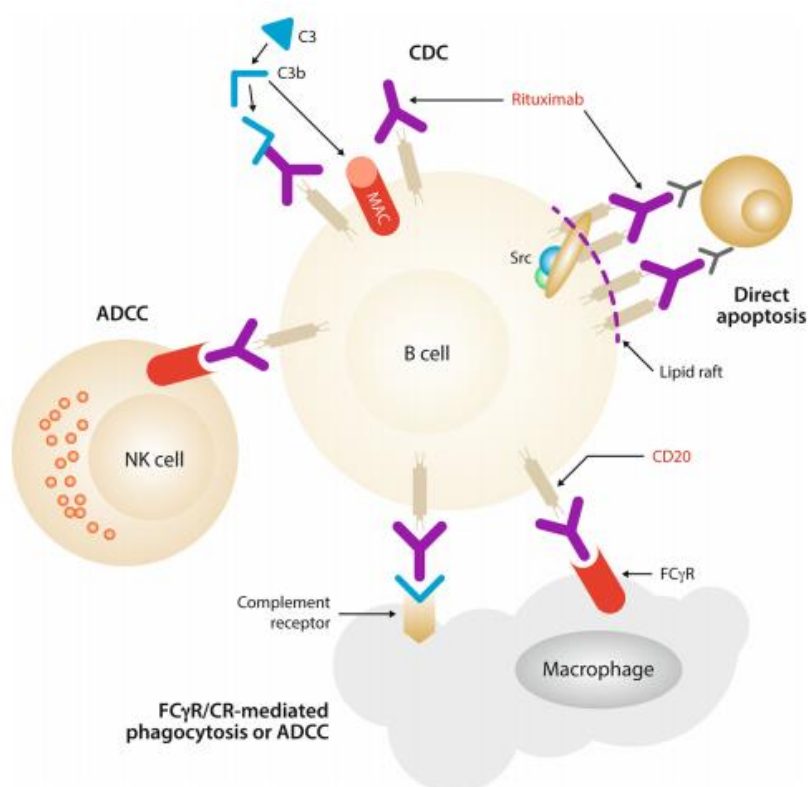


Figura 13. Mecanismo de acción del rituximab. Fuente: [76].

5.4.2. Medicamento: forma farmacéutica y composición

MabThera® (Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Alemania) es el medicamento innovador para el biofármaco RTX que se presenta en concentrado

para solución para perfusión. Los excipientes presentes son: Citrato sódico, Polisorbato 80, Cloruro de sodio, Hidróxido de sodio, Ácido clorhídrico y Agua para preparaciones inyectables [130].

MabThera® fue aprobado en noviembre del 1997 por la FDA y en junio del 1998 por la EMA para su uso en terapia intravenosa contra el linfoma no Hodgkin refractario y en el año en 2010 fue aprobado para su uso en leucemia linfocítica crónica. Por ello, RTX se convirtió en el primer anticuerpo monoclonal terapéutico para uso oncológico, estableciendo una nueva clase de medicamentos anticancerosos. Actualmente existen 6 biosimilares en el mercado europeo que surgieron tras expirar la patente del medicamento MabThera® en los EE. UU. en septiembre de 2016 y en Europa en febrero de 2013 [116]:

- Blitzima® , Ritemvia® y Rituzena® (Celltrion Healthcare Hungary Kft, Budapest, Hungría autorizados el 13/07/2017 [132][133][134], este último retirado del mercado por razones comerciales el 5 de julio de 2019 por parte del propio laboratorio Celltrion.
- Rixathon® y Riximyo® (Sandoz GmbH, Langkampfen, Austria): autorizados el 15/06/2017 [135][136].
- Ruxience® (Pfizer Europe MA EEIG, Bruselas, Bélgica) autorizados el 01/04/2020 [137].
- Truxima® (Celltrion Healthcare Hungary Kft, Budapest, Hungría): autorizado el 17/02/2017 [138].

5.4.3. Indicaciones terapéuticas

El RTX está aprobado para las siguientes indicaciones: Linfoma no-Hodgkin (LNH), Leucemia linfática crónica (LLC), Artritis reumatoide, Granulomatosis con poliangeítis y poliangeítis microscópica y Pénfigo vulgar [130].

5.5. Trastuzumab

5.5.1. Características y mecanismo de acción

TTZ es un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado que actúa bloqueando el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2), concretamente de su dominio extracelular IV, produciendo una inhibición de las vías de señalización intracelulares del mismo que promueven una proliferación de células tumorales, además de efectos anti-angiogénesis y como mediador de ADCC [139].

HER-2 está sobreexpresado en el 15-30% de los cánceres de mama y tiene un pronóstico adverso, ya que se trata de un subtipo de cáncer de mama caracterizado por un alto riesgo de recurrencia y metástasis y reducción de la supervivencia general [139][140]. Además, se encuentra sobreexpresado en células tumorales de ovario, gástrico y de glándulas salivares. TTZ inhibe la vía de señalización del HER-2 independiente de ligando y evita la división proteolítica de su dominio extracelular inhibiendo la proliferación de las células tumorales, además de la activación del mecanismo ADCC, interviniendo células del sistema inmune como las células NK, neutrófilos o macrófagos que son atraídas hacia las células tumorales que sobreexpresan HER-2 donde realizan su función citotóxica (Figura 14) [141].

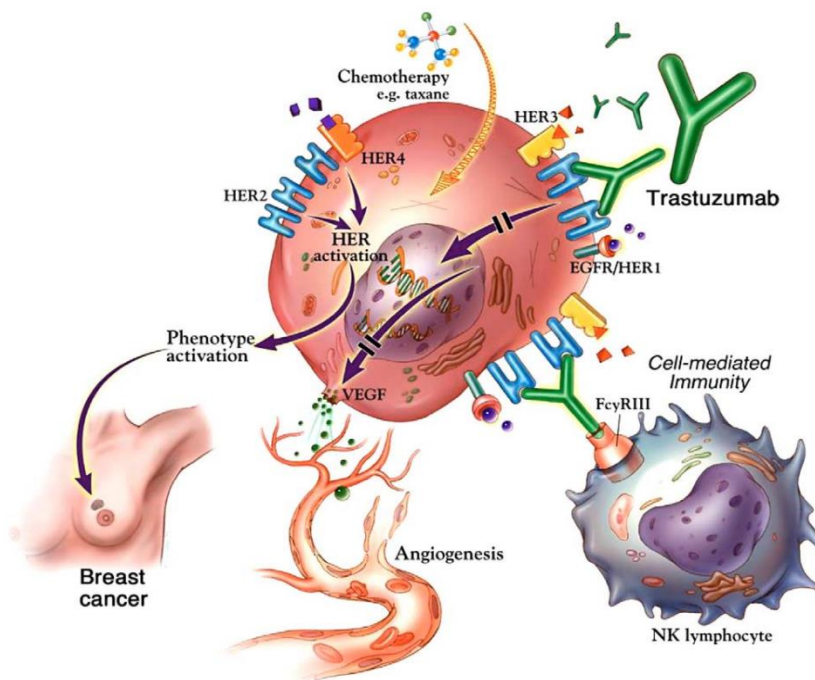


Figura 14. Mecanismo de acción del trastuzumab. Fuente: [142].

5.5.2. Medicamento: forma farmacéutica y composición

Herceptin® (Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlmen, Alemania) es el medicamento innovador para el biofármaco TTZ que se presenta en polvo para concentrado para solución para perfusión. Los excipientes que lo componen son: L-histidina hidrocloreto monohidrato, L-histidina, α,α -trehalosa dihidrato y polisorbato 20 [139].

Herceptin® fue aprobado en septiembre de 1998 por la FDA y en agosto de 2000 por la EMA para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico HER-2 positivos. Tras expirar su patente en junio de 2019 en EEUU y en julio de 2014 en la Unión Europea [116], 6 biosimilares se han aprobado en el mercado farmacéutico europeo, todos ellos para tratamientos para cáncer de mama precoz (EBC) HER-2 positivo cáncer de mama metastásico y cáncer de estómago metastásico:

- Ontruzant® (Samsung Bioepis NL B.V., Delf, Países Bajos) autorizado en noviembre de 2017 [143].
- Herzuma® (Celltrion Healthcare Hungary Kft., Budapest, Hungría): autorizado en febrero de 2018 [144].
- Kanjinti® (Amgen Europe B.V., Breda, Países Bajos): autorizado en mayo de 2018 [145].
- Trazimera (Pfizer Europe MA EEIG, Bruselas, Bélgica) autorizado en julio de 2018 [146].
- Zercepac (Accord Healthcare S.L.U., Barcelona, España) autorizado en julio de 2020 [147].
- Ogivri® (Mylan Germany GmbH, Hessen, Alemania): autorizado en diciembre de 2018 [148].

5.5.3. Indicaciones terapéuticas

El TTZ es un biofármaco indicado para las siguientes indicaciones terapéuticas: cáncer de mama metastásico, cáncer de mama precoz y cáncer gástrico metastásico [139].

Bibliografía

- [1] Reglamento (CE) no 726/2004: procedimientos de la UE para la autorización y el control de los medicamentos de uso humano y veterinario y por el que se crea la Agencia Europea de Medicamentos, European Medicines Agency, London (UK) 2004.
- [2] G. Walsh, "biologics and biopharmaceuticals", en *Biopharmaceuticals, Biochemistry and biotechnology second edition*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Ed. London (UK), 2003, pp. 1–40.
- [3] Real Decreto-ley 1345/2007, de 11 de octubre de 2007: procedimiento de autorización, registro y condiciones de dispensación de los medicamentos de uso humano fabricados industrialmente," Jefatura de Estado, *BOE n° 275*, pp. 45652–45698, 2007.
- [4] S.Q. Eduardo, F.F. Laura, "Medicamentos Biotecnológicos: Conceptos básicos y relevancia en el contexto clínico" 2008, *Tendencias en Medicina*, Oct 2008. http://www.tendenciasenmedicina.com/imagenes/imagenes33/art_03.pdf.
- [5] V. Thomaz-Soccol, A. Pandey, R. R. Resende, "Current Developments in Biotechnology and Bioengineering". Elsevier, Amsterdam (The Netherlands), 2017.
- [6] División de Productos Biológicos, Terapias Avanzadas y Biotecnología, Agencia Española del Medicamento, https://www.aemps.gob.es/laaemps_estructura_humanos_biológicos/. (Consultado en Febrero de 2021)
- [7] La Agencia Europea de Medicamentos en 2007: Resumen del decimotercero informe anual de la EMEA, European Medicines Agency, London (UK) 2008.
- [8] S. Ruiz, "Evaluación de medicamentos biotecnológicos en la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), BWP (Grupo de Biológicos) y CHMP (Comité de Medicamentos de Uso Humano)", European Medicines Agency, pp. 129–135, London (UK) 2006.
- [9] Applying for EU marketing authorisation (MAA) for human use, European Medicines Agency (EMA), Ámsterdam (The Netherlands) (2021). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Brochure/2011/03/WC500104233.pdf (Consultado en Febrero de 2021)
- [10] FDA, "Biologics License Application (BLA) Process (CBER)," 2021. [Online]. Disponible: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/development-approval-process-cber/biologics-license-applications-bla-process-cber> (Consultado en Febrero de 2021).
- [11] Equivalencias terapéuticas de los medicamentos biotecnológicos, INESME (Instituto de Estudios Médico Científicos), Madrid, 2009.

- [12] S. Globberman, "Intellectual Property Rights and the Promotion of Biologics, Medical Devices, and Trade in Pharmaceuticals," Fraser Institute, Ed. Vancouver (Canada) pp. 1–98, 2016.
- [13] Los biosimilares en la UE: Guía informativa para profesionales sanitarios, European Medicines Agency (EMA), Ámsterdam (The Netherlands) (2017).
- [14] A. Kuriakose, N. Chirmule, and P. Nair, "Immunogenicity of Biotherapeutics: Causes and Association with Posttranslational Modifications," *J. Immunol. Res.*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/1298473.
- [15] N. Ahmadi, K. Khosravi-Darani, and A. M. Mortazavian, "An overview of biotechnological production of propionic acid: From upstream to downstream processes," *Electron. J. Biotechnol.*, vol. 28, pp. 67–75, 2017, doi: 10.1016/j.ejbt.2017.04.004.
- [16] Productos Bioterapéuticos Similares Consideraciones científicas y regulatorias, *International Federation of Pharmaceutical Manufacturers & Associations*, 2013. Disponible: https://www.ifpma.org/wp-content/uploads/2016/01/IFPMA_BiosimilarSpanishWEB.pdf (Consultado en Marzo de 2021).
- [17] W. H. Boehncke and N. C. Brembilla, "Immunogenicity of biologic therapies: causes and consequences," *Expert Rev. Clin. Immunol.*, vol. 14, no. 6, pp. 513–523, 2018, doi: 10.1080/1744666X.2018.1468753.
- [18] D. Girault *et al.*, "Biosimilaires : de la technique au médicoéconomique," *Therapies*, vol. 70, no. 1, pp. 37–46, 2015, doi: 10.2515/therapie/2014233.
- [19] W. S. Putnam, S. Prabhu, Y. Zheng, M. Subramanyam, and Y. M. C. Wang, "Pharmacokinetic, pharmacodynamic and immunogenicity comparability assessment strategies for monoclonal antibodies," *Trends Biotechnol.*, vol. 28, no. 10, pp. 509–516, 2010, doi: 10.1016/j.tibtech.2010.07.001.
- [20] Guía de medicamentos biosimilares para farmacéuticos, Asociación Española de Biosimilares, 2019. [Online]. Disponible: <https://www.portalfarma.com/Profesionales/medicamentos/Documents/2019-Guia-Biosimilares-Farmaceuticos.pdf> (Consultado en Marzo de 2021).
- [21] F. D. Makurvet, "Biologics vs. small molecules: Drug costs and patient access," *Med. Drug Discov.*, vol. 9, p. 100075, 2021, doi: 10.1016/j.medidd.2020.100075.
- [22] Anticuerpos monoclonales terapéuticos, Genoma España y la Fundación General de la Universidad Autónoma de Madrid, Madrid (2008).

- [23] A. F. U. H. Saeed, R. Wang, S. Ling, and S. Wang, "Antibody engineering for pursuing a healthier future," *Front. Microbiol.*, vol. 8, no. MAR, pp. 1–28, 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.00495.
- [24] A. Thomas, B. A. Teicher, and R. Hassan, "Antibody–drug conjugates for cancer therapy," *Lancet Oncol.*, vol. 17, no. 6, pp. e254–e262, 2016, doi: 10.1016/S1470-2045(16)30030-4.
- [25] A. F. Labrijn, M. L. Janmaat, J. M. Reichert, and P. W. H. I. Parren, "Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 18, no. 8, pp. 585–608, 2019, doi: 10.1038/s41573-019-0028-1.
- [26] E. Wolf *et al.*, "T cells as prime enemies of tumor cells," *Drug Discov. Today*, vol. 10, no. 18, pp. 1237–1243, 2005,
- [27] W. Strohl, "Antibody Discovery: Sourcing of Monoclonal Antibody Variable Domains," *Curr. Drug Discov. Technol.*, vol. 11, no. 1, pp. 3–19, 2014, doi: 10.2174/1570163810666131120150043.
- [28] H. Liu and K. May, "Disulfide bond structures of IgG molecules: Structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function," *MAbs*, vol. 4, no. 1, pp. 17–23, 2012, doi: 10.4161/mabs.4.1.18347.
- [29] R. F. Montaña and S. L. Morrison, "Influence of the Isotype of the Light Chain on the Properties of IgG," *J. Immunol.*, vol. 168, no. 1, pp. 224–231, 2002, doi: 10.4049/jimmunol.168.1.224.
- [30] G. Vidarsson, G. Dekkers, and T. Rispens, "IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions," *Front. Immunol.*, vol. 5, no. Oct, pp. 1–17, 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00520.
- [31] M. Spearman, B. Dionne, and M. Butler, "The Role of Glycosylation in Therapeutic Antibodies," *Antibody Expression and Production*, vol. 7, pp 251-292, 2011, doi https://doi.org/10.1007/978-94-007-1257-7_12
- [32] M. Dondelinger *et al.*, "Understanding the significance and implications of antibody numbering and antigen-binding surface/residue definition," *Front. Immunol.*, vol. 9, no. Oct, pp. 1–15, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.02278.
- [33] E. Gabrielli *et al.*, "Antibody complementarity-determining regions (cdrs): A bridge between adaptive and innate immunity," *PLoS One*, vol. 4, no. 12, pp. 1–12, 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0008187.
- [34] H Sakahara 1, T Saga, H Onodera, Z Yao, Y Nakamoto, M Zhang, N Sato, H Nakada, I

- Yamashina, K Endo, J Konishi, "Anti-murine antibody response to mouse monoclonal antibodies in cancer patients", *Jpn J Cancer Res*, vol. 88, no 9, pp. 895-9,1997. doi: 10.1111/j.1349-7006.1997.tb00466.x.
- [35] A. L. Grilo, A. Mantalaris, "The Increasingly Human and Profitable Monoclonal Antibody Market," *Trends Biotechnol.*, vol. 37, no. 1, pp. 9–16, 2019, doi: 10.1016/j.tibtech.2018.05.014.
- [36] World Health Organization (WHO), "International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (a review)," *World Heal. Organ.*, pp. 8–10, 2014.
- [37] J. Ai , A. Advani, "Current status of antibody therapy in ALL," *Br. J. Haematol.*, vol. 168, no. 4, pp. 471–480, 2015, doi: 10.1111/bjh.13205.
- [38] H. Kaplon, J. M. Reichert, "Antibodies to watch in 2021," *MAbs*, vol. 13, no. 1, 2021, doi: 10.1080/19420862.2020.1860476.
- [39] Enfermedades no transmisibles, Organización Mundial de la Salud, 2021. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases> (Consultado en Marzo de 2021).
- [40] T. B. research Company, "Monoclonal Antibodies (MAbS) Global Market Report 2020-30: Covid 19 Impact And Recovery," *Monoclonal Antibodies (MAbS) Global Market Report 2020-30: Covid 19 Impact And Recovery*, 2020.
- [41] Monoclonal Antibodies (MAbS) Market 2021 Global Industry Analysis, Opportunities, Size, Trends, Growth and Forecast 2030, 2021. <https://www.marketwatch.com/press-release/monoclonal-antibodies-mabs-market-2021-global-industry-analysis-opportunities-size-trends-growth-and-forecast-2030-2021-01-11?tesla=y> (Consultado en Marzo de 2021).
- [42] Top drugs and pharmaceutical companies of 2019 by revenues, 2020 <https://www.pharmacompass.com/radio-compass-blog/top-drugs-and-pharmaceutical-companies-of-2019-by-revenues>. (Consultado en Marzo de 2021).
- [43] Rendimiento de ventas, datos y rankings de mAbs terapeuticos, 2021. https://www.pmlive.com/top_pharma_list/pharmaceutical_products (Consultado en Marzo de 2021).
- [44] E. Moorkens, C. Jonker-Exler, I. Huys, P. Declerck, S. Simoens, and A. G. Vulto, "Overcoming barriers to the market access of biosimilars in the European union: The case of biosimilar monoclonal antibodies," *Front. Pharmacol.*, vol. 7, no. Jun, 2016, doi: 10.3389/fphar.2016.00193.

- [45] ICH guidelines: The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, <https://www.ich.org/> (Consultado en Abril de 2021).
- [46] S. Ghani, ICH Quality Guidelines: An Implementation Guide, John Wiley & Sons, Ed. London (UK), 2018.
- [47] Food and Drug Administration (FDA). Vaccines, Blood & Biologics, 2021. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics> (Consultado en Abril de 2021).
- [48] European Medicines Agency (EMA), Ámsterdam (Netherlands), 2021. <https://www.ema.europa.eu/en> (Consultado en Abril de 2021).
- [49] United Kingdom National Health Service (NHS), 2021." <https://www.nhs.uk/> (Consultado en Abril de 2021).
- [50] ICH Q1A(R2), Stability testing of new drug substances and products, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva (Switzerland), 2003.
- [51] ICH Q1B, Stability testing: photostability testing of new drug substances and products, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva (Switzerland), 1996.
- [52] ICH Q2(R1), Validation of analytical procedures: text and methodology, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva (Switzerland), 2005.
- [53] ICH Q5A(R1), Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva (Switzerland), 1999.
- [54] ICH Q5A(R2), Stability testing of new drug substances and products, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva (Switzerland), 1999.
- [55] ICH Q5B, Quality of biotechnological products. analysis of the expression construct in cells used for production of r-dna derived protein products, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals, Geneva (Switzerland), 1995.
- [56] ICH Q5C, Stability testing of biotechnological/biological products, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human

- Use, Geneva (Switzerland), 1995.
- [57] ICH Q5E, Comparability of biotechnological/biological products subject to changes in their manufacturing process, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human, Geneva (Switzerland), 2004.
- [58] ICH Q6B, Test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva (Switzerland), 1999.
- [59] ICH Q8(R2), Pharmaceutical development, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva (Switzerland), 2009.
- [60] ICH Q14, Analytical Procedure Development and Revision of Q2(R1) Analytical Validation, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva (Switzerland), 2018.
- [61] N. Alt, T. Y. Zhang, P. Motchnik, R. Taticek, V. Quarmby, T. Schlothauer, H. Beck, T. Emrich and R. J. Harris, "Determination of critical quality attributes for monoclonal antibodies using quality by design principles," *Biologicals*, vol. 44, no. 5, pp. 291–305, 2016.
- [62] ICH Q9, Quality risk management, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva (Switzerland), 2005.
- [63] H. Maity, A. Wei, E. Chen, J. N. Haidar, A. Srivastava, and J. Goldstein, "Comparison of predicted extinction coefficients of monoclonal antibodies with experimental values as measured by the Edelhoch method," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 77, pp. 260–265, 2015, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.03.027.
- [64] H. J. Stemmler, M. Schmitt, A. Willems, H. Bernhard, N. Harbeck, and V. Heinemann, "Ratio of trastuzumab levels in serum and cerebrospinal fluid is altered in HER2-positive breast cancer patients with brain metastases and impairment of blood-brain barrier," *Anticancer. Drugs*, vol. 18, no. 1, pp. 23–28, 2007, doi: 10.1097/01.cad.0000236313.50833.ee.
- [65] S. Grotefend *et al.*, "Protein quantitation using various modes of high performance liquid chromatography," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 71, pp. 127–138, 2012, doi: 10.1016/j.jpba.2012.08.024.
- [66] V. González-Núñez, "Modificaciones postraduccionales de las proteínas," Universidad de Salamanca. <https://diarium.usal.es/vgnunez/files/2012/11/9.-Modificaciones->

Postraduccionales-de-las-Proteinas.pdf (Consultado en Abril de 2021).

- [67] F. Torkashvand and B. Vaziri, "Main quality attributes of monoclonal antibodies and effect of cell culture components," *Iran. Biomed. J.*, vol. 21, no. 3, pp. 131–141, 2017, doi: 10.18869/acadpub.ibj.21.3.131.
- [68] T. Zhang, J. Bourret, and T. Cano, "Isolation and characterization of therapeutic antibody charge variants using cation exchange displacement chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, no. 31, pp. 5079–5086, 2011, doi: 10.1016/j.chroma.2011.05.061.
- [69] Y. Du, A. Walsh, R. Ehrick, W. Xu, K. May, and H. Liu, "Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies," *MAbs*, vol. 4, no. 5, pp. 578–585, 2012, doi: 10.4161/mabs.21328.
- [70] E. Wagner-Rousset *et al.*, "Development of a fast workflow to screen the charge variants of therapeutic antibodies," *J. Chromatogr. A*, vol. 1498, pp. 147–154, 2017, doi: 10.1016/j.chroma.2017.02.065.
- [71] A. Eon-Duval, H. Broly, and R. Gleixner, "Quality attributes of recombinant therapeutic proteins: An assessment of impact on safety and efficacy as part of a quality by design development approach," *Biotechnol. Prog.*, vol. 28, no. 3, pp. 608–622, 2012, doi: 10.1002/btpr.1548.
- [72] X. Zhong and J. F. Wright, "Biological insights into therapeutic protein modifications throughout trafficking and their biopharmaceutical applications," *Int. J. Cell Biol.*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/273086.
- [73] S. Gandhi *et al.*, "Elucidation of degradants in acidic peak of cation exchange chromatography in an IgG1 monoclonal antibody formed on long-term storage in a liquid formulation," *Pharm. Res.*, vol. 29, no. 1, pp. 209–224, 2012, doi: 10.1007/s11095-011-0536-0.
- [74] D. Chelius, D. S. Render, and P. V. Bondarenko, "Identification and characterization of deamidation sites in the conserved regions of human immunoglobulin gamma antibodies," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 18, pp. 6004–6011, 2005, doi: 10.1021/ac050672d.
- [75] J. Kim *et al.*, "Characterization of a unique IgG1 mAb CEX profile by limited Lys-C proteolysis/CEX separation coupled with mass spectrometry and structural analysis," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 878, no. 22, pp. 1973–1981, 2010, doi: 10.1016/j.jchromb.2010.05.032.
- [76] G. Salles *et al.*, "Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies: A Review of 20 Years of Clinical Experience," *Adv. Ther.*, vol. 34, no. 10, pp. 2232–2273, 2017, doi: 10.1007/s12325-017-0612-x.

- [77] K. Brorson and A. Y. Jia, "Therapeutic monoclonal antibodies and consistent ends: Terminal heterogeneity, detection, and impact on quality," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 30, pp. 140–146, 2014, doi: 10.1016/j.copbio.2014.06.012.
- [78] J. M. Yang *et al.*, "Investigation of the correlation between charge and glycosylation of IgG1 variants by liquid chromatography-mass spectrometry," *Anal. Biochem.*, vol. 448, no. 1, pp. 82–91, 2014, doi: 10.1016/j.ab.2013.11.020.
- [79] C. Váradi, C. Jakes, and J. Bones, "Analysis of cetuximab N-Glycosylation using multiple fractionation methods and capillary electrophoresis mass spectrometry," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 180, p. 113035, 2020, doi: 10.1016/j.jpba.2019.113035.
- [80] L. Tang *et al.*, "Conformational characterization of the charge variants of a human IgG1 monoclonal antibody using H/D exchange mass spectrometry," *MABs*, vol. 5, no. 1, pp. 114–125, 2013, doi: 10.4161/mabs.22695.
- [81] M. Blessy, R. D. Patel, P. N. Prajapati, and Y. K. Agrawal, "Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review," *J. Pharm. Anal.*, vol. 4, no. 3, pp. 159–165, 2014, doi: 10.1016/j.jpha.2013.09.003.
- [82] C. Nowak *et al.*, "Forced degradation of recombinant monoclonal antibodies: A practical guide," *MABs*, vol. 9, no. 8, pp. 1217–1230, 2017, doi: 10.1080/19420862.2017.1368602.
- [83] P. Qi *et al.*, "Characterization of the photodegradation of a human IgG1 monoclonal antibody formulated as a high-concentration liquid dosage form," *J. Pharm. Sci.*, vol. 98, no. 9, pp. 3117–3130, 2009, doi: 10.1002/jps.21617.
- [84] D. D. Shah, J. Zhang, H. Maity, and K. M. G. Mallela, "Effect of photo-degradation on the structure, stability, aggregation, and function of an IgG1 monoclonal antibody," *Int. J. Pharm.*, vol. 547, no. 1–2, pp. 438–449, 2018, doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.06.007.
- [85] E. Jaccoulet, T. Daniel, P. Prognon, and E. Caudron, "Forced Degradation of Monoclonal Antibodies After Compounding: Impact on Routine Hospital Quality Control," *J. Pharm. Sci.*, vol. 108, no. 10, pp. 3252–3261, 2019, doi: 10.1016/j.xphs.2019.06.004.
- [86] N. Barrueco, I. Escobar Rodríguez, B. García Díaz, M. E. Gil Alegre, E. López Lunar, and M. G. Ventura Valares, "Estabilidad de medicamentos en la práctica clínica. De la seguridad a la eficiencia," *Farm. Hosp.*, vol. 37, no. 3, pp. 175–177, 2013, doi: 10.7399/FH.2013.37.3.587.
- [87] Estabilidad de los medicamentos en la practica clínica, Centro de Investigación e Información de Medicamentos de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Panama, 2013.

- [88] K. Todoroki, H. Mizuno, E. Sugiyama, and T. Toyo'oka, "Bioanalytical methods for therapeutic monoclonal antibodies and antibody–drug conjugates: A review of recent advances and future perspectives," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 179, 2020, doi: 10.1016/j.jpba.2019.112991.
- [89] I. Suárez, A. Salmerón-García, J. Cabeza, L. F. Capitán-Vallvey, and 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.*, vol. 1032, pp. 155–164, 2016, doi: 10.1016/j.jchromb.2016.05.045.
- [90] H. Kaur, S. R. Bhagwat, T. K. Sharma, and A. Kumar, "Analytical techniques for characterization of biological molecules - Proteins and aptamers/oligonucleotides," *Bioanalysis*, vol. 11, no. 2, pp. 103–117, 2019, doi: 10.4155/bio-2018-0225.
- [91] J. Moebius, R. Swart, and A. Sickmann, "Chromatography-Based Separation of Proteins, Peptides, and Amino Acids," *Handb. Pharm. Biotechnol.*, pp. 585–610, 2006, doi: 10.1002/9780470117118.ch05d.
- [92] A. Staub, D. Guillarme, J. Schappler, J. L. Veuthey, and S. Rudaz, "Intact protein analysis in the biopharmaceutical field," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 55, no. 4, pp. 810–822, 2011, doi: 10.1016/j.jpba.2011.01.031.
- [93] Nomenclatura para cromatografía, International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC and GCTA, 1995.
- [94] S. Bocian and B. Buszewski, "Residual silanols at reversed-phase silica in HPLC - A contribution for a better understanding," *J. Sep. Sci.*, vol. 35, no. 10–11, pp. 1191–1200, 2012, doi: 10.1002/jssc.201200055.
- [95] K. Sandra, I. Vandenneede, and P. Sandra, "Modern chromatographic and mass spectrometric techniques for protein biopharmaceutical characterization," *J. Chromatogr. A*, vol. 1335, pp. 81–103, 2014, doi: 10.1016/j.chroma.2013.11.057.
- [96] J. J. Kirkland, S. A. Schuster, W. L. Johnson, and B. E. Boyes, "Fused-core particle technology in high-performance liquid chromatography: An overview," *J. Pharm. Anal.*, vol. 3, no. 5, pp. 303–312, 2013, doi: 10.1016/j.jpha.2013.02.005.
- [97] R. Pliego-Arreaga, C. Regalado, A. Amaro-Reyes, and B. E. García-Almendárez, "TECNICAS CROMATOGRÁFICAS Y SU APLICACION A ESTUDIOS DE CAMBIOS CONFORMACIONALES, ESTABILIDAD Y REPLEGAMIENTO DE PROTEINAS," *Rev. Mex. Ing. Química*, vol. 12, no. 3, pp. 505–511, 2013, [Online]. Available: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62029966013>.

- [98] T. M. Dillon, P. V. Bondarenko, and M. Speed Ricci, "Development of an analytical reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry method for characterization of recombinant antibodies," *J. Chromatogr. A*, vol. 1053, no. 1-2 SPEC. ISS., pp. 299–305, 2004, doi: 10.1016/j.chroma.2004.08.058.
- [99] T. M. Dillon, P. V. Bondarenko, D. S. Rehder, G. D. Pipes, G. R. Kleemann, and M. S. Ricci, "Optimization of a reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry method for characterizing recombinant antibody heterogeneity and stability," *J. Chromatogr. A*, vol. 1120, no. 1–2, pp. 112–120, 2006, doi: 10.1016/j.chroma.2006.01.016.
- [100] R. Pérez-Robles, L. Cuadros-Rodríguez, A. Salmerón-García, and N. Navas, "Development and validation of a (RP)UHPLC-UV-(HESI/Orbitrap)MS method for the identification and quantification of mixtures of intact therapeutic monoclonal antibodies using a monolithic column," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 159, pp. 437–448, 2018, doi: 10.1016/j.jpba.2018.07.013.
- [101] S. Fekete, D. S. Jensen, J. Zukowski, and D. Guillarme, "Evaluation of a new wide-pore superficially porous material with carbon core and nanodiamond-polymer shell for the separation of proteins," *J. Chromatogr. A*, vol. 1414, pp. 51–59, 2015, doi: 10.1016/j.chroma.2015.08.028.
- [102] P. Bults, B. Spanov, O. Olaleye, N. C. van de Merbel, and R. Bischoff, "Intact protein bioanalysis by liquid chromatography – High-resolution mass spectrometry," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1110–1111, no. January 2019, pp. 155–167, 2019, doi: 10.1016/j.jchromb.2019.01.032.
- [103] S. Fekete, S. Rudaz, J. Fekete, and D. Guillarme, "Analysis of recombinant monoclonal antibodies by RPLC: Toward a generic method development approach," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 70, pp. 158–168, 2012, doi: 10.1016/j.jpba.2012.06.021.
- [104] M. El Amrani, A. A. M. Donners, C. E. Hack, A. D. R. Huitema, and E. M. van Maarseveen, "Six-step workflow for the quantification of therapeutic monoclonal antibodies in biological matrices with liquid chromatography mass spectrometry – A tutorial," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1080, pp. 22–34, 2019, doi: 10.1016/j.aca.2019.05.076.
- [105] S. Fekete, A. Beck, J. L. Veuthey, and D. Guillarme, "Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 113, pp. 43–55, 2015, doi: 10.1016/j.jpba.2015.02.037.
- [106] Ion Exchange Chromatography Principles of Ion Exchange Chromatography, Aplicaciones y Tecnologías Bio-Rad Laboratories, 2016.

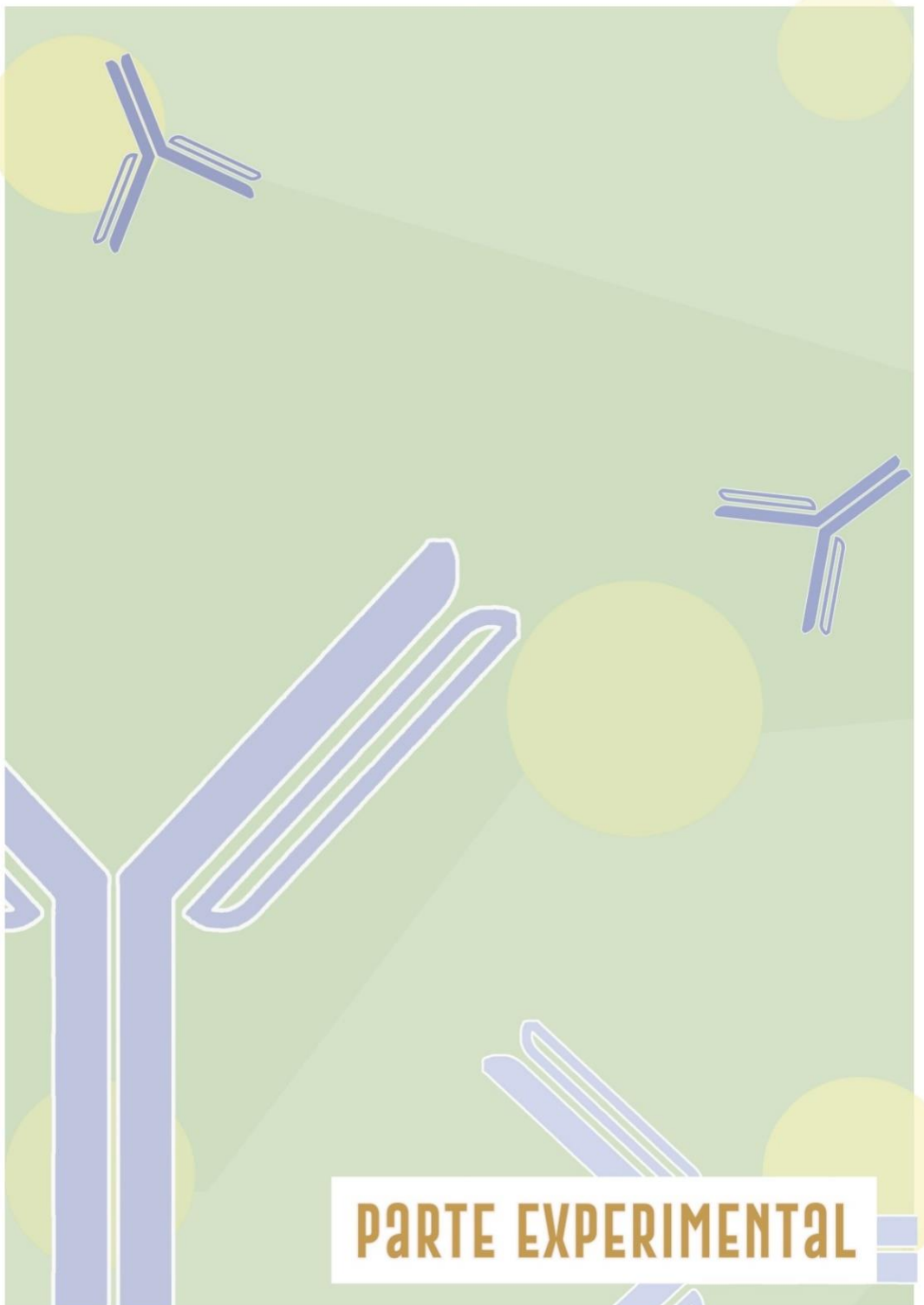
- [107] A. Murisier *et al.*, "Tuning selectivity in cation-exchange chromatography applied for monoclonal antibody separations, part 2: Evaluation of recent stationary phases," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 172, pp. 320–328, 2019, doi: 10.1016/j.jpba.2019.05.011.
- [108] Y. Leblanc, C. Ramon, N. Bihoreau, and G. Chevreux, "Charge variants characterization of a monoclonal antibody by ion exchange chromatography coupled on-line to native mass spectrometry: Case study after a long-term storage at +5 °C," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1048, pp. 130–139, 2017, doi: 10.1016/j.jchromb.2017.02.017.
- [109] E. Farsang *et al.*, "Tuning selectivity in cation-exchange chromatography applied for monoclonal antibody separations, part 1: Alternative mobile phases and fine tuning of the separation," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 168, pp. 138–147, 2019, doi: 10.1016/j.jpba.2019.02.024.
- [110] R. Pérez-Robles, L. Cuadros-Rodríguez, A. Salmerón-García, J. Cabeza-Barrera, and N. Navas, "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," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 185, 2020, doi: 10.1016/j.jpba.2020.113233.
- [111] N. Ferrara, K. J. Hillan, H. P. Gerber, and W. Novotny, "Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 3, no. 5, pp. 391–400, 2004, doi: 10.1038/nrd1381.
- [112] Anexo 1: Ficha Técnica o resumen de las características del producto Avastin, European Medicines Agency (EMA), Ámsterdam (Netherlands) (2021).
- [113] K. Kotowski *et al.*, "Contemporary management and novel therapies in ovarian cancer-literature review," *World Sci. News*, vol. 111, no. September, pp. 51–63, 2018, [Online]. Available: www.worldscientificnews.com.
- [114] Anexo 1: Ficha Técnica o resumen de las características del producto Mvasi®, European Medicines Agency (EMA), Ámsterdam (Netherlands) (2021).
- [115] Anexo 1: Ficha Técnica o resumen de las características del producto Zirabev®, European Medicines Agency (EMA), Ámsterdam (Netherlands) (2021).
- [116] M. Derbyshire, "Patent expiry dates for biologicals: 2016 update," *GaBI J.*, vol. 6, no. 1, pp. 27–30, 2017, doi: 10.5639/gabij.2017.0601.006.
- [117] Anexo 1: Ficha Técnica o resumen de las características del producto Erbitux®, European Medicines Agency (EMA), Ámsterdam (Netherlands) (2021).

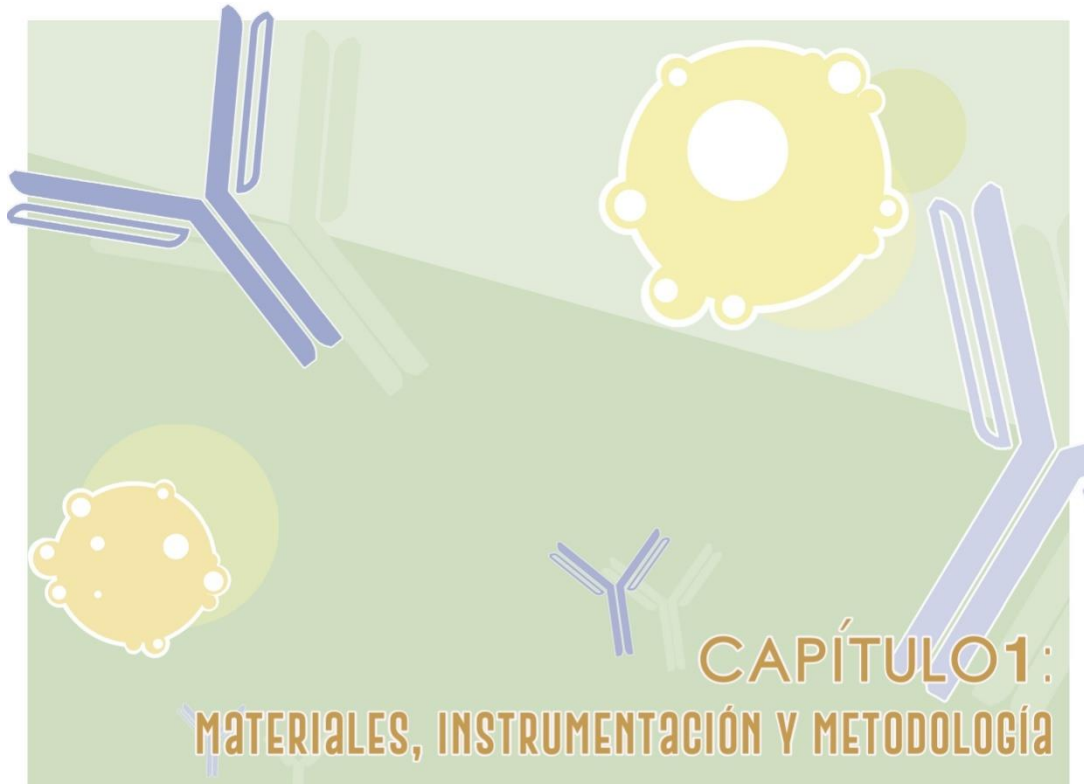
- [118] M. C. Colomer, "Cetuximab: Inhibidor del crecimiento del cáncer colorrectal," *Actual. científica Medicam. Vanguard.*, vol. 24, pp. 126–129, 2005.
- [119] Erbitux Mechanism of Action, *Merck Healthcare*, 2020. <https://hcp.merckgroup.com/en/oncology/erbitux/Erbitux-Mechanism-of-Action.html>. (Consultado en Mayo de 2021)
- [120] A. Busse and D. Lüftner, "What does the pipeline promise about upcoming biosimilar antibodies in oncology?," *Breast Care*, vol. 14, no. 1, pp. 10–16, 2019, doi: 10.1159/000496834.
- [121] Samantha DiGrande, "Cetuximab Biosimilars are on the Horizon," 2018. www.centerforbiosimilars.com/news/cetuximab-biosimilars-are-on-the-horizon.
- [122] Anexo 1: Ficha Técnica o resumen de las características del producto Remicade, European Medicines Agency (EMA), Ámsterdam (Netherlands) (2021).
- [123] W.M. Chu, "Tumor necrosis factor," *Cancer Let*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2014, doi: 10.1016/j.canlet.2012.10.014.Tumor.
- [124] D. Tracey, L. Klareskog, E. H. Sasso, J. G. Salfeld, and P. P. Tak, "Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review," *Pharmacol. Ther.*, vol. 117, no. 2, pp. 244–279, 2008, doi: 10.1016/j.pharmthera.2007.10.001.
- [125] J. Lin *et al.*, "TNF α blockade in human diseases: An overview of efficacy and safety," *Clin Immunol*, vol. 126, no. 1, pp. 13–30, 2009.
- [126] Anexo 1: Ficha Técnica o resumen de las características del producto Flixabi®, European Medicines Agency (EMA), Ámsterdam (Netherlands) (2021).
- [127] Anexo 1: Ficha Técnica o resumen de las características del producto Inflectra®, European Medicines Agency (EMA), Ámsterdam (Netherlands) (2021).
- [128] Anexo 1: Ficha Técnica o resumen de las características del producto Remsima®, European Medicines Agency (EMA), Ámsterdam (Netherlands) (2021).
- [129] Anexo 1: Ficha Técnica o resumen de las características del producto Zessly®, European Medicines Agency (EMA), Ámsterdam (Netherlands) (2021).
- [130] Anexo 1: Ficha Técnica o resumen de las características del producto MabThera®, European Medicines Agency (EMA), Ámsterdam (Netherlands) (2021).
- [131] R. P. Taylor and M. A. Lindorfer, "Drug Insight: The mechanism of action of rituximab in autoimmune disease - The immune complex decoy hypothesis," *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*,

vol. 3, no. 2, pp. 86–95, 2007, doi: 10.1038/ncprheum0424.

- [132] Anexo 1: Ficha Técnica o resumen de las características del producto Blitzima®, European Medicines Agency (EMA), Ámsterdam (Netherlands) (2021).
- [133] Anexo 1: Ficha Técnica o resumen de las características del producto Ritemvia®, European Medicines Agency (EMA), Ámsterdam (Netherlands) (2021).
- [134] Anexo 1: Ficha Técnica o resumen de las características del producto Rituzena®, European Medicines Agency (EMA), Ámsterdam (Netherlands) (2021).
- [135] Anexo 1: Ficha Técnica o resumen de las características del producto Rixathon®, European Medicines Agency (EMA), Ámsterdam (Netherlands) (2021).
- [136] Anexo 1: Ficha Técnica o resumen de las características del producto Riximyo®, European Medicines Agency (EMA), Ámsterdam (Netherlands) (2021).
- [137] Anexo 1: Ficha Técnica o resumen de las características del producto Ruxience®, European Medicines Agency (EMA), Ámsterdam (Netherlands) (2021).
- [138] Anexo 1: Ficha Técnica o resumen de las características del producto Truxima®, European Medicines Agency (EMA), Ámsterdam (Netherlands) (2021).
- [139] Anexo 1: Ficha Técnica o resumen de las características del producto Herceptin®, European Medicines Agency (EMA), Ámsterdam (Netherlands) (2021).
- [140] D. . Hall, P.S. and Cameron, “Current Perspective – Trastuzumab,” *Eur. J. Cancer*, vol. 45, pp. 12–18, 2009.
- [141] T. Vu and F. X. Claret, “Trastuzumab: Updated mechanisms of action and resistance in breast cancer,” *Front. Oncol.*, vol. 2 JUN, no. June, pp. 1–6, 2012, doi: 10.3389/fonc.2012.00062.
- [142] R. Nahta and F. J. Esteva, “Herceptin: Mechanisms of action and resistance,” *Cancer Lett.*, vol. 232, no. 2, pp. 123–138, 2006, doi: 10.1016/j.canlet.2005.01.041.
- [143] Anexo 1: Ficha Técnica o resumen de las características del producto Ontruza®, European Medicines Agency (EMA), Ámsterdam (Netherlands) (2021).
- [144] Anexo 1: Ficha Técnica o resumen de las características del producto Herzuma®, European Medicines Agency (EMA), Ámsterdam (Netherlands) (2021).
- [145] Anexo 1: Ficha Técnica o resumen de las características del producto Kanjinti®, European Medicines Agency (EMA), Ámsterdam (Netherlands) (2021).

- [146] Anexo 1: Ficha Técnica o resumen de las características del producto Trazimerai®, European Medicines Agency (EMA), Ámsterdam (Netherlands) (2021).
- [147] Anexo 1: Ficha Técnica o resumen de las características del producto Zercepac®, European Medicines Agency (EMA), Ámsterdam (Netherlands) (2021).
- [148] Anexo 1: Ficha Técnica o resumen de las características del producto Ogivri®, European Medicines Agency (EMA), Ámsterdam (Netherlands) (2021).
- [149] S. Carillo *et al.*, “Comparing different domains of analysis for the characterisation of N-glycans on monoclonal antibodies,” *J. Pharm. Anal.*, vol. 10, no. 1, pp. 23–34, 2020, doi: 10.1016/j.jpha.2019.11.008.





En este capítulo se citan los reactivos, disoluciones, material de laboratorio y técnicas analíticas utilizadas en el trabajo experimental llevado a cabo en esta Tesis Doctoral, así como la metodología empleada.

1.1. Disolventes, reactivos y disoluciones

1.1.1. Disolventes y reactivos

A continuación, se detallan los reactivos empleados en la preparación de las distintas disoluciones que han sido utilizadas en la parte experimental de esta Tesis Doctoral. En la Tabla 1.1 se recogen todos los disolventes y reactivos empleados.

Tabla 1.1. Disolventes y reactivos

Disolventes y reactivos	Casa comercial
Acetonitrilo (ACN, grado HPLC)	Poch S.A.(Gliwice, Poland)
Agua ultrapura	Estación Milli-Q ,Millipore Corp. (Madrid, Spain)
Solución salina de NaCl 0.9%(p/v)	B. Braun Medical (Madrid, Spain)
Ácido trifluoroacético (TFA, grado HPLC)	Merck Millipore (Darmstadt, Alemania)
Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) (30% (p/v, 100 vol.)	Technical (Fontenay-sous-Bois, France)
Hidróxido de sodio (NaOH) (97 %)	Panreac Química SA (Barcelona, España)
Monohidrogenofosfato de sodio (Na ₂ HPO ₄)	
Dihidrogenofosfato de sodio (NaH ₂ PO ₄)	
Cloruro de sodio (NaCl) (99.5%)	
Ácido clorhídrico (HCl) (37%)	
Metanol (grado HPLC)	
Isopropanol (iPrOH, grado HPLC)	

1.1.2. Disoluciones

A continuación, se relacionan las disoluciones utilizadas para la preparación de las muestras y para las fases móviles de los métodos cromatográficos. Para la preparación de todas las disoluciones acuosas, se utilizó agua ultrapura Milli-Q.

1.1.2.1. Disoluciones empleadas en los estudios de estrés forzado:

- *Disolución de HCl 1.0 M.*
Esta disolución fue utilizada en el estrés forzado de tipo ácido.
- *Disolución de NaOH 0.1 M.*
Esta disolución fue utilizada en el estrés forzado de tipo básico.
- *Disolución de NaCl 1.5 M.*
Esta disolución fue utilizada en el estrés forzado de aumento de la fuerza iónica.
- *Disolución oxidante de H₂O₂ al 1% (v/v).*
Esta disolución fue utilizada en el estrés forzado de tipo oxidante.

1.1.2.2. Fases móviles utilizadas en el método cromatográfico (HPLC) en fase inversa:

- *Disolución de TFA al 0.1% en agua Milli-Q.*
Esta disolución fue utilizada como fase móvil A en el método de fase inversa llevado a cabo en el Capítulo 2 y Capítulo 3.
- *Disolución de iPrOH, ACN, TFA y agua Milli-Q (70:20:9.9:0,1, v/v/v/v).*
Esta disolución fue utilizada como fase móvil B en el método de fase inversa llevado a cabo en el Capítulo 2 y Capítulo 3.

1.1.2.3. Fases móviles utilizadas en el método cromatográfico (HPLC) de intercambio catiónico débil.

- *Disolución de Na₂HPO₄ 10 mM ajustada a pH 6.0.*

Esta disolución fue utilizada como fase móvil A en el método de intercambio catiónico débil llevado a cabo en el Capítulo 4.

- *Disolución de 10 mM de Na₂HPO₄ y 1.0 M de NaCl ajustada a pH 8.1.*

Esta disolución fue utilizada como fase móvil B en el método de intercambio catiónico llevado a cabo en el Capítulo 4.

En la preparación de todas estas disoluciones se utilizaron los siguientes instrumentos básicos de laboratorio o aparatos:

- **pH metro digital MicropH 200 (Crison, Barcelona, España):** Equipado con un electro combinado de vidrio y plata/ cloruro de plata (KCl 3M) (Figura 1.1).



Figura 1.1. pH metro digital MicropH 2000

- **Balanza analítica modelo GH-252 de A&D Company (Japón):** Precisión de 0.01 mg (Figura 1.2).



Figura 1.2. Balanza analítica modelo GH-252.

- ❖ **Ultrasonicador modelo Ultrason-HD de JP Selecta S.A (Madrid, España):** Utilizado para sonicar las fases móviles utilizadas en los métodos cromatográficos (Figura 1.3).



Figura 1.3. Ultrasonicador modelo Ultrason-HD.

1.2. Medicamentos biotecnológicos y sus preparaciones farmacéuticas

Los medicamentos estudiados en esta Tesis Doctoral han sido aportados por el Servicio de Farmacia Hospitalaria del Hospital Universitario Clínico San Cecilio de Granada, en el contexto de los proyectos en los que se enmarca esta Tesis Doctoral

y que ha sido ya citados. Todos los medicamentos fueron preparados en el Servicio de Farmacia del Hospital según las indicaciones de sus respectivas fichas técnicas ([112][117][122][130][139]) y han sido utilizados dentro de las fechas de uso indicadas en las mismas (24 horas tras su preparación), asegurando así el mantenimiento del medicamento y su principio activo (el mAb) en sus condiciones óptimas de uso.

A continuación, de forma resumida, se indica la composición cualitativa y cuantitativa, así como las instrucciones de almacenamiento recomendadas por el fabricante de los diferentes medicamentos en sus fichas técnicas. Todos los medicamentos se utilizaron como muestras y como estándares de referencia (mAbs intactos), debido a que no existen estándares comerciales para estos fármacos en el mercado, tal y como se recoge en los siguientes capítulos:

1.2.1. *Bevacizumab (BVZ)*

BVZ es un anticuerpo monoclonal humanizado cuyo medicamento, Avastin®, se presenta como solución para perfusión en viales de 4 o 16 mL con una concentración de 25 mg/mL de BVZ. Está formulado con los siguientes excipientes: trehalosa dihidrato, fosfato sódico, polisorbato 20 y agua para preparaciones inyectable, con un pH final de 6.2. El período de validez de este producto, según el fabricante, es de 2 años para el vial sin abrir y de 24 h una vez abierto si se almacena a 4°C. Adicionalmente, se recomienda protegerlo de la luz solar y evitar realizar diluciones del producto con soluciones de glucosa (5%) para evitar posibles degradaciones del producto [112].

1.2.2. *Cetuximab (CTX)*

CTX es un anticuerpo monoclonal quimérico que se presenta como solución para perfusión en viales de 20 y 100 mL con una concentración de 5 mg/mL de mAb en el medicamento Erbitux®. Su formulación farmacéutica se compone de varios excipientes como cloruro de sodio, glicina, polisorbato 80, ácido cítrico

monohidrato, hidróxido de sodio y agua para preparaciones inyectables, con un pH final en un rango de 5.3 a 5.7. Este producto tiene un periodo de validez de 4 años (vial sin abrir) y de 24 horas una vez abierto, ambos a una temperatura de 4°C según el fabricante. Adicionalmente, no se recomienda la mezcla de Erbitux con otros medicamentos de administración intravenosa. Ninguna recomendación por parte del fabricante sobre la exposición a la luz solar [117].

1.2.3. *Infliximab (INF)*

INF (Remicade®) es un anticuerpo monoclonal quimérico se presenta como polvo para concentrado para solución para perfusión en forma de liofilizado con 100 mg en cada vial que se reconstituye con 10 mL de agua para inyectables, con una concentración final de 10 mg/mL. La lista de excipientes que componen este producto son: sacarosa, polisorbato 80, fosfato sódico monobásico y fosfato sódico dibásico, con un pH final de aproximadamente 7.2. El período de validez indicado en el momento de realizar la investigación era de 3 años (vial sin abrir) o 24 horas una vez reconstituido, a una temperatura de 4°C según el fabricante. Ninguna recomendación por parte del fabricante sobre la exposición a la luz solar o la mezcla con otros medicamentos en disolución [122]. Tras la publicación de diversos estudios todos ellos indicando mayor estabilidad de las preparaciones farmacéuticas, actualmente la ficha técnica ya indica una estabilidad de 30 días.

1.2.4. *Rituximab (RTX)*

RTX (MabThera®) un anticuerpo monoclonal quimérico presentado como concentrado para solución para perfusión en viales de 100 mg y 500 mg, que una vez reconstituido su concentración es de 10 mg/mL en ambas versiones. Su formulación farmacéutica contiene los siguientes excipientes: Hialuronidasa recombinante humana (rHuPH20), L-histidina, L-histidina hidrocloreuro monohidrato, α,α -trehalosa dihidrato, L-metionina, polisorbato 80 (E433) y agua

para preparaciones inyectables, con un pH final de 6.5. El periodo de validez de este producto es de 3 años (vial cerrado) o 24 horas una vez reconstituido, almacenados a 4°C según el fabricante y alejado de la luz solar. [130].

1.2.5. *Trastuzumab (TTZ)*

TTZ es un anticuerpo monoclonal humanizado cuyo medicamento (Herceptin®) se presenta como polvo liofilizado para concentrado para solución para perfusión. Cada vial contiene 150 mg de este mAb que se reconstituye con 10 mL de agua para inyectables dando una concentración final de 15 mg/mL con un pH final de aproximadamente 6. Cada vial contiene L-histidina hidrocloreto monohidrato, L-histidina, α,α -trehalosa dihidrato y polisorbato 20 como excipientes. Las recomendaciones del fabricante en cuanto a almacenamiento son similares a los demás productos estudiados: cada vial cerrado tiene un período de validez de 4 años y de 24 horas tras ser reconstituido, ambos a una temperatura de 4°C y se deberán mantenerse alejados de la luz directa y difusa. Además, no se recomienda su mezcla con soluciones de glucosa (5%) para evitar posibles degradaciones del producto [139].

Todos los mAbs indicados, al utilizarse en condiciones de uso hospitalario, fueron preparados a diferentes concentraciones, cubriendo el intervalo clínico de administración a los pacientes. Para ello, los correspondientes medicamentos, fueron reconstituidos (agua para inyectables) y diluidos (INF y TTZ) o solamente diluidos (BVZ, CTX y RTX) mediante solución para inyectables de suero salino al 0.9% (NaCl). Las concentraciones (preparaciones farmacéuticas de uso clínico) a las cuales fueron estudiadas las estabilidades de los correspondientes medicamentos se recogen a continuación:

- ❖ BVZ: concentración de partida: 25 mg/mL.
 - Análisis por (RP)-HPLC-DAD: 0.5 mg/mL, 2.0 mg/mL y 10 mg/mL.
 - Análisis por WCX/HPLC-DAD: 2.0 mg/mL

- ❖ CTX: concentración de partida: 5 mg/mL.
 - Análisis por (RP)-HPLC-DAD: 0.5 mg/mL, 2.0 mg/mL y 5.0 mg/mL.
 - Análisis por (WCX)HPLC/DAD: 2.0 mg/mL
- ❖ INF: concentración de partida tras reconstitución: 10 mg/mL.
 - Análisis por (RP)-HPLC-DAD: 0.5 mg/mL, 2.0 mg/mL y 10 mg/mL.
 - Análisis por WCX/HPLC-DAD: 2.0 mg/mL
- ❖ RTX: concentración de partida: 10 mg/mL.
 - Análisis por WCX/HPLC-DAD: 2.0 mg/mL
- ❖ TTZ concentración de partida tras reconstitución: 15 mg/mL.
 - Análisis por (RP)-HPLC-DAD: 0.5 mg/mL, y 2.5 mg/mL.
 - Análisis por WCX/HPLC-DAD: 2.0 mg/mL.

1.3. Material de laboratorio

El material de laboratorio utilizado en los diferentes estudios incluidos en esta Memoria se indica a continuación:

- ❖ Vasos de precipitado de tipo Pyrex de capacidad 50, 100 y 500 mL, DeltaLab S.L. (Rubí, España).
- ❖ Botellas de laboratorio graduadas AFORA clase A de capacidad 500 y 1000 mL de Thermo Fisher Scientific Inc. (Madrid, España).
- ❖ Pipetas aforadas y graduadas AFORA clase A de capacidad de 10 mL de Thermo Fisher Scientific Inc. (Madrid, España).
- ❖ Viales de vidrio transparente para HPLC de 1.5 mL de Agilent (Madrid, España).
- ❖ Viales de vidrio topacio para HPLC de 1.5 mL de Agilent (Madrid, España).
- ❖ Micropipetas de varias capacidades: 2-20 μ L, 20-200 μ L y 200-1000 μ L. LABMATE, PZ HTL LAB Solutions S.A. (Varsovia, Polonia).
- ❖ Puntas para Micropipeta, Eppendorf (Madrid, España).
- ❖ Tubos de centrífuga de diferentes capacidades: 0.2, 0.5 y 1.5 mL, Eppendorf (Madrid, España).

- ❖ Tubos de plástico estériles Falcon de diferentes capacidades: 15 mL y 50 mL de Thermo Fisher Scientific Inc. (Madrid, España).
- ❖ Jeringas de plástico estériles de 1 mL de capacidad, Kendall S.A. (Madrid, España).
- ❖ Agujas para jeringa BD Microlance, Becton Dickinson S.A. (Madrid, España).

1.4. Instrumentación analítica

Para alcanzar los objetivos propuestos en esta Tesis Doctoral se empleó la cromatografía líquida de alta resolución con detección UV-visible de diodos en fila UV-visible (HPLC/DAD), utilizándose un cromatógrafo HPLC Agilent 1100 equipado con una bomba cuaternaria, degasificador, un inyector automático, un horno de columna y un detector diodo array de longitud de onda variable (Agilent Technologies, Madrid, España) (Figura 1.4). El equipo estaba conectado a un ordenador personal equipado con una estación de trabajo HPLC ChemStation (Rev. A.0903, Agilent Technologies).



Figura 1.4. HPLC Agilent 1100. Fuente: Agilent.

1.5. Softwares

Los Softwares utilizados para la obtención y análisis de los resultados se indican a continuación:

- ChemStation workstation for LC 3D systems (rev. A.0903) Agilent Technologies (Madrid, España). Para el control del equipo de HPLC, la adquisición de los datos primarios, la generación de los parámetros cromatográficos, el análisis espectral y la generación de los cromatogramas.
- Statgraphics Plus 6.0 (Statistical Graphics System, 1992, Warrenton, VA, USA). Este programa estadístico fue utilizado para el tratamiento de los datos cromatográficos.

1.6. Estudios de degradación forzada (estrés) de los medicamentos biotecnológicos

Los estudios de degradación forzada se llevaron a cabo en los trabajos experimentales detallados en los Capítulos 2, 3 y 4. Estos estudios se realizaron empleando muestras diluidas en NaCl al 0.9 % de los medicamentos estudiados a diferentes concentraciones según las condiciones hospitalarias de cada medicamento. Estas diluciones están incluidas en el apartado 2 de este Capítulo 1.

Las condiciones ambientales estudiadas fueron: la temperatura, la exposición a la luz visible, la fuerza iónica del medio, la adición de un ácido o una base al medio y la adición de un oxidante.

El efecto de la temperatura sobre la degradación se evaluó colocando alícuotas de las preparaciones farmacéuticas de los mAbs en una estufa (Heraeus S.A., Madrid, España. Figura 1.5) durante 24h a una temperatura controlada de 50°C, considerada la temperatura máxima a la que pueden llegar estos medicamentos en el entorno clínico de forma accidental.



Figura 1.5. Estufa Heraeus. Fuente:sugelabor.es

El efecto a la exposición de la luz visible se investigó introduciendo alícuotas de las preparaciones farmacéuticas de los mAbs durante 24 horas en una cámara de prueba de esfuerzo acelerado para simular la luz solar (Solarbox 3000e RH, Cofomegra, Milán, Italia. Figura 1.6) manteniendo una temperatura de 24°C. Los parámetros de irradiación fueron de 250 W/ m² entre 300 y 800 nm simulando las condiciones de exposición a la luz en interiores, rechazando infrarrojos. Este experimento se realizó siguiendo las pautas indicadas en la guía ICH Q1B, específica para pruebas de fotoestabilidad [51].



Figura 1.6. Cámara de envejecimiento SOLARBOX 3000e.

Para evaluar los efectos de las condiciones de estrés ácido, básico, fuerza iónica y oxidantes en las muestras, en el caso de los capítulos 2 y 3 se evaluaron dos

niveles de condiciones de estrés (Nivel bajo y nivel alto), mientras que en el capítulo 4, se evaluó un solo nivel de concentración del agente de estrés (nivel alto).

Todas las muestras fueron expuestas a la correspondiente condición de degradación durante un periodo de 24 h, tras el cual fueron analizadas, comparando los resultados obtenidos con muestras control (muestras recién preparadas de los medicamentos).

1.7. Validación de los métodos analíticos

En cada uno de los trabajos experimentales, se validaron los métodos analíticos desarrollados en función de la finalidad de los mismos, de acuerdo con las directrices de la ICH para la validación de métodos analíticos, la ICH Q2(R1).

En el Capítulo 2 y Capítulo 3, se validaron los métodos cromatográficos ((RP)HPLC/DAD) para la cuantificación del mAbs intactos, como métodos indicadores de la estabilidad, por lo que se siguieron las recomendaciones de la guía ICH Q2(R1). En dicha validación, se estudiaron los siguientes parámetros: linealidad, LOQ, LOD, precisión (repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad) exactitud, robustez y especificidad. El estudio de este último parámetro se realizó mediante los estudios de degradación forzada, detallados en el apartado anterior.

En el Capítulo 4 se validó el método cromatográfico ((WCX)HPLC/DAD) para la detección del perfil de variantes de carga de los mAbs intactos como indicador de la estabilidad. Para esta validación, se llevaron a cabo estudios de degradación forzada (ver sección 1.6 de este Capítulo 1) para demostrar la idoneidad del método para detectar cambios en los perfiles de variantes de carga.

1.8. Estudios de estabilidad en el tiempo

En los estudios de estabilidad en el tiempo de las muestras de las preparaciones farmacéuticas de los mAbs en condiciones de uso hospitalario, se evaluaron dos CQAs:

- El contenido protéico, es decir, el contenido en el propio mAb, que constituye el principio activo del medicamento biotecnológico.
- El perfil cromatográfico de las variantes de carga de los mAbs.

En el primer caso, la evaluación de la estabilidad se basó en la evaluación de la concentración del mAb, de las modificaciones y productos de degradación que pudieran detectarse, tal y como se discute en el Capítulo 2 y Capítulo 3. En todos los casos, las preparaciones de los medicamentos se realizaron en viales de vidrio topacio para protegerlas de la luz solar y almacenadas a 4°C. También se realizaron estudios de estabilidad almacenando congeladas las preparaciones a -20°C.

Las muestras refrigeradas se analizaron en los días 0 (inicio del estudio, analizadas en el momento de su preparación), 1, 3, 7, 14 y 31 días después de su preparación y siempre por triplicado. Las alícuotas congeladas se analizaron a 31 días después de la preparación, al considerarse solo un ciclo de congelación-descongelación.

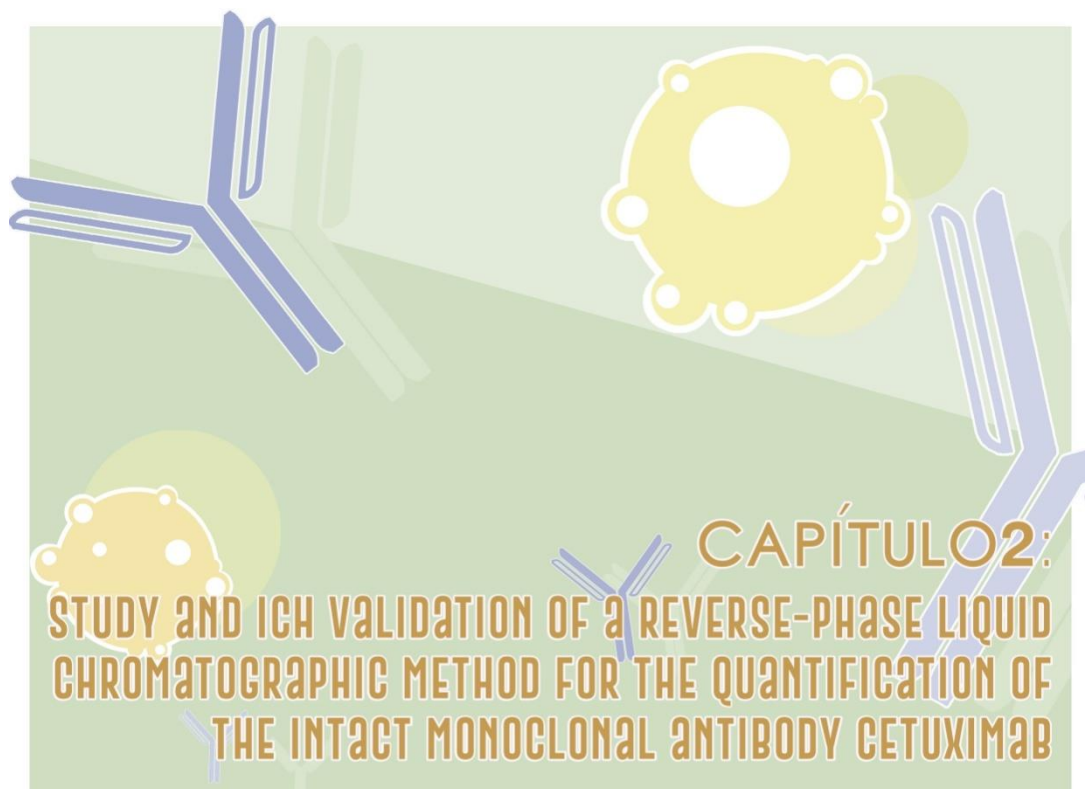
La evaluación de los resultados de estabilidad se llevó a cabo comparando los resultados de las muestras analizadas a día 0, con los resultados obtenidos en el resto de los días de control del estudio. La concentración de las muestras de los mAbs se expresó como el porcentaje de diferencia entre la concentración calculada en cada día del control y la concentración correspondiente al inicio del estudio (día 0, control). Además, se compararon los perfiles cromatográficos obtenidos en cada tiempo de control con los correspondientes al tiempo 0, con el fin de identificar modificaciones en el perfil o la detección de picos correspondientes a productos de degradación. Para la detección de modificaciones/degradaciones se propuso un

análisis espectral que ha sido objeto de investigación y que se desarrolla en el Capítulo 2 y Capítulo 3.

Para la evaluación de la estabilidad del perfil de variantes de carga -que se expone en el Capítulo 4-, ésta se estudió en preparaciones farmacéuticas de uso clínico, y de igual manera, las muestras fueron almacenadas en viales topacio (protección de la luz solar) a 4°C. También se almacenaron varias alícuotas a -20°C.

Igualmente, las muestras refrigeradas se analizaron en el día de preparación (día 0, control) y tras 1, 3, 7, 14, 31, 45 y 60 días. Las alícuotas congeladas se analizaron tras uno y dos meses de su preparación, considerándose solo un ciclo de congelación-descongelación.

En este estudio de estabilidad, se evaluaron los cromatogramas obtenidos a través del % de área, el tiempo de retención (RT) de las principales isoformas, las modificaciones en las isoformas iniciales y la detección de nuevos picos correspondientes a degradaciones de los mAbs comparando los perfiles cromatográficos de las variantes de carga de las muestras a los diferentes tiempos de control con los perfiles cromatográficos iniciales registrados en las muestras analizadas el día de su preparación (día 0)





2.1. Introducción al Capítulo 2

En este capítulo 2 se muestran los resultados obtenidos en la validación (como indicador de la estabilidad) de un método cromatográfico basado en cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa con detección UV-visible mediante diodos en fila ((RP)HPLC/DAD) para la cuantificación rigurosa del mAb intacto CTX (contenido proteico), empleando para ello el medicamento innovador Erbitux®. Una vez validado el método siguiendo las especificaciones recogidas en la ICH Q2(R1) y los criterios de validación recomendados en diferentes fuentes de solvencia del ámbito farmacéutico (FDA, publicaciones científicas), éste se empleó en el estudio de estabilidad en el tiempo (un mes) de disoluciones farmacéuticas de CTX de uso clínico de 2.0 mg/mL en NaCl 0.9 % (suero salino) almacenadas a 4 °C y protegidas de la luz.

La metodología empleada en este trabajo de investigación parte en un trabajo anterior (Anexo. Publicación Científica preliminar a la Tesis) en el cual y por primera vez, se puso a punto y validó un método como indicador de la estabilidad para la cuantificación de un mAb intacto, el RTX, mediante cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa con detección UV-visible de diodos en fila. Tras la evaluación de los resultados obtenidos con el mAb RTX, en este trabajo se evaluó la capacidad de dicho método para la cuantificación de otro mAb, el CTX, así como su validación como indicador de la estabilidad, ya que ambos biofármacos son IgG1 y, por lo tanto, son estructuralmente muy parecidos.

En primer lugar, se comprobó la validez de este método para analizar CTX y a continuación, se validó como indicador de la estabilidad siguiendo las recomendaciones de la guía ICH Q2(R1). Para ello, se determinó la linealidad y se caracterizó la correspondiente función de calibrado, se obtuvieron los límites de detección y cuantificación, la precisión (repetibilidad y reproducibilidad) y exactitud del método. Se evaluó la robustez del método y la idoneidad del sistema. La especificidad, aspecto crítico para validar un método de análisis como indicador de la estabilidad de un medicamento o preparación farmacéutica, se evaluó mediante estudios de degradación acelerada (estudios de estrés controlados) que se

realizaron sobre el propio medicamento Erbitux®. En cuanto a los criterios de aceptación, se aplicaron criterios recogidos en trabajos de ámbito farmacéutico y establecidos por la FDA para métodos cromatográficos.

Dada la imposibilidad de resolver cromatográficamente la separación entre proteína intacta sin degradar y degradada -requisito para validar un método como indicador de la estabilidad (ICHQ2(R1))-, se propone el empleo de la estrategia que hace uso del análisis espectral de los picos cromatográficos de CTX intacto no degradado y degradado.

Tras la validación, en el estudio de estabilidad en el tiempo que se llevó a cabo, las preparaciones de CTX farmacéuticas de uso clínico, preparadas a una concentración de 2.0 mg/mL y a partir del medicamento innovador Erbitux® se realizaron en viales topacio y se almacenaron a 4°C hasta su análisis en los días 0 (inicio del estudio y empleado como control) 1, 3, 7, 14 y 31 días después de su preparación. Además, algunas alícuotas se almacenaron a -20°C, analizándose al final del estudio (día 31), para la evaluación del ciclo congelación-descongelación en el contenido proteico.

2.2. Publicación editada

Study and ICH validation of a reverse-phase liquid chromatographic method for the quantification of the intact monoclonal antibody cetuximab

Antonio Martínez-Ortega^a, Agustín Herrera^a, Antonio Salmerón-García^b,
José Cabeza^b, Luis Cuadros-Rodríguez^c Natalia Navas^c

^a Department of Analytical Chemistry, University of Granada, Faculty of Science, Campus Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain.

^b UGC Intercentro Interniveles Farmacia Granada, San Cecilio Hospital, Biomedical Research Institute ibs. GRANADA. Hospitales Universitarios de Granada, University of Granada, E-18012 Granada, Spain

^c Department of Analytical Chemistry, Science Faculty, Biomedical Research Institute ibis. GRANADA, University of Granada, Campus Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain



Original Article

Study and ICH validation of a reverse-phase liquid chromatographic method for the quantification of the intact monoclonal antibody cetuximab[☆]



Antonio Martínez-Ortega^a, Agustín Herrera^a, Antonio Salmerón-García^b, José Cabeza^b,
Luis Cuadros-Rodríguez^c, Natalia Navas^{c,*}

^a Department of Analytical Chemistry, University of Granada, Faculty of Science, Campus Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain

^b UGC Intercentro Interniveles Farmacia Granada, San Cecilio Hospital, Biomedical Research Institute ibs. GRANADA. Hospitales Universitarios de Granada, University of Granada, E-18012 Granada, Spain

^c Department of Analytical Chemistry, Science Faculty, Biomedical Research Institute ibis. GRANADA, University of Granada, Campus Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain

Revista: Journal of Pharmaceutical Analysis, 6 (2016) 117–124.

Aceptado: 25 de noviembre de 2015.

Categoría: PHARMACOLOGY & PHARMACY – SCIE

Índice de impacto (2020) Journal Citation Reports (JCR): 4.769

Posición: 73/276 (Percentil 73, primeras posiciones Q2).

DOI: 10.1016/j.jppha.2015.11.007.



Abstract

Cetuximab (CTX) is a potent chimeric mouse/human monoclonal antibody (mAb) approved worldwide for treatment of metastatic colorectal cancer. Among the various biological and physical analyses performed for full study on this biopharmaceutical, the determination of the concentration preparations throughout manufacturing and subsequent handling in hospital is particularly relevant. In the present work, the study and validation of a method for quantifying intact CTX by reverse-phase high-performance liquid chromatography with diode array detection ((RP)HPLC/DAD) is presented. With that end, we checked the performance of a chromatographic method for quantifying CTX and conducted a study to validate the method as stability-indicating in accordance with the International Conference on Harmonization guidelines (ICH) for biotechnological drugs; therefore, we evaluated linearity, accuracy, precision, detection and quantification limits, robustness and system suitability. The specificity of the method and the robustness of the mAb formulation against external stress factors were estimated by comprehensive chromatographic analysis by subjecting CTX to several informative stress conditions. As demonstrated, the method is rapid, accurate, and reproducible for CTX quantification. It was also successfully used to quantify CTX in a long-term stability study performed under hospital conditions.

Keyword:

Reverse-phase high performance liquid chromatography; Diode detector; Stress study; Biopharmaceuticals; Cetuximab.

1. Introduction

Cetuximab (CTX) is a potent chimeric mouse/human monoclonal antibody (mAb) approved worldwide for the treatment of colon and head and neck cancers. It is directed against the human epidermal growth factor receptor (EGFR) [1]. Of the five classes of antibodies in humans, CTX is an immunoglobulin G (IgG) from Subclass 1 (IgG1), the most commonly used subclass for pharmaceutical and biomedical purposes [2] (Fig. 1). Due to the increasing importance of this class of biopharmaceuticals, a dynamic field of research has arisen around the development of analytical methods for their detailed characterization.

MAbs including IgG1 are large glycoproteins (~150 kDa), composed of four peptide chains, two identical heavy chains (~50 kDa) and two identical light chains (~25 kDa),

which are connected by disulfide bonds (Fig. 1) at their hinge region [3], giving them a specific Y shape. From the structural point of view, mass spectrometry (MS) is the most versatile technology for the in-depth structural analysis of mAbs [4,5].

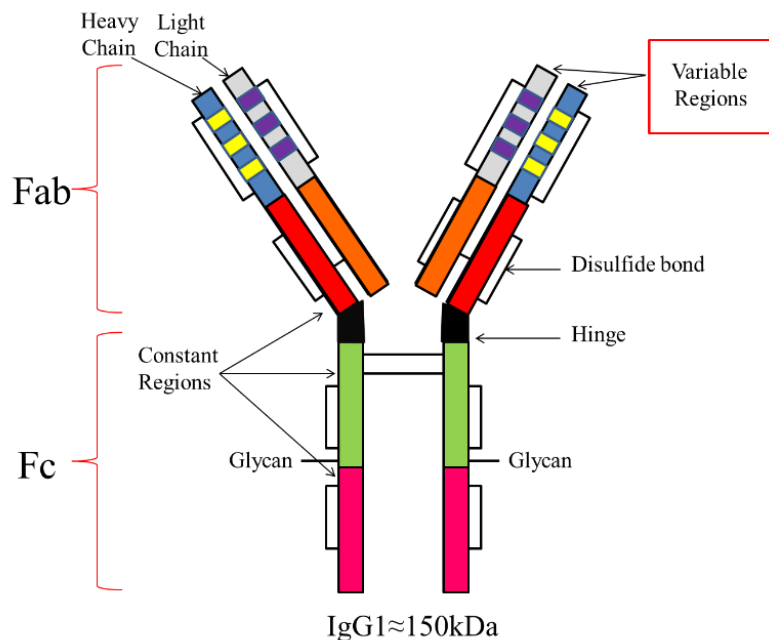


Figure 1. General structure of IgG1.

MS can be used for the characterization of both small and large chemical changes in the mAbs, i.e., primary amino acid elucidation, glycosylation profiles and posttranslational modification such as deamidation and oxidation. In recent research, several structural approaches based on MS techniques were used to assess the primary amino acid sequence, the glyco-profile of CTX, and the mAb studied here [6]. Nevertheless, problems arise when intact mAbs analysis has to be performed coupled to a liquid chromatographic (LC) system. In this case, when performing liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry (LC–ESI–MS) analysis, the uncommon solvent systems used for the elution of the mAbs from the latest generation of chromatographic columns complicate the ionization process in the electrospray. In fact, to date, very few published methods have been used for quantifying intact mAbs by LC–MS [7], and none of them has been validated following the International Conference for Harmonization (ICH) guidelines. The quantification of therapeutic mAbs was carried out by enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA)

[8,9]. However, the lower precision (about 10% of relative standard deviation in repeatability) and robustness of the immunoassays compared with physicochemical-based techniques led ICH to recommend the latter for quantification purposes (Q6B) [10].

Among the different modes of LC, reverse-phase (RP)-LC appears to be one of the most promising analytical techniques for the study of peptides and intact protein, including mAbs [11–13]. RP-LC is generally more efficient than ion-exchange (IXC) and size exclusion chromatography (SEC) [14], making it the best technique for quantification purposes [15]. Furthermore, RP-LC has a quicker separation time than IXC. However, taking into account that several methods are required to perform a rigorous study of a biopharmaceutical, IXC is the most suitable method for tracking charge profile [16] and SEC for detecting mAb aggregates [17].

The use of stationary phases with wider pores (300 Å) and long alkyl chains (C8 and C18) together with a high column temperature (60-75 °C) and a combination of non-traditional solvent systems with ion pairing agents [18,19] is gradually being consolidated as the established procedure for RP chromatographic analysis of intact mAbs. However, the small chemical differences produced by deamidation, cysteine oxidation or the heterogeneity in the glycans profile of the mAbs generate such small changes in the polarity of the molecules that LC columns currently available cannot separate them chromatographically [20]. Chromatographic separation of marketed mAbs is not successful for the same reason, i.e., the chemical differences between them are insufficient to bring about significant changes in the polarity that enable them to be separated chromatographically [15].

From the point of view of the analytical validation of biopharmaceuticals, the ICH Q6B guidelines [10] indicate that the validation of analytical procedures used in the characterization of biotechnological products (such as therapeutic mAbs) should be performed in compliance with the ICH Q2(R1) guidelines relating to the validation of analytical procedures [21]. Despite the fact that ICH Q2(R1) was originally developed for low-molecular-weight drugs, it can also be adapted for use with biotechnology-based pharmaceuticals. In a recently published work [15], we proposed that the quantification of intact rituximab (RTX), another marketed mAb IgG1, could be achieved using a reverse-phase high performance liquid chromatography with diode array detection ((RP)HPLC/DAD) method validated according to the ICH Q2(R1) guidelines. We proposed that the method was validated as stability-indicating for quantification since it

was qualified for detecting modification/degradation by means of the peak purity analysis proposed, even though total chromatographic separation was not achieved in the stress study we performed. In the present study, we analyzed the performance of (RP)HPLC/DAD and discussed the validation of the method for the quantification of the intact CTX.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals and reagents

Erbix[®] (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was used as a representative CTX reference material. The daily surplus was kindly supplied for this study by the Pharmacy Unit of the University Hospital "San Cecilio" (Granada, Spain). All of the standard solutions of CTX were prepared from this medicine. The specifications for the medicine indicated that there were 100 mg/20 mL of CTX in each single-use vial along with sodium citrate, polysorbate 80, sodium chloride, glycine, citric monohydrate acid, sodium hydroxide and water for injections, giving a final concentration of 5 mg/mL of CTX [2]. The working standard solutions of CTX were prepared daily from marketed CTX (immediately after opening it) by appropriate dilution with 0.9% NaCl aqueous solution. Different batches were used randomly throughout the study.

All reagents were of analytical reagent grade unless otherwise stated. Reverse-osmosis-quality water purified (≥ 18 M Ω /cm) with a Milli-RO plus Milli-Q station from Millipore Corp. (Madrid, Spain) was used throughout the study. Methanol of HPLC grade, hydrochloric acid, sodium chloride and sodium hydroxide (pure for analysis) and propan-2-ol ($\geq 98.0\%$) were supplied by Panreac (Barcelona, Spain). Hydrogen peroxide (30%) was supplied by Technical (Fontenay-sous-Bois, France). Trifluoroacetic acid ($\geq 98.0\%$) (TFA) was from Merck KGaA (Darmstadt, Germany) and HPLC grade acetonitrile was from Poch S.A. (Gliwice, Poland). An isotonic solution of 0.9% NaCl was supplied by B. Braun Medical (Madrid, Spain).

2.2 CTX standard sample solutions

All of the standard solutions of CTX were prepared from the medicine Erbitux®. The working standard solutions of CTX were prepared daily from marketed CTX (immediately after opening it) by appropriate dilution with 0.9% NaCl aqueous solution. We intended to avoid any kind of change or degradation in the mAb due to its complex protein nature. Also, different batches were used randomly throughout the study.

2.3 Chromatographic system and software

All chromatographic analyses were performed using an Agilent 110 HPLC system equipped with a quaternary pump, a degasser, an autosampler, a column oven and a photodiode array detector (Agilent Technologies, Madrid, Spain). The instrument was connected to a personal computer fitted with an HPLC ChemStation workstation for LC 3D systems (rev. A.0903) (Agilent Technologies). Chromatographic conditions are summarized in Table 1.

The Statgraphics Plus 6.0 (Statistical Graphics System, 1992, Warrenton, VA, USA) statistical software package was used to deal with the chromatographic data.

Table 1. Chromatographic conditions.

Column	Zorbax 300SB-C8 (150 mm x 2.1 mm, 5 µm, Agilent Technologies)
Eluent	A: Milli-Q water + 0.1 % TFA
	B: iPrOH, ACN, Milli-Q water and TFA (70+20+9.9+0.1, v+v+v+v)
Elution	Gradient program: 0-1 min –10% B; 1-1.05–20 % B; 1.05-4 min – 20% B; 4-4.05 min – 30% B; 4.05-10 min – 60% B, 10-10.05 – 80% B; 10.05-12 min – 80% B; PostTime: 3 min
Flow rate	1 mL/min
Injection volume	1µL
Column temperature	70 °C
Autosampler temperature	5 °C
Injection washing solution	Milli-Q water
Detection	214 y 280 nm

2.4 Analytical method validation

2.4.1 Linearity, LOD, and LOQ

Linearity was evaluated up to 5.0 mg/mL. To this end, appropriate CTX standard solutions of 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.5, and 5.0 mg/mL were prepared in quadruplicate and injected into the chromatographic system. A linear calibration function was fitted by least-squares regression, and linearity was accepted, if the statistical probability level in the corresponding lack-of-fit test (the PLOF-value) was greater than 5% according to the Analytical Methods Committee [22].

The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were estimated from the standard deviation (SD) of the lowest concentration tested. LOD and LOQ were calculated as 3 x SD and 10 x SD, respectively.

2.4.2 Precision

The precision of the method was tested by estimating the intraday precision (repeatability) and the intermediate precision (5 days, reproducibility), given as relative standard deviations (RSDs). The former was estimated from the results of the analysis of CTX standard solutions prepared at the same concentration on the same day. Thirty samples with high-concentration levels (10 samples of 5.0 mg/mL), medium-concentration levels (10 samples of 2.0 mg/mL), and low-concentration levels (10 samples of 0.5 mg/mL) were used for this purpose. The intermediate precision was estimated from the analysis of standard solutions at three concentration levels (0.5, 2.0 and 5.0 mg/mL) over five consecutive days. Two samples of each concentration were prepared and analyzed daily (ten samples of each concentration tested).

Because ICH Q2(R1) [21] does not establish any precision criteria for acceptance of the method, the US Food and Drug Administration (USFDA) criteria for HPLC methods for pharmaceutical analysis were followed [23,24], i.e., an intra-day precision of $\leq 2\%$.

2.4.3 Accuracy

The accuracy of the method was assessed from the average recovery value calculated by analyzing ten standard solution replicates at three concentration levels representing the highest value (5.0 mg/mL), the middle value (2.0 mg/mL), and the lowest value (0.5 mg/mL) of the calibration scale, in order to cover the stated linear range. Once again, ICH Q2 (R1) [21] does not indicate criteria for acceptance of the accuracy of the method. We, therefore, decided to follow the USFDA accuracy criteria for HPLC methods for pharmaceutical analysis [23,24], i.e., an average recovery of $(100\pm 0.1)\%$.

2.4.4 Specificity

Forced degradation studies were performed using diluted Erbitux® sample solutions of 2.0 mg/mL of CTX in 0.9% NaCl. ICH Q5C [25] recommends that stability testing should be carried out at representative concentrations of the final product, which, in the case of typical hospital conditions for CTX, would be in the range of 2.0–5.0 mg/mL for injected solutions for perfusion [1]. The lowest concentration was used for the stress study. The stress conditions studied were high temperature, high ionic strength, light exposure, addition of an acid and a base, and addition of an oxidant. The chromatograms for the stressed samples were compared with those for a freshly prepared CTX standard solution that had not undergone degradation treatment. All samples were analyzed in triplicate.

Two levels of stress conditions were tested when the CTX sample was put under stress using acid (1 M HCl), alkaline (0.1 M NaOH), ionic (1.5 M NaCl) and oxidative media (1 M H₂O₂). For the lower-level stress condition, the concentration of the stressed agent was 3.3% (v/v) (50 mL of the stressed agent was added to 1.5 mL of mAb standard solution), while for the higher level stress condition, the stressed agent concentration was 25% (v/v) (500 mL of the stressed agent was added to 1.5 mL of mAb standard solution). The samples were analyzed 24 h after preparation. The effect of high temperature was evaluated by placing aliquots of the CTX standard solution in an oven (Heraeus S.A., Madrid, Spain) at the temperature of 50°C for 24 h, which is considered the maximum temperature to which samples could be accidentally exposed in hospital. After the specified time had elapsed, the solutions were analyzed. The effect of light was investigated by placing aliquots of the CTX standard solution samples in

an accelerated stress test chamber to simulate sun light (Solarbox 3000e RH, Cofomegra, Milan, Italy). The samples were light irradiated with a xenon lamp using a UV filter S208/S408 soda lime glass filter to simulate indoor exposure conditions with infrared rejection coating to reduce samples temperature. The temperature was controlled and maintained at 24 °C (considered as room temperature). Irradiance was set up at 250 W/m² between 300 and 800 nm.

Spectral peak purity was checked using the corresponding ChemStation software [26,27]. In brief, this assessment was based on a comparison of all the spectra recorded during the elution of the peak, one every 0.2 min, and on the calculation of a similarity function based on the regression coefficient (R^2). All of the spectra in the chromatographic peak were averaged to obtain a pooled spectrum which was compared with all the spectra in the peak to obtain the similarity function. The similarity factor was set to a value of $\geq 99.0\%$ for acceptance of the spectral peak purity.

2.4.5 System suitability

For system suitability testing, we used standard samples of 2.0 mg/mL prepared in 0.9% NaCl. ICH Q2(R1) [21] does not indicate criteria for the acceptance of system suitability either. We, therefore, decided to follow the USFDA criteria for HPLC methods of pharmaceutical analysis [23,24], although we used the symmetry factor instead of the asymmetry ratio of a peak. The selected system suitability parameters were N (acceptance criterion $N > 2000$), k' (acceptance criterion $k' > 2.0$), S (acceptance criterion $S \leq 2$), and injection repeatability (acceptance criterion $RSD \leq 1\%$).

2.4.6 Robustness

Robustness was evaluated by making small changes in the mobile phase composition ($B \pm 5\%$), the mobile phase flow rate (± 0.1 mL) and the temperature (tested from 60 to 70 °C), and these parameters mostly affect the chromatographic process. Aliquots of the CTX standard solution of 2.0 mg/mL were analyzed at each modified condition to assess the impact of the condition on the assay results. The robustness of the method was then estimated in terms of the retention time, the symmetry factor (S), the capacity factor (k'), and the number of theoretical plates (N).

2.4.7 Long-term study of diluted CTX samples (hospital administration conditions)

A diluted CTX sample of 2.0 mg/mL in 0.9% NaCl was prepared from the medicine Erbitux® as indicated in the scientific technical report for CTX [1]. This CTX sample was divided into 1 mL of aliquots and placed in amber glass vials (protected from daylight). One aliquot was stored refrigerated at 4 °C, and several aliquots were stored frozen at 20 °C. In the long-term study, the concentration of CTX was expressed as the percentage of the initial mAb concentration remaining at each checked time, where the initial concentration was that on the day when the samples were prepared (Day 0). In all cases, the reported concentration is the average of three replicates. The refrigerated sample was analyzed 1, 3, 7, 14 and 31 days after preparation. The frozen samples were analyzed after a month.

3. Results

3.1 Method development

The (RP)HPLC/DAD method previously developed for the analysis of intact RTX [15] was here checked for the analysis of CTX. In brief, we used a Zorbax 300 SB C8 analytical column because of its reported excellent temperature stability at low pH [28]; the mobile phase was a combination of isopropanol (i-PrOH), acetonitrile (ACN), water and trifluoroacetic acid (TFA), a strong elutropic solvent system required for the analysis of antibodies in order to reduce column interactions due to their high hydrophobicity [19]. The conditions used in the gradient allowed the elution of the intact CTX at a retention time between 7 and 8 min. This enables both a rapid result, which is important for routine analysis, and separation of CTX from degradation products, as occurs for example when subjected to oxidative stress conditions (discussed below). As in the previous work [15], two equilibration steps of the column were necessary to elute the mAb at the selected retention time (between 7 and 8 min), and without these steps, a small chromatographic peak from the system solvent overlapped with the chromatographic peak of the mAb (see Fig. 2, chromatographic peak at approximately 7 min). The peaks at 4 and 7 min were from the solvent system because they were detected when we injected water into samples (blank samples) (Fig. 2d). Despite using a post-time of 3 min with 10% phase B (the initial gradient conditions) to equilibrate the column, an extra minute was necessary under these analytical conditions to avoid

changes in the retention time of the chromatographic peak of the mAb. As described in the literature and later confirmed in a robustness study, slight changes in the mobile phase composition are critical in the elution of mAbs [18,19]. We also corroborated that column temperature was a critical chromatographic parameter. CTX was not eluted at temperatures below 50°C; with the increase of the temperature, CTX was eluted with a narrower and well-defined chromatographic peak. Then, we selected 70°C, the maximum value specified for this column. The chromatograms were recorded at different wavelengths ($\lambda=214$ nm, 220 nm, 254 nm, and 280 nm), using $\lambda=(360\pm 20)$ nm as the reference wavelength in all cases. The analytical parameters of the method were calculated using $\lambda=214$ nm, because it was the maximum absorption and the signal was less affected by the inherent heterogeneity of CTX.

In this way, we confirmed that the conditions selected for quantifying intact RTX are also suitable for the quantification of CTX. No appreciable differences were detected either in the chromatographic behavior or in the UV spectra of the two mAbs. Fig. 2 shows the chromatograms for CTX standard solutions under the chromatographic conditions. The UV absorption spectra recorded at the peak are also displayed (Fig. 2e), together with the results from the peak purity analysis (Fig. 2f), both of which are discussed in the next section.

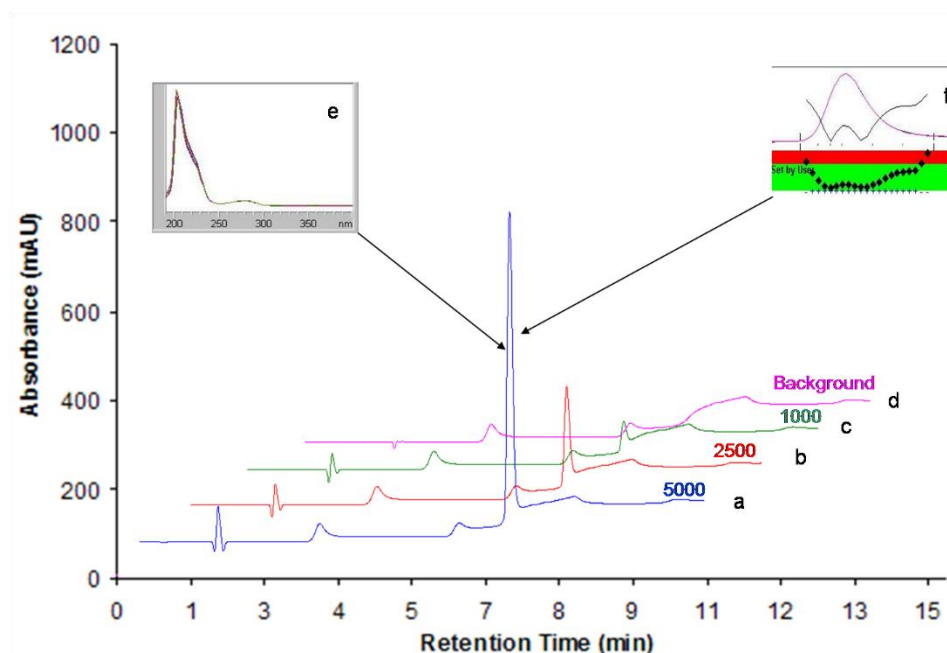


Figure 2. Standard solutions of 5000 mg/L (a), 2500 mg/L (b), and 1000 mg/L (c) of CTX standard samples analyzed by (RP)HPLC/DAD. UV absorption spectra recorded at the chromatographic peak and the graphic results for the spectral peak purity analysis using 99.3% as similarity factor. Chromatogram of a blank sample (d). UV absorption spectra recorded at the peak (e). Results from peak purity analysis (f).

3.2 Analytical method validation

The medicine Erbitux was used throughout the study as reference standard material for CTX. It is the marketed form of CTX and none of the ingredients interfere with the chromatographic analysis. In addition, in order to avoid any kind of change or degradation in CTX, the working standard solutions were prepared daily from the medicine (immediately after opening it) by appropriate dilution with 0.9% NaCl aqueous solution.

3.2.1 *Linearity, LOD, and LOQ*

The linearity of the method was corroborated up to 5.0 mg/mL, considering 2.0 mg/mL as the CTX target concentration. These concentrations were high, so the volume injected was as small as possible, i.e., 1 μ L. This was to avoid further dilution of the CTX samples when prepared at hospital conditions of use, i.e., between 2.0 and 5.0 mg/mL, so that they could be injected into the chromatographic system without the need for any previous manipulation that could bring about slight changes in the mAb. Higher CTX concentrations gave wider chromatographic peaks. Table 2 shows the results of the calibration function.

Table 2. Performance of the analytical methods.

Figure of merit	Value
Intercept (a)	-9.84
Slope (b)	1.050
s (a) ^a	20.6
P-value (%) ^b	0.64
s (b) ^c	0.007
R ² ^d	0.999
P-value (%) ^e	0.194
Practical linear range (mg/mL)	0.5-5.00
Limit of quantification (LOQ) ^f (mg/mL)	0.21
Limit of detection (LOD) ^f (mg/mL)	0.06

^a Standard deviation of the intercept.

^b Probability of intercept significant.

^c Standard deviation of the slope.

^d Determination coefficient

^e Probability of lack-of-fit test.

^f Estimated from the SD of the intercept (a).

The intercept (a) was not significant since the corresponding P-values were more than 5% whereas the slope (b) was significant with a P-value close to 0. The coefficient of determination (R^2), and the probability of a lackof-fit (P_{LoF} -value, %) indicated a high degree of fit for the experimental data to the linear model proposed. All criteria were fulfilled, indicating that the linearity of the response of the detector under the conditions selected for determining CTX was successfully demonstrated.

The LOD and LOQ were estimated as indicated in the Experimental section. The working range was then established between 0.21 and 5.0 mg/mL, with the LOQ being the lowest concentration in this range.

A proper quantification strategy in routine analysis could be implemented with this method since the null intercept and the linearity of the calibration curve have been corroborated. Under these conditions, the response factor (RF), defined as the ratio between the measured absorbance of a CTX-based medicine sample and its CTX concentration, can be considered to remain constant throughout the working range. To

this end, one representative CTX standard can be analyzed with each analytical batch, and quantification was carried out by applying the estimated RF value of the standard [29].

We also estimated the retention time of CTX. For this purpose, we used 40 chromatograms of CTX standard samples obtained at different concentrations and on different days, in order to gather all possible sources of variation in the measurement of the retention time. The average retention time calculated was 7.86 min with SD of 0.06 min, which means that, for a confidence level of 99.5% ($t=2.704$, $n=40$), the retention time interval of CTX was estimated as 7.86 ± 0.06 min. This retention time overlapped with the retention time of RTX (7.6 ± 0.2 min) [15].

3.2.2 Accuracy

The accuracy (trueness and precision) of the analytical method for quantifying intact CTX was verified across the linear range as stated in the ICH Q2(R1) guidelines [21]. As shown in Table 3, satisfactory results were obtained for the trueness and for both the intra-day and inter-day precisions of the method, expressed as recovery and relative standard deviation (RSD) values, respectively. The intra-day and inter-day RSDs were $\leq 2\%$ for all concentrations tested. The recovery values in all cases were close to 100% of the concentration checked, and the trueness fulfilled the acceptance criterion by falling within the range $100\% \pm 0.1\%$.

3.2.3 Specificity

Forced degradation studies were performed (according to the ICH Q2(R1) guidelines [21]) on Erbitux[®] sample solutions to evaluate the specificity of the proposed method. This stress study was also carried out to gather information about the degradation of the mAb under hospital conditions, as a means of evaluating the robustness of this CTX formulation against external factors. The stress factors we studied were those that could potentially affect stability. Furthermore, whereas stability testing requirements were defined in regulatory guidelines, the particular procedures for forced degradation studies of therapeutic proteins have not yet been standardized [30]. We, therefore, carried out the forced degradation studies described in the Experimental section

Table 3. Precision and accuracy of the method.

Concentration tested (mg/mL)	Recovery (%) ^a	Precision (RSD, %) ^b	
		Intra-day	Inter-day (5 days)
0.5	100	0.7	0.6
2.0	100.1	1.8	2.0
5.0	99.9	1.7	1.6

^a Recovery value obtained from ten samples prepared from the standard

^b Relative standard deviation from ten standard samples.

Chromatographic separation of the modified/degraded CTX was not always achieved. New chromatographic peaks that were clearly separated from the CTX peak were only observed in the ionic and oxidative stressed samples (Fig. 3). For these reasons, we proposed three different aspects to test CTX degradation/ modification. Firstly, we looked for new chromatographic peaks; secondly, we evaluated CTX chromatographic peak deformation; and thirdly, we carried out the peak purity analysis referred to above [15]. Modification/degradation of CTX could be detected by gathering the information about these three aspects. The method is, therefore, qualified to detect degradation/modification, although it can only be used to quantify CTX until modification/ degradation is detected. After that, the degradation can be evaluated but CTX cannot be quantified with the necessary scientific rigor.

Table 4 summarizes the results of the stress study conducted to evaluate the specificity of the method. The similarity factor (also peak purity factor) for CTX QC sample was set at 99.3%. Due to the inherent micro-heterogeneity of CTX [31], the spectra obtained from the chromatographic peaks of fresh standard samples were not identical (Fig. 2e), with the main dissimilarity observed between approximately $\lambda=220$ and $\lambda=235$ nm. As a result of these slight spectral variations, peak purity analysis indicated impurities, considering the reference value of the similarity factor, i.e., 99.3% the default value for the ChemStation software [27]. This analysis represents an attractive alternative to the use of a mass spectrometric detector for assessing peak purity, due to its cost/benefits and simplicity. These numerical methods for calculating similarity based on the correlation coefficient are also considered to be suitable for assessing the degree of similarity between protein absorption spectra [32]. In the stress study of CTX, spectral peak purity was only assumed, i.e., no significant changes were

detected compared with the CTX standard, when the similarity function calculated for the corresponding chromatographic peak was higher than 99.3%.

Modification/degradation of CTX in medicine samples subjected to stress conditions, both weak and strong, was detected from the similarity factor value, i.e., below the fixed value of 99.3% as can be noted from results in Table 4. Fig. 3 shows the chromatograms of the stressed samples. Nevertheless, a new chromatographic peak clearly separated from the CTX peak was only observed when samples were subjected to strong ionic and oxidative stress. This new peak was observed at 1.7 min. Substances at this short retention time were not retained in the column (retention time of the front). In the case of the oxidative stress, this peak could be attributed to the oxidation of methionine (Met), the amino acid most susceptible to oxidation, the result of which is a polar sulfonic group not retained in the column [33]. Other minor modifications such as oxidation of aromatic amino acids (Trp, Tyr, and Phe residues) [34, 35] and deamidation of specific amino acids with the pH (mainly Asn and Gln residues) [33] produce slight differences in the hydrophobicity relative to that of the intact CTX that cannot be chromatographically detected by (RP)HPLC/DAD.

It is also worth highlighting that the formation of aggregates is likely when mAbs are subjected to high temperatures or to light due to unfolding or partial unfolding of the molecule [30,31].

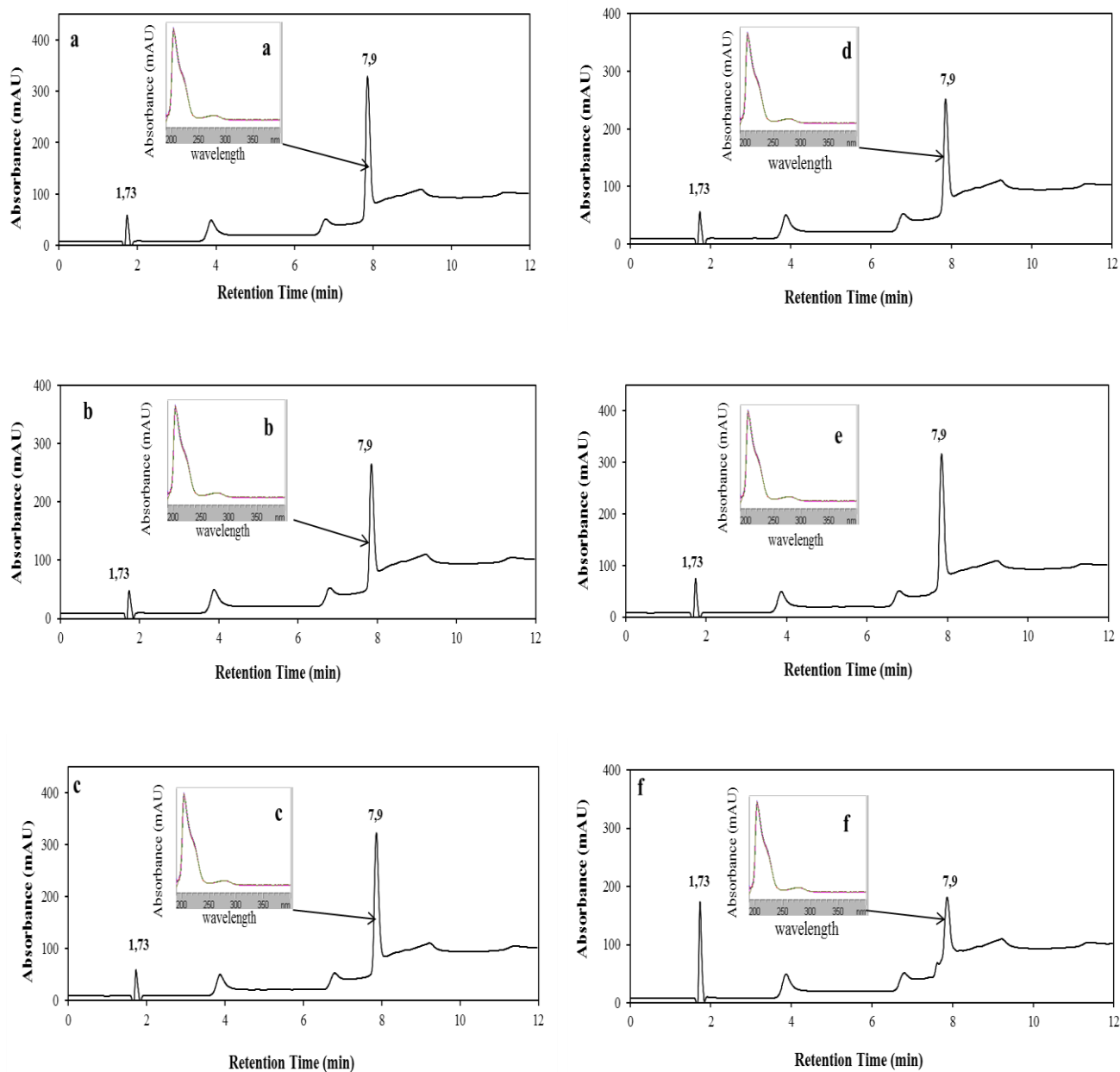


Figure 3. Stress study of medicine sample solutions of 2000 mg/L of CTX prepared in 0.9% NaCl. Stronger stress condition studied: (A) Temperature, 50°C; (B) light stress; (C) weak basic media; (D) strong basic media; (E) weak ionic stress; and (F) strong oxidative stress.

Table 4. Specificity study (stress study).

Stress type	Stress intensity	Similarity factor (%)	Degradation peaks	Decreased area under CTX peak (%)	CTX peak deformation
Quality control	-	99.3	No	-	No
Temperature	50°C	99.0	No	3.8	No
Light stress	-	98.7	No	28.3	No
Ionic stress	Weak	99.3	No	7.8	No
	Strong	99.2	Yes	31.6	No
Oxidative media	Weak	99.1	No	10.1	No
	Strong	98.8	Yes	55.7	No
Acidic media	Weak	99.2	No	8.6	No
	Strong	99.1	No	31.1	No
Basic media	Weak	99.1	No	6.6	No
	Strong	98.9	No	33.2	No

The results for CTX indicated that if the mAb underwent such conformational changes, they were not reflected in the chromatograms as new peaks. This means that these changes did not affect the physicochemical chromatographic process, which indicated that aggregates could not be separated on the RP column. The slight differences in the similarity factor may be attributed to the formation of aggregates. More research is currently being conducted on this aspect using other forms of chromatography.

Therefore, from the point of view of the specificity of the proposed (RP)HPLC/DAD method, the results of the stress study indicated that the degraded or modified fraction of CTX could not be chromatographically separated from the non-degraded CTX. Efforts were made throughout the stress study to chromatographically separate these different forms by modifying the gradient of the mobile phase, testing both more and less polar phases, but the relatively slight differences in polarity of the degraded/modified forms of CTX prevented separate elution. Nevertheless, the procedure based on the three aspects cited above could be used to detect slight modifications in the intact CTX, so fulfilling in part the criterion for the specificity. For this reason, we propose that the

method be considered stability-indicating for quantifying intact CTX, since it is qualified to detect degradation/ modification in the mAb. Once these changes are detected, the method cannot be used for quantification purposes because the different degraded forms of CTX cannot be chromatographically separated. This means that the method fulfills the ICH guidelines in part, although not completely.

3.2.4 *System suitability*

The system suitability study focused on the evaluation of parameters affected quantification. In this way, CTX standard samples at the targeted concentration (2.0 mg/mL) were used to evaluate various chromatographic parameters i.e. the retention time (7.8 min), symmetry factor (0.78), theoretical plates (42333) and the capacity factor (3.51). The suitability of the analytical system (instrument+method+operator) was demonstrated, as these chromatographic parameters coincided with previously established values (see Section 2). In addition, the reproducibility of the injection volume (0.05% RSD for 1 μ L) was less than that established in the criteria (RSD \leq 1%).

3.2.5 *Robustness*

The results of the study performed to evaluate the robustness of the proposed method are summarized in Table 5. As expected, the composition of the mobile phase and temperature were the most important influences on the robustness. Indeed, when the polarity of the mobile phase was increased, intact CTX was eluted at a shorter retention time and overlapped with a peak at 7.1 min from the base line. The same thing occurred when temperature decreased to 68 °C. This was why the number of theoretical plates was the highest when the mobile phase contained 35% phase B or the column temperature was set at 68 °C (Table 5). Column temperature < 60 °C caused notable deformation of the chromatographic peak of intact CTX and prevented it from being analyzed. At temperatures of > 65 °C, peak deformation was not detected, although the area under the peak decreased slightly, probably due to adsorption onto the column.

Table 5. Robustness study

Variations	Retention time (min)	Symmetry factor	Theoretical plates	Capacity factor
Flow rate (mL/ min)				
1.0	7.8	0.78	42333	3.51
0.9	8.2	0.68	35541	3.70
1.1	7.6	0.73	31626	3.38
Gradient variation (B %)^b				
30:60^a	7.8	0.78	42333	3.51
25:55	8.8	0.72	41390	4.07
35:65	7.1	0.68	41089	3.08
Temperature (°C)				
70^a	7.8	0.78	42333	3.51
68	7.5	0.72	39842	3.22
60	No peak detected	-	-	-

^a Selected chromatographic condition for the HPLC method.

^b Indicted as the modification of B (%) in the gradient of the mobile phase.

3.3 Assay of CTX in a long-term study (hospital conditions)

The proposed method was used to quantify and assess CTX samples under hospital conditions in an ongoing long-term stability study. The study was conducted at a target concentration of 2.0 mg/mL, considered representative of the final product when administered in hospital [25]. This study was performed in the context of a wider project that seeks to implement and validate analytical methods and protocols to characterize mAbs, with an additional objective being to extend, if possible, the shelf lives of these surplus biotechnological products used in hospital pharmacy departments.

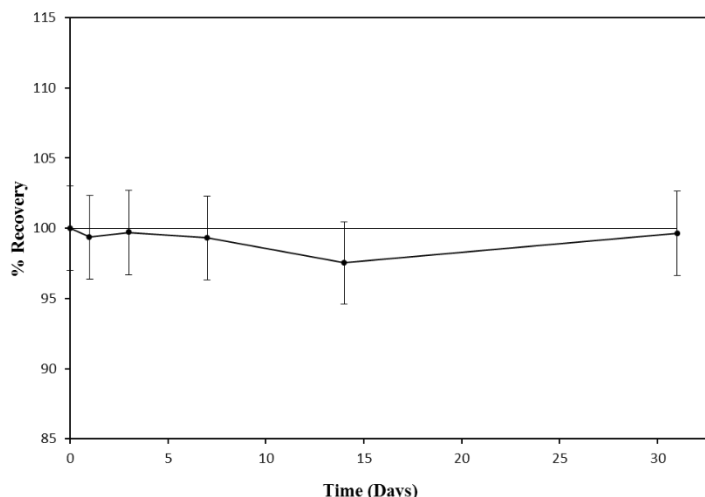


Figure 4. Graphical results of the long-term study of CTX sample solutions of 2000 mg/L prepared from dilution of Erbitux in 0.9% NaCl.

Figure 4 shows the evolution of the CTX concentration for the sample refrigerated at 4 °C. Table 6 summarizes the criteria to detect the modification/degradation of CTX to this study. These results show a surprising stability for this mAb, indicating no modification/degradation for a month when stored at 4 °C, in contrast to the results of studies we are currently performing on other mAbs (some of which have already been published), in which changes are detected after about a week [15]. We are currently conducting more studies using different liquid chromatographic modes and by ELISA.

Table 6. Long-term stability study results. Criteria to detect modification/degradation in CTX in solution at 2 mg/mL.

Day	Similarity factor (%)	Degradation peaks	Intensity lost (%)	Peak deformation
0	99.3	No	-	No
1	99.3	No	0.17	No
3	99.3	No	0.29	No
7	99.3	No	0.36	No
14	99.3	No	0.51	No
31	99.2	No	0.68	No

4. Conclusions

This study contributes to demonstrating the suitability of RP–LC coupled to DAD for the rigorous quantification of therapeutic intact monoclonal antibodies despite the inherent complexity of this class of biotherapeutic drugs. In particular, we proposed the rigorous quantification of the intact CTX using a simple, accurate and validated (RP)HPLC/DAD method. All the aspects considered in the validation procedure following the ICH guidelines were successfully fulfilled except for those related to the chromatographic separation of the different forms of the intact CTX when degraded under specific stress conditions. This was because the differences in the polarity are insufficient to enable degraded form of CTX to be chromatographically separated by reverse-phase chromatography. Nevertheless, the method can be considered stability indicating as it is qualified to detect the modifications in the intact CTX by applying the criteria proposed based on the analysis of the chromatograms and the spectral peak purity. The method can, therefore, be used to test mAb stability in both quality control processes and long-term stability studies, and we should always bear in mind that biopharmaceuticals such as mAbs should be analyzed and studied by various analytical methods simultaneously. The proposed method here is only focused on quantification aspects. Taking this into account, in addition to being simple, the method is also precise, accurate and robust and it is a good alternative for the analysis of intact therapeutic mAbs. The method also proved successful in quantifying intact CTX in a long-term stability study, demonstrating its usefulness for such purposes. This work is part of a wider project that aims to propose rigorous analytical methods and validated protocols for the study of marketed therapeutic mAbs. This method represents only one of the analyses needed to characterize mAbs.

Acknowledgments

This project was entirely funded by Project FIS: P110/00201 (Instituto Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Spain); therefore, this project has also been partially supported by European Regional Development Funds (ERDF). The authors would like to thank the Hospital Pharmacy Unit of the University Hospital of “San Cecilio” for kindly supplying all the medicine samples and the Biomedical Research Foundation “Alejandro Otero” (FIBAO) for the support given during the research.

References

- [1] Scientific discussion cetuximab mab EMEA, 2004. (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000558/WC500029113.pdf).
- [2] D.S. Dimitrov, Therapeutic Proteins, in: V. Voynov, J.A. Caravella (Eds.), Springer, New York, New Jersey, 2012, pp. 1–26.
- [3] D.R. Mould, K.R.D. Sweeney, The pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies, *Curr. Opin. Drug. Discov. Dev.* 10 (2007) 84–96.
- [4] S. Rosati, N.J. Thompson, A.J.R. Heck, Tackling the increasing complexity of therapeutic monoclonal antibodies with mass spectrometry, *TrAC-Trends Anal. Chem.* 48 (2013) 72–80.
- [5] A. Beck, E. Wagner-Rousset, D. Ayoub, et al., Characterization of therapeutic antibodies and related products, *Anal. Chem.* 85 (2013) 715–736.
- [6] D. Ayou, W. Jabs, A. Resemann, et al., Correct primary structure assessment and extensive glyco-profiling of cetuximab by a combination of intact, middleup, middle-down and bottom-up ESI and MALDI mass spectrometry techniques, *mAbs* 5 (2013) 699–710.
- [7] C.W. Damena, H. Rosing, J.H. Schellens, et al., Quantitative aspects of the analysis of the monoclonal antibody trastuzumab using high-performance liquid chromatography coupled with electrospray mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2008) 449–455.
- [8] H.J. Stemmler, M. Schmitt, A. Willems, et al., Ratio of trastuzumab levels in serum and cerebrospinal fluid is altered in HER2-positive breast cancer patients with brain metastases and impairment of blood–brain barrier, *Anticancer Drugs* 18 (2007) 23–28.
- [9] G. Hampson, T.H. Ward, J. Cummings, et al., Validation of an ELISA for the determination of rituximab pharmacokinetics in clinical trials subjects, *J. Immunol. Methods* 360 (2010) 30–38.
- [10] International Conference on Harmonisation (ICH) guidelines ICH Q6B, Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/ biological products, 1999.
- [11] D. Staub, D. Guillaume, J. Schappler, et al., Intact protein analysis in the biopharmaceutical field, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55 (2011) 810–822.
- [12] S. Fekete, S. Rudaz, J. Fekete, et al., Analysis of recombinant monoclonal antibodies by RPLC: toward a generic method development approach, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 70 (2012) 158–168.
- [13] S. Grotefend, L. Kaminski, S. Wroblewitz, et al., Protein quantitation using various modes of high performance liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 71 (2012) 127–138.
- [14] I. Molnar, C.S. Horvath, Separation of amino acids and peptides on non-polar stationary phases by HPLC, *J. Chromatogr. A* 142 (1977) 623–640.

- [15] N. Navas, A. Herrera, A. Martínez-Ortega, et al., Quantification of an intact monoclonal antibody, rituximab, by (RP)HPLC/DAD in compliance with ICH guidelines, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 9351–9363.
- [16] L. Zhang, T. Patapoff, D. Farnan, et al., Improving pH gradient cation-exchange chromatography of monoclonal antibodies by controlling ionic strength, *J. Chromatogr. A* 1272 (2013) 56–64.
- [17] S. Guha, J.R. Wayment, M.J. Tarlov, et al., Electrospray – differential mobility analysis as an orthogonal tool to size-exclusion chromatography for characterization of protein aggregates, *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 1985–1994.
- [18] T.M. Dillon, D.V. Bondarenko, M.S. Ricci, Development of an analytical reversed phase high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry method for characterization of recombinant antibodies, *J. Chromatogr. A* 1053 (2004) 299–305.
- [19] T.M. Dillon, P.V. Bondarenko, D.S. Rehder, et al., Optimization of a reversedphase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry method for characterizing recombinant antibody heterogeneity and stability, *J. Chromatogr. A* 1120 (2006) 112–120.
- [20] J. Yang, S. Wang, J. Liu, et al., Determination of tryptophan oxidation of monoclonal antibody by reversed phase high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1156 (2007) 174–182.
- [21] International Conference on Harmonization (ICH) guidelines ICH Q2(R1), Validation of analytical procedures: text and methodology, 2005.
- [22] Analytical Methods Committee, Is my calibration linear? *Analyst* 9 (1994) 2363–2366.
- [23] Reviewer guidance, Validation of Chromatographic Methods, Center for Drug Evaluation and Research, US Food and Drug Administration, USA, 1994.
- [24] G.A. Shabir, Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization, *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 57–66.
- [25] International Conference on Harmonisation (ICH) guidelines Q5C, Quality of biotechnological products: stability testing of biotechnological/biological products, 1995.
- [26] Agilent Technologies, Evaluating System Suitability CE, GC, LC and A/D ChemStation Revisions: A.03.0x- A.08.0x, (<http://www.chem.agilent.com/Library/Support/Documents/a10424.pdf>).
- [27] Agilent Technologies, Peak Purity Analysis in HPLC and CE Using Diode-array Technology, Publication Number 5988-8647EN, Waldbronn, Germany, 2003.
- [28] Y. Chen, C.T. Mant, R.S. Hodges, Temperature selectivity effects in reversedphase liquid chromatography due to conformation differences between helical and non-helical peptides, *J. Chromatogr. A* 1010 (2003) 45–61.

- [29] L. Cuadros-Rodríguez, M.G. Bagur-González, M. Sánchez-Viñas, et al., Principles of analytical calibration/quantification for the separation sciences, *J. Chromatogr. A* 1158 (2007) 33–46.
- [30] A. Hawe, M. Wiggernhorn, M. Van de Weert, et al., Forced degradation of therapeutic proteins, *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 895–913.
- [31] H. Liu, G. Gaza-Bulseco, D. Faldu, et al., Heterogeneity of monoclonal antibodies, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 2426–2447.
- [32] B.M. Teska, C. Li, B.C. Winn, et al., Comparison of quantitative spectral similarity analysis methods for protein higher-order structure confirmation, *Anal. Biochem.* 434 (2013) 153–165.
- [33] M.C. Manning, D.K. Chou, B.M. Murphy, et al., Stability of protein pharmaceuticals: an update, *Pharm. Res.* 27 (2010) 544–574.
- [34] P. Qi, D.B. Volkin, H. Zhao, et al., Characterization of the photodegradation of a human IgG1 monoclonal antibody formulated as a high-concentration liquid dosage form, *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 3117–3130.
- [35] J.F. Shen, Y.M. Kwong, G.R. Keck, et al., The application of tert-Butylhydroperoxide oxidation to study sites of potential methionine oxidation in a recombinant antibody, *Tech. Protein Chem.* 7 (1996) 275–28

2.3. Conclusiones

Tras el desarrollo inicial del primer método para el análisis de RTX como método indicador de la estabilidad, este trabajo contribuye a demostrar la idoneidad de la técnica cromatográfica de fase inversa acoplada a un detector UV visible de diodos en fila para la cuantificación rigurosa de mAbs terapéuticos (contenido proteico), aquí demostrada para la cuantificación de CTX. Además, el método validado demuestra ser un método sencillo y preciso, a pesar de la gran complejidad estructural que caracteriza a esta clase de biofármacos.

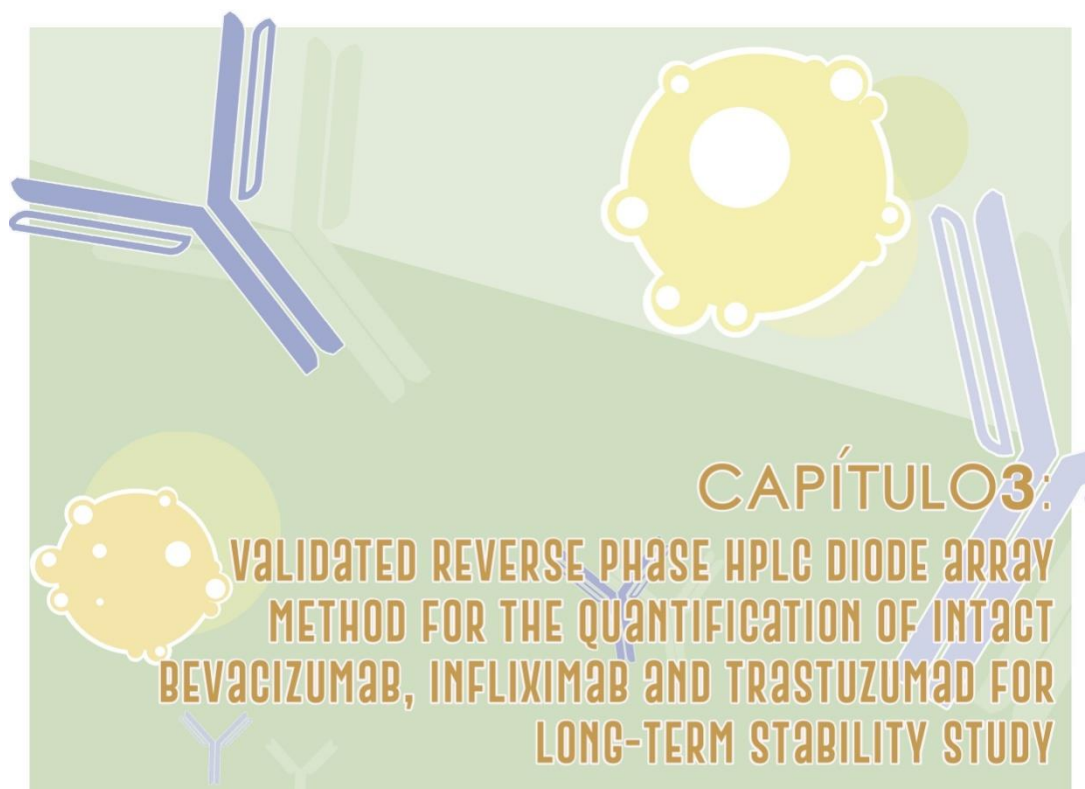
Todos los parámetros estudiados para la validación del método como método indicador de la estabilidad se realizaron en base a las indicaciones incluidas en la guía ICH Q2(R1). Los criterios de validación aplicados se cumplieron con éxito excepto los aspectos relacionados con la separación cromatográfica de las diferentes formas degradadas del mAb intacto CTX bajo condiciones de estrés específicas. Esto se atribuyó a que las diferencias en la polaridad de las formas degradadas de este mAb son insuficientes para permitir su separación cromatográfica mediante cromatografía de fase reversa.

A pesar de estas dificultades cromatográficas, el método se considera como indicador de estabilidad ya que está cualificado para la detección de modificaciones estructurales en el CTX intacto aplicando los criterios propuestos, basados en el análisis cromatográfico y la pureza espectral de los picos. Por esta razón, este método puede utilizarse para determinar la estabilidad de CTX en cuanto al contenido proteico, aplicable tanto en procesos de control de calidad como en estudios de estabilidad a largo plazo.

Así mismo, el amplio estudio de degradación controlada llevado a cabo, además de permitir la cualificación del método como indicador de la estabilidad en cuanto al contenido proteico de medicamentos y preparaciones farmacéuticas de CTX, muestra las rutas de degradación del mismo ante factores ambientales, lo cual aporta importante y nuevo conocimiento de el mismo sobre posibles vías de degradación y robustez frente a la degradación provocada por factores ambientales

a los que pueda estar sometido en algún momento de su vida, desde la producción hasta su administración al paciente.

En cuanto al estudio de estabilidad en el tiempo (un mes) de la preparación farmacéutica de CTX de uso clínico de 2.0 mg/mL en suero salino (NaCl 0.9 %) almacenada a 4°C protegida de la luz. Los resultados obtenidos evidenciaron la gran estabilidad del contenido proteico, no detectándose modificaciones/degradaciones en los picos cromatográficos en ninguno de los puntos estudiados durante el estudio.



CAPÍTULO 3:

VALIDATED REVERSE PHASE HPLC DIODE ARRAY
METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF INTACT
BEVACIZUMAB, INFlixIMAB AND TRASTUZUMAB FOR
LONG-TERM STABILITY STUDY



3.1. Introducción al capítulo 3

En el tercer capítulo de esta Memoria se muestran los resultados obtenidos tras la validación como indicador de la estabilidad de un método cromatográfico basado en la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa con detección UV-visible de diodos en fila ((RP)HPLC/DAD) para la cuantificación de los mAbs intactos BVZ, INF y TTZ, de acuerdo con las recomendaciones indicadas en la guía ICH Q2(R1).

Como ya se comentó en el Capítulo 2, dados los resultados satisfactorios obtenidos en la validación del método (RP)HPLC/DAD) propuesto para la cuantificación de los mAbs RTX y CTX como indicador de la estabilidad y considerando que los tres mAbs planteados -BVZ, INF y TTZ- para este trabajo son estructuralmente semejantes a los estudiados anteriormente (todos tipo IgG1), se propuso la evaluación de la idoneidad del citado método para el análisis de estos tres mAbs terapéuticos intactos. Tras confirmar dicha idoneidad, se procedió a la validación como método indicador de la estabilidad, de acuerdo con las pautas indicadas por la ICH Q2(R1) junto con los criterios de aceptación para métodos cromatográficos descritos por la FDA y en publicaciones de temática farmacéutica.

Por tanto, los parámetros evaluados fueron la linealidad y la función de calibrado, se determinaron los límites de detección y cuantificación, la precisión (repetibilidad y reproducibilidad) y la exactitud. Se determinó la robustez del método, así como la idoneidad del sistema para resolver el problema propuesto. De nuevo, el estudio de la especificidad fue un aspecto muy importante para la validación del método como indicador de la estabilidad, para lo cual se llevó a cabo un amplio estudio de degradación controlada de manera independiente y separada para cada mAb estudiado. Como en el anterior Capítulo 2, no pudieron ser separados cromatográficamente los productos de degradación de su proteína intacta no degradada, pero de nuevo, la estrategia propuesta empleando el análisis espectral de los correspondientes picos cromatográficos no-degradado/degradado, permitió cualificar el método como indicador de estabilidad. El resto de criterios de los

parámetros de validación, seleccionados a partir de criterios de la FDA y de publicaciones afines, fueron satisfechos.

Una vez validado el método, se llevaron a cabo diversos estudios de estabilidad a largo plazo (un mes) realizados en condiciones de uso hospitalario, es decir, a diferentes concentraciones de cada mAb (BVZ, INF y TTZ) en suero fisiológico (NaCl 0.9 %) y preparadas a partir de sus correspondientes medicamentos innovadores (Avastin®, Remicade® y Herceptin®, respectivamente). Las muestras se almacenaron refrigeradas a 4 °C protegidas de la luz y se estudió la estabilidad en tres diluciones del medicamento de manera que cubriera el intervalo de uso clínico. Estas concentraciones comprendieron el límite inferior y superior y una concentración intermedia, por lo que el valor de estas concentraciones fue 0.5 mg/mL, 2.0 mg/mL y 10 mg/mL para BVZ; 0.5 mg/mL, 2.0 mg/mL y 10 mg/mL para INF; y 0.5 mg/mL and 2.5 para TTZ. Se efectuaron análisis los días 0 (inicio del estudio, control), 1, 3, 7, 14 y 31 tras la preparación de las muestras. Para evaluar los ciclos de congelación-descongelación, varias alícuotas de cada mAb fueron almacenadas a -20°C y analizadas en el último día del estudio (día 31).

3.2. Publicación editada.

Validated reverse phase HPLC diode array method for the quantification of intact bevacizumab, infliximab and trastuzumab for long-term stability study

Antonio Martínez-Ortega^a, Agustín Herrera^b, Antonio Salmerón-García^c,
José Cabeza^c, Luis Cuadros-Rodríguez^d, Natalia Navas^d.

^a Department of Analytical Chemistry, University of Granada, Faculty of Science, Campus Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain.

^b Department of Analytical Chemistry and Department of Mineralogy and Petrology, University of Granada, Faculty of Science, Campus Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain

^c UGC Intercentro Interniveles Farmacia Granada, San Cecilio Hospital, Biomedical Research Institute ibs. GRANADA. Hospitales Universitarios de Granada, University of Granada, E-18012 Granada, Spain

^d Department of Analytical Chemistry, Science Faculty, Biomedical Research Institute ibis. GRANADA, University of Granada, Campus Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain



Validated reverse phase HPLC diode array method for the quantification of intact bevacizumab, infliximab and trastuzumab for long-term stability study



Antonio Martínez-Ortega^a, Agustín Herrera^b, Antonio Salmerón-García^c, José Cabeza^c,
Luis Cuadros-Rodríguez^d, Natalia Navas^{d,*}

^a Department of Analytical Chemistry, University of Granada, Faculty of Science, Campus Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain

^b Department of Analytical Chemistry and Department of Mineralogy and Petrology, University of Granada, Faculty of Science, Campus Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain

^c UGC Intercentro Interniveles Farmacia Granada, Biomedical Research Institute ibs. Granada, Hospitales Universitarios de Granada, E-18012 Granada, Spain

^d Department of Analytical Chemistry, Science Faculty, Biomedical Research Institute ibs. Granada, University of Granada, Campus Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain

Revista: International Journal of Biological Macromolecules 116 (2018) 993-1003

Aceptado: 21 de mayo de 2018

Categoría: POLYMER SCIENCE - SCIE

Índice de impacto (2020) Journal Citation Reports (JCR): 6.953

Posición: 6/90 (Percentil 93.89, Q1, D1)

DOI: DOI 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.142

Abstract

The aim of the present study was to develop suitable and reliable method for quantification three of the most worldwide used therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) -bevacizumab (BVZ), infliximab (INF) and trastuzumab (TTZ)- to be used in long-term stability studies. Reverse phase (RP) was selected by its greater sensibility and reproducibility comparing with other chromatographic modes. Then a high-performance liquid chromatography with diode array detection (RP)HPLC/DAD method was checked. Since the three mAbs represent the active ingredient in the medicines in which they are formulated, the selected method was validated for each one in accordance with the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines for pharmaceuticals for human use. Then method was validated in terms of linearity, accuracy, precision, (repeatability, intermediate precision) specificity (by forced degradation studies), robustness and system suitability. Spectral peak purity analysis strategy was used to test mAb degradations. Comparative study of the results indicated similar behavior for the three mAbs. Forced degradation studies also provided deep knowledge of these important bio-macromolecules. At last, the method was successfully used to quantify BVZ, INF and TTZ in long-term stability studies performed under hospital conditions of use and they showed great stability regarding quantification during the time of the study

Keywords: (Reverse phase) high performance liquid chromatography/diode array detector; Stress study; Therapeutic monoclonal antibody; accurate; quantification; Validation; Long-term study.

1. Introduction

Therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) represent nowadays a very important class of biotechnological drugs characterized by remarkable specificity and affinity in target recognition. These properties, combined with their relatively long half-lives, have contributed to their success in the treatment of significant diseases such as cancer and immunological illness. Nowadays they are of great and growing interest for the biopharmaceutical industry [1–3] representing the major class of biopharmaceutical products worldwide [4].

The most used immunoglobulin for pharmaceutical purposes is the subclass 1, i.e. IgG1 (Fig. 1) due mainly to its relatively long half-lives compared to the others IgG subclass [5,6]. The marketed mAbs bevacizumab (BVZ), infliximab (INF) and trastuzumab (TTZ) are representatives of this subclass, therefore they are glycoprotein with high molecular weight (approximately 150,000 Da). BVZ (Avastin®) is indicated for the treatment of several kind of cancer (metastatic carcinoma of the colon or rectum, breast cancer, lung cancer, etc) [7]. INF (Remicade®) is used for the treatment of psoriasis, Crohn's disease, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, rheumatoid arthritis and ulcerative colitis [8]. TTZ (Herceptin®) is indicated for the treatment of patients with metastatic breast cancer whose tumors over express HER2 (25% of the patients) [9]. As IgG1, the three mAbs share the same structure varying mainly in the variable region where is located the complementary determining region (CDR) through which are specifically bonded to their antigens (Fig. 1).

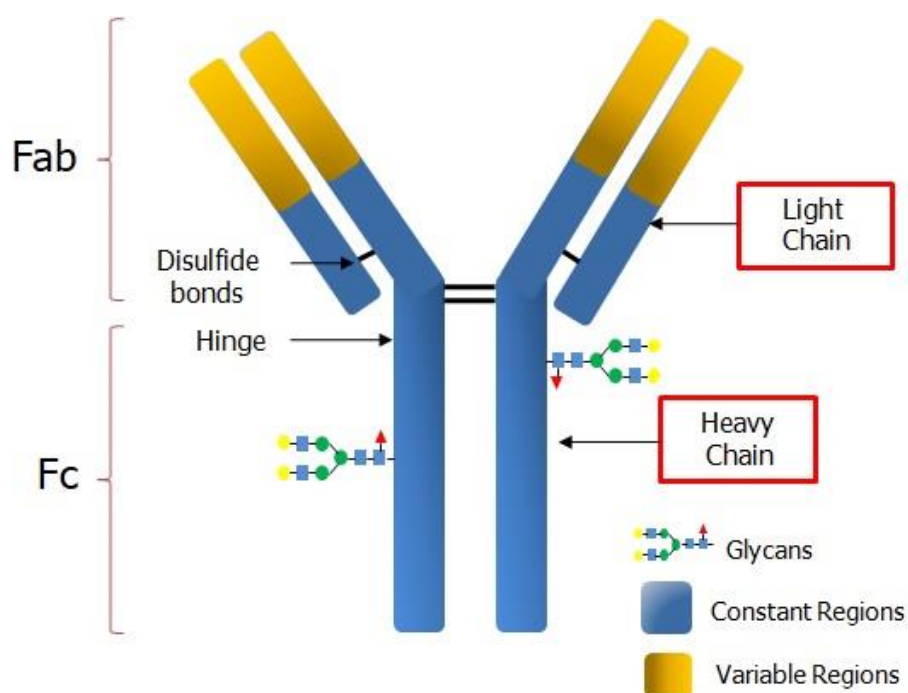


Fig. 1. General structure of IgG1.

Because of the complex nature of therapeutic mAbs, a variety of orthogonal analytical methods must be used to achieve appropriate characterization. In addition, as they are for therapeutic use, each analytical method applied to characterize mAbs

must fulfill as much as possible the requirements of the international drug regulatory organizations. The International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use gathers the recommendation to ensure the quality of the biotechnological products in Q5A - Q5E guidelines [10]; particular specification upon the test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products are established in Q6B guideline [11]. This last document indicates that the validation of analytical procedures used in the characterization of biotechnological products should be made in compliance with the ICH Q2(R1) guideline, relating to the validation of analytical procedures [12]. In any case and to support research data, validated methods for their intended purposes should be always required [13,14].

Although size exclusion (SEC) and ion exchange (IEC) chromatography are well-established techniques for the study of intact protein, the reverse phase (RP) chromatographic stationary phases developed with large pore size 300 Å or fused core particles with short alkyl chain make this mode of liquid chromatography a very effective technique for the analysis of intact proteins [15,16] by conventional HPLC systems. In these cases, high column temperature (60–75 °C) and a combination of non-traditional solvent systems with ion pairing agents are needed [17,18]. Also monoliths silica standard- and narrow-bore columns provide high reproducibility and efficiency in LC/MS analysis of biomolecules [19,20]. Nevertheless, SEC is the standard method for the analysis of mAb aggregates [21,22] while IEC is used to profile the charge heterogeneity [23]. Both modes of chromatography can therefore be used to track changes in mAbs and could be validated for these purposes [24]. On the other hand, quantification of mAbs has been achieved traditionally by ELISA [25,26]. However, the lower level of precision (about 10% of relative standard deviation in repeatability) and of robustness of the immunoassays compared with physicochemical based techniques led ICH to recommend the latter for quantification purposes [11]. It is evident that accurate determination of protein concentration is nowadays essential in many studies involving characterization, functional assays, and during quantitative assessments such as for example protein–protein and protein–ligand interaction process [27].

Mass spectrometry (MS) is an excellent analytical tool for studying the properties and behavior of proteins such as mAbs [28,29]. MS based methods are particularly useful for studying structural aspects such as primary sequence characterization [30], modifications (e.g. post-translational changes [31], C-terminal modification [32],

degradation patterns (e.g. deamidation [33], tryptophan oxidation [34]) etc. Primary structure assessment and extensive glycol-profiling of mAbs by a combination of intact, middle-up middle-down and bottom-up ESI and MALDI mass spectrometric techniques was demonstrated for the marketed mAb cetuximab (CTX) [35]. Nevertheless, in most of these studies, a previous step is required involving either enzymatic digestion or the fragmentation of the mAbs into their light and heavy chains. This is because mAbs are very large proteins (150 kDa molecular weight) and the quality of the results depends on the resolution and mass accuracy of the mass spectrometers. However, the continuous advances in tandem mass spectrometric instrumentation (tQ, quadrupole-time of flight (qTOF), high resolution Orbitrap, and Fourier transform-ion cyclotron resonance (FT-ICR) MS equipment) have made this a powerful technique for the structural analysis of intact mAbs [36,37]. Nevertheless, these are all complex, highly expensive strategies which are not always available for quality control or investigation purposes.

Two previous published works have demonstrated that two marketed mAbs, rituximab (RTX) and CTX, could be successfully quantified using an (RP)HPLC/DAD method that could be validated as stability-indicating in accordance with the ICH guidelines [38,39]. These two methods are therefore useful in the context of the quality control of the final products. In the present work we studied the quantification of BVZ, INF and TTZ by (RP)HPLC/DAD. With that aim, the method previously developed has been checked and validated here for the quantification of BVZ, INF and TTZ in compliance with the ICH guidelines for biotechnological products, including a wider stress study to check the feasibility of using it in the presence of modified or degraded products. It is proposed the use of spectral peak purity analysis which proved to be a simple way of detecting modifications in the intact mAbs. Therefore, in terms of analytical quality assurance, the method has been validated for quantification purposes and qualified for the detection of modification/degradation of the mAbs. We also present a comparative study of the method for each mAb, which shows that there were no significant differences between them in terms of the Figs. of merit of the method or in their chromatographic behavior. Even when subjected to particular accelerate degradation conditions, they do not exhibit different degradation patterns that could be tracked by RP chromatography. All the experiments were conducted with fresh mAb medicine samples to ensure full molecular and structural integrity of the mAbs during the study.

2. Experimental

2.1 Standards, substances and solvents

Avastin® (RochePharma AG, Grenzach-Wyhlen, Germany) was used as a representative BVZ reference material. Remicade® (Janssen Biotech, Inc. Horsham, Pennsylvania, USA) was used as a representative INF reference material. Herceptin® (Roche Pharma AG, GrenzachWyhlen, Germany) was used as a representative TTZ reference material. These were kindly supplied for this study by the Pharmacy Unit of the University Hospital "San Cecilio" (Granada, Spain) out of their daily surplus. All the standard solutions of the mAbs were prepared from these medicines. This was an essential preliminary step to enable us to conduct the study because it was impossible to obtain a proper standard of the mAbs. The medicines indicate a quantitative composition of 25 mg/mL of BVZ [7], 100 mg/vial of INF [8] and 150 mg/vial of TTZ [9]. The working standard solutions of each mAb were prepared daily from the corresponding medicine immediately after opening it by appropriate dilution with 0.9% NaCl aqueous solution. Our aim here was to avoid any kind of change or degradation in the mAbs, given that the stability indicated by the manufacturer once the vials have been opened is up to 48 h for BVZ [7], 24 h for INF [8] and 48 h for TTZ [9].

All reagents were of analytical reagent grade unless otherwise stated. Reverse-osmosis quality water (purified with a Milli-RO plus Milli-Q station from Millipore Corp., Madrid, Spain) was used throughout. Methanol, hydrochloric acid, sodium hydroxide, propan-2-ol and sodium chloride were supplied by Panreac (Barcelona, Spain). Hydrogen peroxide was supplied by Technical Fontenay-sous-Bois, France). Trifluoroacetic acid (TFA) was from Merck GaA (Darmstadt, Germany) and acetonitrile from Poch S.A. (Gliwice, Poland). An isotonic solution of 0.9% NaCl was supplied by B. Braun Medical (Madrid, Spain).

2.2 Chromatographic instrumentation and method

Chromatography was performed using an Agilent 1100 liquid chromatographer equipped with a quaternary pump, degasser, autosampler, column oven, and photodiode array detector (Agilent Technologies, Madrid, Spain). The instrument was connected to a personal computer fitted with an HPLC ChemStation workstation for LC 3D systems (Rev. A.0903, Agilent Technologies).

(RP)Chromatographic analyses were carried out in a 150 mm × 2.1 mm i.d., 5 µm particle size, wide pore 300 Å C8 analytical column (300SB-C8 Zorbax, Agilent Technologies, USA). A 2.1 mm × 12.5 mm i.d., 5 µm particle size, C8 guard column (SBC8 Zorbax, Agilent Technologies, USA) was also used. The eluent flow rate was 1.0 mL/min and consisted of a gradient of 0.1% TFA in Milli-Q water (eluent A) and a mixture of isopropanol, acetonitrile, Mili-Q water and TFA (70/20/9.9/0.1, v/v/v/v) (eluent B). The gradient started at 10% of eluent B for 1 min. It was then increased to 20% of B in 0.1 min and kept constant for 3 min; then eluent B was raised again to 30% B in 0.1 min, and a linear gradient was applied from 4.1 to 10 min; from 10 to 10.1 min eluent B was increased to 80% and this percentage was maintained until 12 min. A post time of 3 min was required at the initial conditions of the gradient, i.e. 10% of B eluent. The temperature of the column was maintained at 70 °C, and the injection volume was 1 µL. UV spectra were recorded between 200 nm and 399 nm, with a data point every 0.5 nm. Chromatograms were registered at 214 nm using 360 ± 20 nm as the reference wavelength.

2.3 Software

The STATGRAPHICS Plus 6.0 (Statistical Graphics System, 1992, Warrenton, VA) statistical software package was used for processing the chromatographic data.

2.4 Validation procedure

The validation procedure was performed according to the guidelines issued by the International Conference Guideline [11,12] and, when needed, criteria from the Food and Drug Administration (FDA) were also followed.

2.4.1 Linearity, LOD, and LOQ

Linearity was evaluated up to 10.0 mg/mL. To this end, appropriate individual mAbs standard solutions of 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 and 10.0 mg/mL were prepared in quadruplicate and injected into the chromatograph. Linear calibration functions were fitted by least squares regression, and linearity was accepted if the statistical probability level of the corresponding lack-of-fit test (PLOF-value) was >5% according to the Analytical Methods Committee [40].

The detection limit (LOD) and quantification limit (LOQ) for each mAb were estimated from the standard deviation of the lowest concentration tested ($SD_{\text{low-conc}}$) which is estimated as it is describe in the section bellow. LOD and LOQ were calculated as $3 \cdot (SD_{\text{low-conc}})$ and $10 \cdot (SD_{\text{low-conc}})$ respectively.

2.4.2 Precision

The precision of the method for each mAb was determined as intraday precision (repeatability) and intermediate precision and given as relative standard deviation (RSD %). The former was estimated from the results of the analysis of the corresponding mAb standard solution prepared at the same concentration on the same day. Thirty samples with high concentration levels (10 samples), medium concentration levels (10 samples) and low concentration levels (10 samples) were used for this purpose and for each mAb. The intermediate precision was estimated from the analysis of standard solutions at three concentration levels (high, medium and low) over five consecutive days. Two samples of each concentration were prepared and analyzed daily.

Because ICH Q2(R1) [12] does not establish any precision criteria for acceptance of the method, the U.S. Food and Drug Administration (FDA) criteria for HPLC methods for pharmaceutical analysis were followed [41], i.e. an intraday precision $\leq 2\%$.

2.4.3 Accuracy (*trueeness*)

The accuracy of the method for each mAb was assessed from the average recovery value calculated on ten standard solution replicates at three concentration levels representing the top end, middle value and bottom end of the calibration, in order to cover the stated linear range. Again, ICH Q2 (R1) [12] does not indicate accuracy criteria for acceptance; we therefore decided to follow the FDA accuracy criteria for HPLC methods for pharmaceutical analysis [41], i.e. an average recovery within $100 \pm 2\%$.

2.4.4 Specificity by forced degraded studies

Forced degradation studies were performed using different mAb concentrations in NaCl 0.9%. For BVZ and INF, specificity was studied at 0.5 mg/mL, 2.0 mg/mL and 10 mg/mL. For TTZ, it was studied at 0.5 mg/mL and 2.5 mg/mL. All these concentrations are representative of the final product when used in typical hospital conditions.

We recorded the chromatograms of sample solutions submitted to degradation for two reasons: firstly, to evaluate the specificity of the method, and secondly to detect degradation when the mAb is handled and administered in hospital conditions. We therefore studied the stress conditions of high temperature, high ionic strength, UV light exposure, addition of an acid and a base, and addition of an oxidant. The chromatograms of the stressed samples were compared with those for the corresponding mAb standard solution that had been freshly prepared and had not undergone degradation treatment. All samples were analyzed in triplicate.

The spectral peak purity was checked using the ChemStation software tools [42]. This assessment was based on the comparison of the spectra recorded during the elution of the peak, one every 0.2 min, and on the calculation of a similarity function based on the determination coefficient (R^2 , in percent). All the spectra in the chromatographic peak were averaged to obtain a pooled spectrum. This was compared with all the spectra in the peak to obtain the similarity function. The similarity factor was set to a value $\geq 99\%$ for acceptance of the spectral peak purity.

In the studies of the effects of acid and alkaline media, ionic strength and oxidation medium, two studies were conducted applying weak and strong conditions. HCl 1 M, NaOH 0.1 M, NaCl 1.5 M and H₂O₂ 1% were used to degraded mAbs samples. For the weak condition, the stressed agent concentration was 3.3% (v/v) (50 μ L of the stressed agent was added to 1.5 mL of mAb standard solution), while for the strong condition the

stressed agent concentration was 33.3% (v/v) (500 μ L of the stressed agent was added to 1.5 mL of mAb standard solution). The samples were analyzed 24 h after preparation.

The effect of high temperature was evaluated by placing aliquots of each mAb sample in an oven (Heraeus S.A., Madrid, Spain) at a temperature of 50 °C for 24 h.

The effect of the light was investigated following the guidelines issued by the International Conference on Harmonization (ICH Q1B) for photostability testing [43]. To this aim, the mAb samples were placed in an accelerated stress test chamber to simulate sunlight (Solarbox 3000e RH, Cofomegra, Milan, Italy). The samples were light irradiated with a xenon lamp (according to ICH Q1B) using an S208/S408 UV filter made of soda lime glass to simulate indoor exposure conditions with infrared rejection coating to reduce the temperature of the samples. The temperature was controlled and maintained at 24 °C. Irradiance level was set at 250 W/m², between 320 and 800 nm.

2.4.5 Robustness

Robustness of the method for each mAb was evaluated by small variations in those chromatographic conditions affecting more the results, such as temperature of the column, mobile phase composition and flow rate. Several aliquots of each mAb solution of 5.0 mg/mL were analyzed at each modified condition to assess any impact on assay results. The robustness of the method was then estimated by means of the retention time, symmetry factor (S), capacity factor (k'), and the number of theoretical plates (N).

2.4.6 System suitability

For system suitability testing, we used mAbs samples of 1.0, 2.5 and 5.0 mg/mL prepared in NaCl 0.9%. ICH Q2(R1) [12] does not indicate system suitability criteria for acceptance either; we therefore decided to follow the FDA criteria for HPLC methods of pharmaceutical analysis [41], although we used the symmetry factor instead of the asymmetry ratio of a peak. The selected system suitability parameters were therefore N (acceptance criterion $N \geq 2000$), k' (acceptance criterion $k' \geq 2.0$), S (acceptance criterion $S \leq 2$), and injection repeatability (acceptance criterion $RSD \leq 1\%$).

2.5 Long-term quantification study of BVZ, INF and TTZ in pharmaceutical preparation samples (hospital administration conditions)

Diluted samples of BVZ (0.5 mg/mL, 2.0 mg/mL and 10 mg/mL), INF (0.5 mg/mL, 2.0 mg/mL and 10 mg/mL) and TTZ (0.5 mg/mL and 2.5 mg/mL) in 0.9% NaCl were prepared from their medicines Avastin®, Remicade® and Herceptin® respectively. The specification included in their scientific technical reports were followed for the preparation of all these solutions [7,8,9]. These samples were aliquoted, placed in amber glass vials (protected from daylight) and stored refrigerated at 4 °C. Likewise, several aliquots were stored frozen at -20 °C. The refrigerated samples were analyzed at 1, 3, 7, 14 and 31 days after preparation. The frozen samples were analyzed after a month and considering only un cycle frozen/thawed. In the long-term quantification study, the concentrations of BVZ, INF and TTZ were expressed as percentage of the initial mAb concentration remaining at each checked time, where the initial concentration was that on the day when the samples were prepared (Day 0). In all cases, the reported concentration is the average of three replicates.

3. Results and discussion

3.1 (RP) HPLC/DAD method performance for the quantification of BVZ, INF and TTZ

The chromatographic conditions optimized in the previous work for the quantification of the two previous marketed mAbs [38,39] were here checked for the quantification of BVZ, INF and TTZ. The chromatographic analysis was based on the use of a C8 stationary phase and a combination of isopropanol (i-PrOH), acetonitrile (ACN), water and trifluoroacetic acid (TFA) as mobile phase. This mobile phase composed by stronger eluotropic strength solvents is required for the analysis of antibodies to reduce column interactions [21].

Again, it was corroborated that a temperature of 70 °C was mandatory to perform the analysis, being this parameter critical for obtaining suitable chromatographic peaks as afterward highlighted in the robustness study. Another similar results in the chromatographic analysis of all the mAbs studies up to now was the chromatographic profile, with mAbs retention time at around 7.5 min well separated from peaks from the solvent system that were detected at around 4 min and 7 min. Fig. 2 shows the chromatograms registered at 214 nm using 360 ± 20 nm as the reference wavelength for standard samples of 5000 mg/L of BVZ, INF and TTZ. The UV absorption spectra

recorded at the peaks are also shown together with the graphic results for the peak purity analysis in this Fig. 2. As can be seen, there were no appreciable differences in the RP-chromatographic profile, with very similar retention times for the three mAbs, and also very similar to those previously obtained for RTX [38] and for CTX [39]. These results indicated again that the chemical differences among all these therapeutic marketed mAbs are not sufficient to cause differences in their polarities that would enable separation in chromatographic column in reverse phase method using classical stationary phases despite their wider pores (300 Å) and long alkyl chains (C8 and C18).

This last is corroborated by the characteristic retention time established for each mAbs. It was estimated from 40 chromatograms obtained from standard samples with different concentrations and registered on different days; this was in order to cover all possible sources of variation in the measurement. The average retention time estimated in this way was 7.5 ± 0.2 min for BVZ, 7.6 ± 0.2 min for INF and 7.5 ± 0.3 for TTZ (confidence level of 99.5%).

In addition, the UV absorption spectra of the three mAbs are similar both in shape and in sensitivity (and similar to the UV absorption spectra of RTX [38] and CTX [39]).

Therefore, the therapeutic mAbs studied (IgG1 all of them) are indistinguishable by (RP)HPLC/DAD. Nevertheless, using these chromatographic conditions, an ICH validated method for quantification purposes can be proposed for each of them as shown next.

3.2 (RP) HPLC/DAD method validation for the quantification of BVZ, INF and TTZ

Once the method performance was assessed for each mAb, validation in compliance with the ICH guidelines was carried out. As already indicated, we followed the ICH Q6B [11] guidelines, which indicate that the quantity of a biotechnological product, measured as protein content, should be determined using an appropriate assay, usually physicochemical in nature. The analytical procedures developed for such purposes should be validated in compliance with the ICH Q2(R1) [12]. We therefore validated the (RP)HPLC/DAD whole analytical method for the determination of BVZ, INF and TTZ in terms of linearity, limits of detection and quantification, precision, accuracy, specificity, robustness and system suitability.

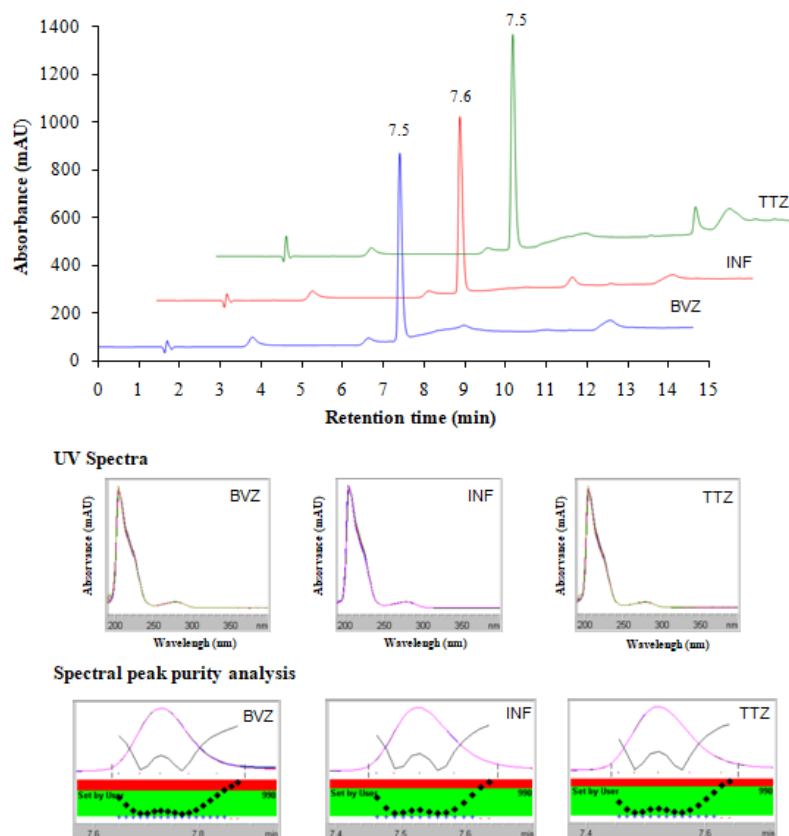


Fig. 2. Standard solutions of 5000 mg/L of (a) BVZ, (b) INF and (c) TTZ analyzed by (RP)HPLC/DAD optimized conditions. UV absorption spectra recorded at the chromatographic peak and the graphic results for the spectral peak purity analysis using 99.5% as similarity factor for BVZ, INF and TTZ.

3.2.1 Linearity

Linearity was studied bearing in mind further application of the method, i.e., BVZ, INF and TTZ in diluted solutions, those used in hospital. The interval of the concentration to be tested was also adjusted to avoid further dilution of these diluted solutions of the mAb, in order to inject them into the chromatogram equipment without previous manipulation that could bring about slight changes in their composition. In brief, the clinical target concentrations were 1.0 mg/mL, 5.0 mg/mL and 10.0 mg/mL, therefore linearity was studied up to 10.0 mg/mL. These represent high concentration values, so the volume we injected was as small as possible, i.e. 1 μ L. Nine concentration levels with four independent replicates for each one were used to determine the calibration function, as described above in the Experimental section. Nevertheless, linearity was

established to 5.0 mg/mL because above this value a deviation of the linearity of the response of the detector was observed by studying the residual; therefore linearity was assumed only up to 5.0 mg/mL. Once the LOD and the LOQ were calculated, the calibration working range was established, as can be seen in Table 1 with LOQ being the lowest concentration in this range. The results for the intercept (a), slope (b) and determination coefficient (R^2), used to check the linearity are summarized in Table 1. The R^2 value we obtained was evidence of the acceptable fit of the data to the estimated regression line and it could therefore be concluded that the linearity of the response of the detector in the selected conditions for determining BVZ, INF and TTZ was successfully demonstrated up to 5.0 mg/mL. In addition, the intercept was not significant since the corresponding P-values were >5% (see Table 1).

Table 1. Performance of the analytical methods.

Feature	Bevacizumab	Infliximab	Trastuzumab
Intercept (a)	-92.6	-95.7	-97.4
Slope (b)	1.16	1.20	1.29
s(a) ⁽¹⁾	47.00	48.37	46.58
P-value (%), for a=0 ⁽²⁾	0.06	0.06	0.05
s(b) ⁽³⁾	0.018	0.018	0.018
R^2 ⁽⁴⁾	0.9977	0.9978	0.9982
P _{LOF} -value (%) ⁽⁵⁾	0.028	0.13	0.25
Linear range (mg/L)	45 - 5000	88 - 5000	21 - 5000
Limit of detection (LOD) (mg/L) ⁽⁶⁾	13	26	6
Limit of quantification (LOQ) (mg/L) ⁽⁶⁾	45	88	21

(1) Standard deviation of the intercept.

(2) Statistical probability of intercept test (a = 0).

(3) Standard deviation of the slope.

(4) Determination coefficient.

(5) Statistical probability of lack-of-fit test.

(6) Calculated from the standard deviation of the mAb concentration, estimated at low concentration (n=10).

Both facts, the null intercept and the linearity of the calibration curve, are crucial for selecting a proper quantification strategy in routine analysis. In these conditions, the

response factor (RF), defined as the ratio between the measured absorbance of a BVZ, INF- and TTZ-based medicine sample and its concentrations could be considered to remain constant throughout the working range. Then, it can be proposed that one representative standard sample of each be analyzed with each analytical batch and quantification be carried out by applying the estimated RF value of the standard [44].

3.2.2 *Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)*

Although the LOD and LOQ are not critical in this study since the target concentrations of the mAbs are very high, they were estimated using the standard deviation of the lowest concentration tested. The values obtained are shown in Table 1. Using this criterion, the lowest LOD and LOQ were obtained for TTZ, followed for BVZ and the highest were for INF.

3.2.3 *Accuracy and precision*

The accuracy and precision of the analytical method for the therapeutic mAbs were established across their linear range as stated in the ICH Q2(R1) guidelines [12]. As shown in Table 2, satisfactory results were obtained for the accuracy and for both the intraday and interday precision of the method, expressed as recovery and RSD values, respectively. These results were very similar for the three mAbs (see Table 2). The intraday and interday RSD was $\leq 2\%$ for all concentrations tested, with the highest values for the target concentration of 1.0 mg/mL (the lowest concentration assayed). In all cases the recovery values were close to 100% of the checked concentrations, so fulfilling the acceptance criterion for recovery by falling within the range $100 \pm 3\%$.

3.2.4 *Specificity by means of forced degraded studies (stress studies)*

Forced degradation studies were performed, following the ICH Q2 (R1) guidelines [12], on Avastin®, Remicade® and Herceptin® to evaluate the specificity of the method for BVZ, INF and TTZ respectively. This stress study was also carried out to gather information about the degradation of these mAbs under hospital conditions, as a means of evaluating the robustness of the mAbs formulation against external factors. This is important because these kinds of therapeutic protein are exposed to various types of stress during administration and could suffer more serious changes or degradation than chemical drugs. Of the various stress factors that can be studied, we decided to focus

on those that may affect stability. Furthermore, whereas stability testing requirements are defined in regulatory guidelines, the specific procedures for forced degradation studies of therapeutic proteins have not yet been standardized [45]. We therefore carried out the forced degradation studies described below.

In all the experiment, the assessing of the mAb degradation was performed by spectral peak purity analysis in addition to the detection of mAb peak deformation and/or new chromatographic peaks in the chromatograms. By comparing the absorption spectra from the chromatographic peak corresponding to the fresh mAb samples and the stressed samples, we were able to detect degradation/modification in the mAb. This strategy therefore offers an attractive alternative to using a mass spectrometric detector for peak purity, due to its cost-benefits and simplicity in routine quality control. On the other hand, these numerical methods for calculating similarity based on the correlation coefficient are common procedures to assess the degree of similarity between protein absorption spectra [46]. In the particular case of the mAbs, their inherent heterogeneities [47] promote that the recorded UV spectra in the chromatographic peak of a fresh standard sample were not identical (Fig. 2), with the main dissimilarity observed approximately between 220 and 235 nm. As a result of these slight spectral variations, the peak purity analysis indicated 99.5% for the similarity factor, and it was used as the reference value for accepting peak purity in the degradation studies [42]. This value was obtained from the analysis of the chromatograms of their fresh standard samples used to establish the calibration functions of each mAbs.

Table 2. Accuracy (trueness) and precision.

mAb	Checked concentration (mg/mL)	Recovery ^(a) (%)	RSD (%) ^(b)	
			Intraday	Interday (5 days)
Bevacizumab	1	98.5	0.92	1.48
	2.5	99.2	0.48	0.51
	5	99.3	0.55	0.60
Infliximab	1	97.2	1.69	1.53
	2.5	99.6	0.57	0.53
	5	99.7	0.98	0.81
Trastuzumab	1	99.7	0.78	0.66
	2.5	99.5	0.41	0.57
	5	99.7	0.50	0.51

(a) Mean of three determinations.

(b) Relative standard deviation of three determinations.

When subjected to the accelerated degradation conditions the three mAbs again exhibited similar behavior, and similar results to those obtained for RTX [38] and CTX [39]. Fig. 3 shows the results of the stress study, the only difference being when the samples were heated, when BVZ showed different degradation patterns.

Thermal stress was evaluated at temperatures of 30 °C and 50 °C (considered the maximum value for accidental exposure to high temperatures in hospital). When medicine samples were subjected to these temperatures for 24 h, the RP-chromatographic profiles of the three mAbs were similar to those for the reference samples. No unknown chromatographic peaks were found and the recovery values were close to 100%. As an example of these results, Fig. 3 shows the chromatographic results for TTZ submitted to 50 °C. In addition, the similarity factor indicated a high degree of spectral peak purity (99.5%) in all the analysis. It is described in the bibliography [47] that antibodies could undergo conformational changes such as unfolding or partial unfolding at these temperatures. These changes seem did not occur for these three marketed mAbs here studied.

For the rest of the stress conditions studied, the results were also similar for the three mAbs. When the medicine samples were subjected to weak stress conditions, the loss of concentration was <10% for all the samples analyzed, the spectral peak purity remained at the reference value of 99.5%, modifications in the shape of the chromatograms and new peaks were not detected in the chromatograms, except in the case of the samples subjected to oxidative conditions. In this last case, a peak appeared in the chromatograms at 1.7 min (as example, see Fig. 3, INF strong oxidative stress). It is well known that the amino acid methionine (Met) is highly susceptible to oxidation. As described in the previous paper for the oxidation of RTX, this chromatographic peak could be attributed to the oxidation of the Met residues that yielded a sulfoxide group that makes the side chain of the Met more polar. The fact that these peaks eluted earlier could be attributed to the degraded mAbs containing oxidized Met. The oxidation of Met has been reported for human IgG1 (like the mAbs studied here) when incubated with tert-butyl hydroperoxide and exposed to intense light or high temperature [48,49].

As expected, when the stress conditions were intensified, the modification/degradation of the mAbs increased (Area loss between 29% and 60%). The degradation patterns detected by RP chromatography were again similar for the three mAbs, and they had almost exactly the same chromatographic shape. When medicine samples were subjected to basic stress the chromatographic peaks of the mAbs were deformed in similar ways, and a new peak at shorter retention times (1.7 min) appeared only when the samples were subjected to oxidation, as explained above (see Fig. 3). Although the spectral peak purity factor remained at the same levels as for the fresh sample in most of the stress conditions (99.5%), we can assume that modifications have taken place in the mAbs because of the important decrease in the area under the peak. One explanation could be that the modifications affect all the isoforms of the mAb in the same way. Possible modifications include the well-documented deamidation of Asn and Gln residues by direct hydrolysis catalyzed at pH of < 4. In neutral to basic solutions (pH 6 and above) the reaction changes to an intramolecular cyclization reaction, more so in the case of Asn than Gln.

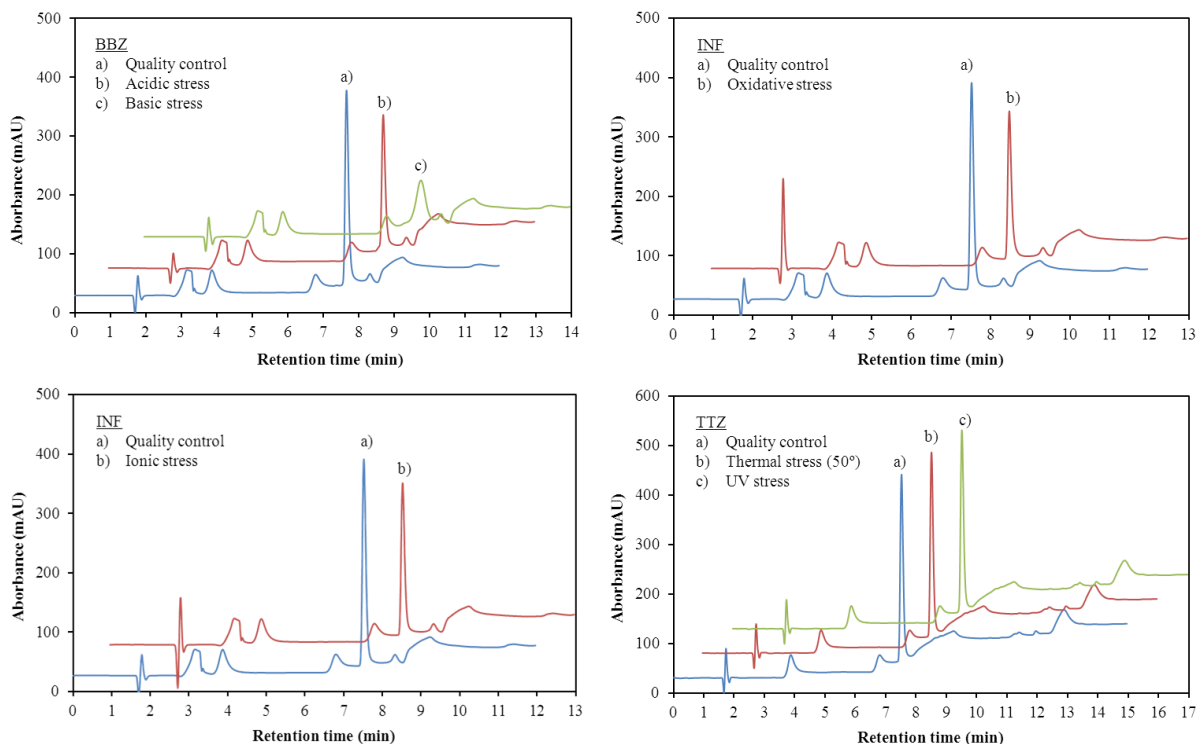


Fig. 3. Stress study of medicine samples solutions of 2000 mg/L of BVZ, INF and TTZ. Strong stress conditions.

The deamination of Asn is more marked, because a ring of five members (known as succinimide or Asu) is formed in the mechanism, which is more stable than the ring of six members formed during Gln deamination [50]. Nevertheless, although these (or other) modifications occurred, they were not detected individually by shifts in the retention times, by new chromatographic peaks or changes in the shape of the UV absorption spectra when samples submitted to acidic/basic conditions. Even when samples were submitted to high ionic strength (a stress condition studied because the medicine samples are diluted in NaCl 0.9% for clinical administration) the area under the chromatographic peak of each mAb decreased by around 33%, while the spectral peak purity factor remained at 99.5%, with UV absorption spectra unchanged with respect to the fresh control sample analyzed simultaneously.

Exposure to light was also considered in the stress study because therapeutic proteins are exposed to light in various situations, including administration of the drug to the patient [50]. In the chromatograms no new or deformed chromatographic peaks

appeared (Fig. 3). Although < 4% of the area was lost, the spectral peak purity was slightly affected for BVZ and INF, in which the similarity factor dropped to 99.3% and 98.8% respectively. Light-induced oxidation of three aromatic amino acids –Trp, Tyr and Phe– is described in the bibliography as usual for light-induced stress of protein [51]. Discoloration due to Trp oxidation has also been described in high concentration formulation, particularly for IgG [52]. However, the colour of the three medicine solutions remained unchanged after UV light stress.

Therefore, modifications in the mAbs could be detected in the forced degradation study of the three mAbs by means of the decrease of the area under the chromatographic peak, and/or the spectral peak purity analysis, and/or the presence of new chromatographic peaks at different retention times. Nevertheless, except in the case of detecting new chromatographic peaks at shorter retention times (around 1.5 min for the oxidative stress, Fig. 3), it was impossible to achieve a complete chromatographic separation of the degraded/modified mAbs. Despite the efforts made throughout the stress study to chromatographically separate different forms mainly by modifying the polarity of the mobile phase, we obtained single chromatographic peaks and at similar retention time as those of the standards. Hence it could be inferred from these results that the differences in polarity between the possible degraded/ modified forms are not sufficient to enable them to be eluted separately, as occurred in our previous research on RTX. Thus, bearing in mind the specificity of the proposed (RP)HPLC/DAD method for the mAbs we analyzed, the results indicated that the degraded/modified mAbs could not be chromatographically separated, and that the different forms that eluted must have overlaid each other at a similar retention time. In consequence, the method is not suitable for quantifying the loss of the intact mAbs if the spectral peak purity analysis is not accepted, but it can be used for estimation purposes. The methods can therefore be considered stability-indicating as modification in the structure can be detected. As already occurred with RTX, this is the only aspect of the ICH guidelines that is not completely fulfilled by the proposed methods, although it is partially fulfilled. It is clear that other techniques will be needed to address the particular structural changes in the mAbs and that this methodology is a preliminary indicator that something has changed.

3.2.5 Robustness

As indicated in the ICH guidelines [12], the robustness of the methods for the analysis of each mAbs was also evaluated. Again, the chromatographic behavior of the three mAbs was similar as can be seen from the results presented in Fig. 4. This Figure illustrates the chromatograms recorded for each mAb when the experimental variables were changed slightly and it highlights the similarity between the chromatograms for the three mAbs, all of which were affected in exactly the same way by the different changes in the variables. The results of this study are also summarized in Table 3.

Table 3. Results of the methods robustness.

mAb	Gradient (%) B phase	T (°C)	Flow (ml/min)	t _R ^(a) (min)	S ^(b)	N ^(c)	k' ^(d)
BVZ	30-60	70	1	7.5	0.68	32507	3.3
	30-60	70	0.9	8.1	0.81	30841	3.1
	30-60	70	1.1	7.4	0.77	27637	3.6
	25-55	70	1	9.0	0.80	31009	3.9
	35-65	70	1	7.0	0.82	30517	3.0
INF	30-60	70	1	7.6	0.63	31332	3.4
	30-60	65	1	7.8	0.61	24245	3.4
	30-60	70	0.9	8.0	0.61	27419	3.1
	30-60	70	1.1	7.4	0.64	24960	3.6
	25-55	70	1	8.6	0.62	30609	3.9
	35-65	70	1	7.0	0.53	29185	3.0
TTZ	30-60	70	1	7.5	0.70	33805	3.3
	30-60	65	1	7.5	0.67	27737	3.3
	30-60	70	0.9	7.8	0.68	23913	3.0
	30-60	70	1.1	7.2	0.70	24594	3.6
	25-55	70	1	8.4	0.69	30091	3.8
	35-65	70	1	7.0	0.71	31426	3.0

(a) Retention time
 (b) Symmetry factor
 (c) Theoretical plates
 (d) Capacity factor

The composition of the mobile phase was the most critical parameter affecting robustness. Similarly, to the RTX study [39], an increase in the polarity of the mobile phase caused the mAb peak to overlay the peak at 6.8 min from the base line, yielding the highest values of the theoretical plates for a composition of 35% of phase A (see Table 2). Considering the column temperature, the method is robust at temperatures of over 65 °C, and below 60 °C it causes important deformations in the chromatographic mAb peaks preventing their analysis.

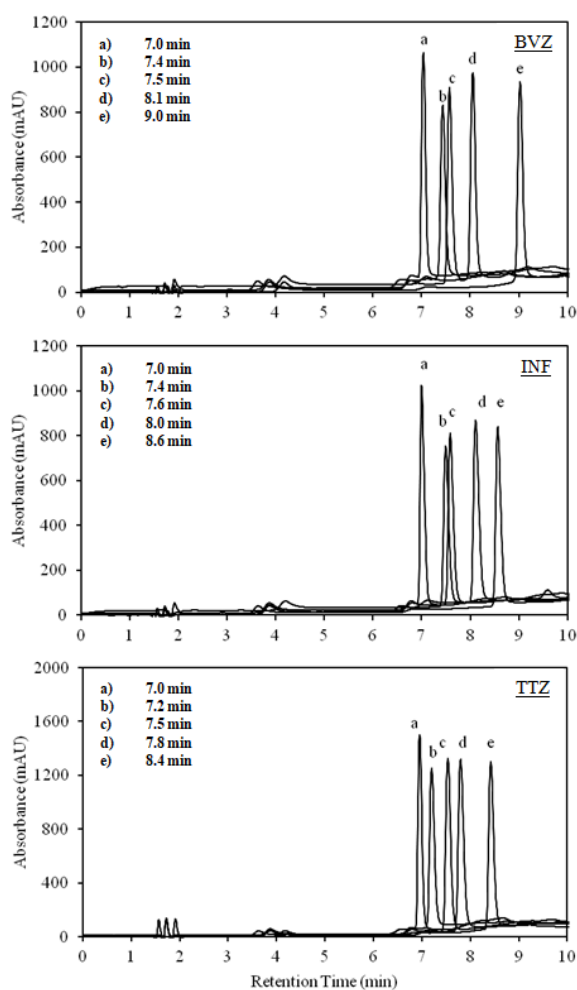


Fig. 4. Robustness study: (a) chromatographic optimized conditions with gradient 35–65% B; (b) chromatographic optimized conditions with a flow of 1.1 mL/min; (c) chromatographic optimized conditions; (d) chromatographic optimized conditions flow of 0.9 mL/min and (e) chromatographic optimized conditions gradient 25–55% B.

3.2.6 System suitability

System suitability testing was conducted using the mAbs standard samples at the targeted concentrations, i.e., 1.0, 2.5 and 5.0 mg/mL. Table 4 summarizes the results of this study. The suitability of the analytical system (instrument + method + operator) was demonstrated because the chromatographic parameters agreed with previously established values (see Experimental section). In addition, the reproducibility of the injection volume (RSD = 0.05%, for 1 μ L) tested for the three mAbs was less than that established in the criteria (RSD \leq 1%).

Table 4. System suitability study.

mAb	Sample concentration (mg/mL)	t_R ^(a) (min)	S ^(b)	N ^(c)	K' ^(d)
BVZ	1	7.5	0.66	23306	3.38
	2.5	7.5	0.65	26837	3.39
	5	7.5	0.69	30502	3.39
INF	1	7.6	0.61	21846	3.42
	2.5	7.6	0.64	27006	3.42
	5	7.6	0.62	32036	3.43
TTZ	1	7.5	0.73	22105	3.36
	2.5	7.5	0.70	26694	3.35
	5	7.5	0.72	31805	3.35

- (a) Retention time
 (b) Symmetry factor
 (c) Theoretical plates
 (d) Capacity factor

3.3 Long-term quantification study of BVZ, INF and TTZ in hospital conditions of use

The proposed method was used to quantify BVZ, INF and TTZ samples prepared under hospital conditions in a long-term stability study. The study was therefore conducted at three concentrations, i.e. 0.5 mg/mL, 2 mg/mL, and 10 mg/mL for BVZ and INF, and 0.5 mg/mL and 2.5 mg/mL for TTZ; these concentrations cover the range of the clinical use when administered in hospital. Indicated here that this study was

performed in the context of a wider project that seeks to implement and validate analytical methods and protocols to characterize mAbs, with an additional objective of extending, when possible, the shelf lives of the surplus of these expensive biotechnological medicines prepared in hospital pharmacy departments.

Fig. 5 shows the evolution of the BVZ (3A), INF (3B) and TTZ (3C) concentrations along the time checked for samples stored refrigerated at 4 °C. The RSD (%) of the concentration estimated for each checked time was lesser than 2%. Tables 5 (BVZ), 6 (INF), and 7 (TTZ) summarizes the criteria applied to detect the modification/degradation of the three mAbs during this study. The results of the peak purity spectra (not included in Table 5) were in all the cases similar to the values of the controls (those obtained at day 0 for INF, BVZ and TTZ). Therefore, these results show that the mAbs concentrations in the diluted samples at the targeted concentrations did not change significantly during the first month. Regarding only concentration, the results indicated great stability of the three mAbs stored in dark vials refrigerated at 4 °C, that is, the results were all $\pm 4\%$ of the initial concentrations of each mAb: $\pm 3.9\%$ in case of BVZ, $\pm 2.3\%$ in case of INF and $\pm 0.2\%$ in case of TTZ. These results contrast to those obtained for example for RTX in which changes were detected after about a week of the storage in similar conditions [38].

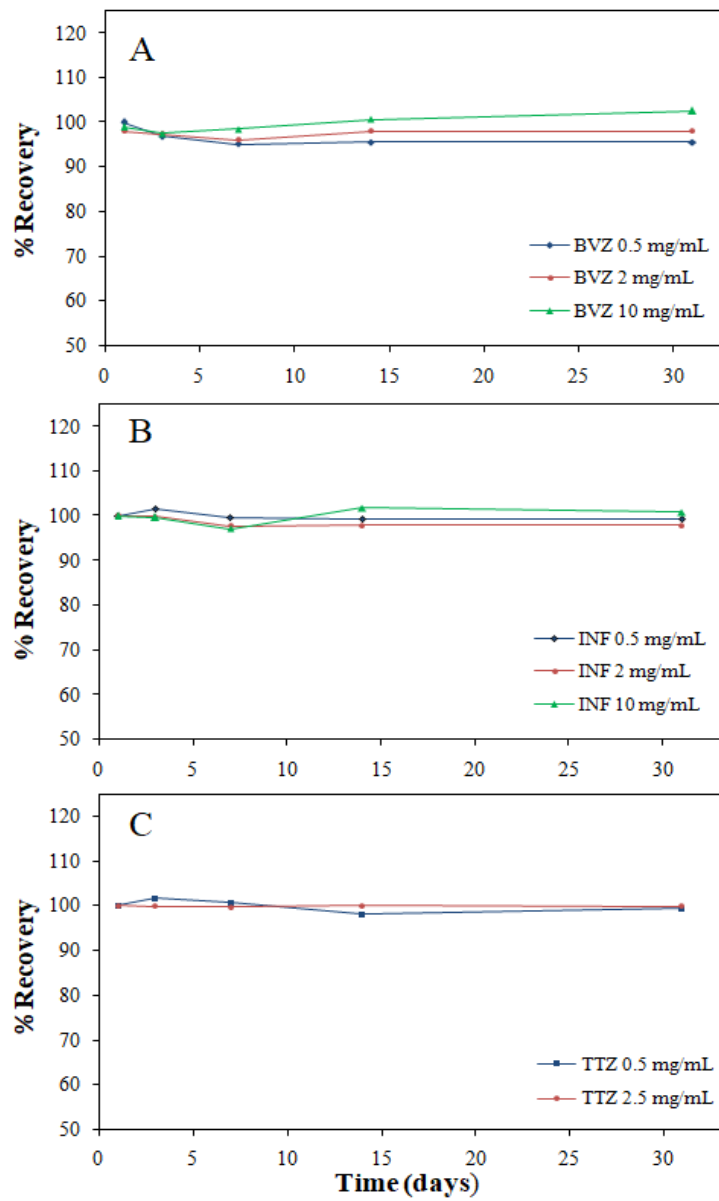


Fig. 5. Long-term study: BVZ (A), INF (B) and TTZ (C) solutions in 0.9% NaCl.

Table 5. BVZ stability study: results of the criteria to detect modifications.

mAb	Conc. (mg/mL)	Day	Degradation peaks	Intensity Lost (%)	Peak Deformation
Bevacizumab (BVZ)	0.5 mg/mL	0	No	-	No
		1	No	0.00	No
		3	No	3.09	No
		7	No	4.89	No
		14	No	4.38	No
		31	No	4.47	No
	2.0 mg/mL	0	No	-	No
		1	No	1.92	No
		3	No	2.66	No
		7	No	3.87	No
		14	No	2.04	No
		31	No	1.91	No
	10.0 mg/mL	0	No	-	No
		1	No	1.07	No
		3	No	2.51	No
		7	No	1.54	No
		14	No	-0.70	No
		31	No	-2.57	No

Table 6. INF stability study: results of the criteria to detect modifications.

mAb	Conc. (mg/mL)	Day	Degradation peaks	Intensity Lost (%)	Peak Deformation
Infliximab (INF)	0.5 mg/mL	0	No	-	No
		1	No	0.00	No
		3	No	-1.52	No
		7	No	0.38	No
		14	No	0.75	No
		31	No	0.81	No
	2.0 mg/mL	0	No	-	No
		1	No	0.00	No
		3	No	0.08	No
		7	No	2.33	No
		14	No	2.15	No
		31	No	2.05	No
	10.0 mg/mL	0	No	-	No
		1	No	0.00	No
		3	No	0.30	No
		7	No	2.85	No
		14	No	-1.79	No
		31	No	-0.91	No

Table 7. TTZ stability study: results of the criteria to detect modifications.

mAb	Conc. (mg/mL)	Day	Degradation peaks	Intensity Lost (%)	Peak Deformation
Trastuzumab (TTZ)	0.5 mg/mL	0	No	-	No
		1	No	0.00	No
		3	No	-1.70	No
		7	No	0.64	No
		14	No	1.98	No
		31	No	0.58	No
	2.0 mg/mL	0	No	-	No
		1	No	0.00	No
		3	No	0.07	No
		7	No	0.22	No
		14	No	0.04	No
		31	No	0.10	No

4. Conclusions

Reliable and accurate quantification of intact marketed monoclonal antibodies BVZ, INF and TTZ by (RP)HPLC/DAD was demonstrated in this research despite their inherent complexity (glycoproteins of high molecular weight). The results of the method performance and validation for the three mAbs showed similar or identical chromatographic behavior, such that they were indistinguishable from many of the analytical results. This is an interesting result of this investigation, i.e., the evidence that despite their chemical differences the marketed mAbs show similar RP chromatographic behavior and also similar to others mAbs previously study (RTX and CTX).

As drug substances, the method was validated as stability-indicating for the quantification of each intact mAb in accordance with the ICH guidelines for biotechnological products. Although slight modifications in the intact mAbs could not be chromatographically separated in the stress study we conducted, the modifications

could be detected by applying the proposed spectral peak purity analysis strategy. The method was therefore validated for quantification purposes since it was qualified to detect degradation/modification of the mAbs. This means that the method can be used for quantification purposes of BVZ, INF and TTZ in the quality control process when manufacturing the mAbs in addition to long-term stability studies.

The particular long-term stability study tracking BVZ, INF and TTZ concentrations in clinical solution that covers the range of the clinical use when administered in hospital indicated great stability in the three mAbs, in contrast with results previously obtained for RTX and CTX, two other similar IgG1. Neither degradations nor modifications were detected in any of the three mAbs in the month of study.

Conflict of interest

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

Acknowledgments

This project was entirely funded by Project FIS:PI10/00201 (Instituto Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Spain); therefore this project has also been partially supported by European Regional Development Funds (ERDF). The authors would like to thank the Hospital Pharmacy Unit of the University Hospital of “San Cecilio” 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.

References

- [1] J.R. Birch, Y. Onakunle, Biopharmaceutical proteins, in: C.M. Smales, D.C. James (Eds.), *Therapeutic Proteins. Methods in Molecular Biology*, 308, Humana Press, New Jersey 2005, pp. 1–16.
- [2] W.R. Strohl, Therapeutic monoclonal antibodies: past, present, and future, in: A. Zhiqiang (Ed.), *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic*, John Wiley Sons Inc., New Jersey 2009, pp. 3–50.
- [3] D.S. Dimitrov, Therapeutic proteins, in: V. Voynov, J.A. Caravella (Eds.), *Therapeutic proteins: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 899, Springer Science+Business Media, New York 2012, pp. 1–26.
- [4] D.M. Ecker, S.D. Jones, H.L. Levine, The therapeutic monoclonal antibody market, *MAbs* 7 (2015) 9–14.

- [5] D. Voet, J. Voet, *Biochemistry*, *Biochem. Educ.* 18 (1990) 212.
- [6] J.M. Reichert, C.J. Rosensweig, L.B. Faden, M.C. Dewitz, Monoclonal antibody successes in the clinic, *Nat. Biotechnol.* 23 (2005) 1073–1078.
- [7] Scientific Discussion Bevacizumab. , EMEA, 2005 http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000582/WC500029262.pdf (Accessed 7 December 2017).
- [8] Scientific Discussion Infliximab. , EMEA, 2005 http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000240/WC500050885.pdf (Accessed 7 December 2017).
- [9] Scientific Discussion Trastuzumab. , EMEA, 2005 http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000278/WC500049816.pdf (Accessed 7 December 2017).
- [10] International Conference on Harmonization (ICH) Guidelines: Quality Guidelines, <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines> (Accessed 7 December 2017).
- [11] International Conference on Harmonization (ICH) Guidelines ICH Q6B, Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/biological Products, March 1999.
- [12] International Conference on Harmonization (ICH) Guidelines ICH Q2(R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, November 2005.
- [13] A. Mujtabaa, K. Kohlib, Validated HPLC method for the pharmacokinetic study of oral extended-release cefpodoxime proxetil chitosan–alginate beads in rabbits, *Int. J. Biol. Macromol.* 98 (2017) 111–116.
- [14] T. Lakshmipriyaa, S.C.B. Gopinatha, U. Hashima, V. Murugaiyah, Multi-analyte validation in heterogeneous solution by ELISA, *Int. J. Biol. Macromol.* 105 (2017) 796–800.
- [15] A. Staub, D. Guillarme, J. Schappler, J.L. Veuthey, S. Rudaz, Intact protein analysis in the biopharmaceutical field, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55 (2011) 810–822.
- [16] S. Grotefend, L. Kaminski, S. Wroblewitz, S. El Deeb, N. Kühn, S. Reichl, M. Limberger, S. Watt, H. Wätzig, Protein quantitation using various modes of high performance liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 71 (2012) 127–138.
- [17] T.M. Dillon, D.V. Bondarenko, M.S. Ricci, Development of an analytical reversedphase high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry method for characterization of recombinant antibodies, *J. Chromatogr. A* 1053 (2004) 299–305.
- [18] T.M. Dillon, P.V. Bondarenko, D.S. Rehder, G.D. Pipes, G.R. Kleemann, M.S. Ricci, Optimization of a reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass

- spectrometry method for characterizing recombinant antibody heterogeneity and stability, *J. Chromatogr. A* 1120 (2006) 112–120.
- [19] T. Kupfer, B. Peters, E. Machtejevas, G. Jung, P. Knoell, Faster Analysis of Monoclonal Antibodies Using Silica Monoliths Designed for Bioanalysis, *Chromatography today* February/March 2017 14–17.
- [20] G. Guiochon, Monolithic columns in high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1168 (2007) 101–168.
- [21] M. Printz, W. Friess, Simultaneous detection and analysis of protein aggregation and protein unfolding by size exclusion chromatography with post column addition of the fluorescent dye BisANS, *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 826–837.
- [22] J. Hernández-Jiménez, A. Salmerón-García, J. Cabeza, C. Vélez, L.F. Capitán-Vallvey, N. Navas, The effects of light-accelerated degradation on the aggregation of marketed therapeutic monoclonal antibodies evaluated by size-exclusion chromatography with diode array detection, *J. Pharm. Sci.* 105 (2016) 1405–1418.
- [23] A. Cusumano, D. Guillaume, A. Beck, S. Fekete, Practical method development for the separation of monoclonal antibodies and antibody-drug-conjugate species in hydrophobic interaction chromatography, part 2: optimization of the phase system, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 121 (2016) 161–173.
- [24] J.C. Rea, G.T. Moreno, Y. Lou, D. Farnan, Validation of a pH gradient-based ion-exchange chromatography method for high-resolution monoclonal antibody charge variant separations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (2010) 317–323.
- [25] L. Maple, R. Lathrop, S. Bozich, W. Harman, R. Tacey, M. Kelley, A. DanilkovitchMiagkova, Development and validation of ELISA for herceptin detection in human serum, *J. Immunol. Methods* 295 (2004) 169–182.
- [26] H.J. Stemmler, M. Schmitt, A. Willems, H. Bernhard, N. Harbeck, V. Heinemann, Ratio of trastuzumab levels in serum and cerebrospinal fluid is altered in HER2-positive breast cancer patients with brain metastases and impairment of blood-brain barrier, *Anti-Cancer Drugs* 18 (2007) 23–28.
- [27] H. Maity, A. Weia, E. Chena, J.N. Haidar, A. Srivastava, J. Goldstein, Comparison of predicted extinction coefficients of monoclonal antibodies with experimental values as measured by the Edelhoch method, *Int. J. Biol. Macromol.* 77 (2015) 260–265.
- [28] A. Beck, E. Waagner-Rousset, D. Ayoub, A. Van Dorsselaer, S. Sanglier-Cianferani, Characterization of therapeutic antibodies and related products, *Anal. Chem.* 85 (2013) 715–736.
- [29] S. Rosati, N.J. Thompson, A.J.R. Heck, Tackling the increasing complexity of therapeutic monoclonal antibodies with mass spectrometry, *Trends Anal. Chem.* 48 (2013) 72–80.

- [30] E. Sousa, S. Olland, H.H. Shih, K. Marquette, R. Martone, Z. Lu, J. Paulsen, D. Gill, T. He, Primary sequence determination of a monoclonal antibody against alpha-synuclein using a novel mass spectrometry-based approach, *Int. J. Mass Spectrom.* 312 (2012) 61–69.
- [31] F. Lanucara, C.E. Eyers, Top-down mass spectrometry for the analysis of combinatorial post-translational modifications, *Mass Spectrom. Rev.* 32 (2013) 27–42.
- [32] M. Tsubaki, I. Terashima, K. Kamata, A. Koga, C-terminal modification of monoclonal antibody drugs: amidated species as a general product-related substance, *Int. J. Biol. Macromol.* 52 (2013) 139–147.
- [33] D. Chelius, D.S. Rehder, P.V. Bondarenko, Identification and characterization of deamidation sites in the conserved regions of human immunoglobulin gamma antibodies, *Anal. Chem.* 77 (2005) 6004–6011.
- [34] J. Yang, S. Wang, J. Liu, A. Raghani, Determination of tryptophan oxidation of monoclonal antibody by reversed phase high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1156 (2007) (174–172).
- [35] D. Ayoub, W. Jabs, A. Resemann, W. Evers, C. Evans, L. Main, C. Baessmann, E. Wagner-Rousset, D. Suckau, A. Beck, Correct primary structure assessment and extensive glyco-profiling of cetuximab by a combination of intact, middle-up, middledown and bottom-up ESI and MALDI mass spectrometry techniques, *MAbs* 5 (2013) 699–710.
- [36] Y. Tsybin, L. Fornelli, C. Stoermer, M. Luebeck, J. Parra, O.S. Nallet, F.M. Wurm, R. Hartmer, Structural analysis of intact monoclonal antibodies by electron transfer dissociation mass spectrometry, *Anal. Chem.* 83 (2011) 8919–8927.
- [37] L. Fornelli, E. Damoc, P.M. Thomas, N.L. Kelleher, K. Aizikov, E. Denisov, A. Makarov, Y. Tsybin, Analysis of intact monoclonal antibody IgG1 by electron transfer dissociation Orbitrap FTMS, *Mol. Cell. Proteomics* 11 (2012) 1758–1767.
- [38] N. Navas, A. Herrera, A. Martínez-Ortega, A. Salmerón-García, J. Cabeza, L. CuadrosRodríguez, Quantification of an intact monoclonal antibody, rituximab, by (RP) HPLC/DAD in compliance with ICH guidelines, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 9351–9363.
- [39] A. Martínez-Ortega, A. Herrera, A. Salmerón-García, J. Cabeza, L. Cuadros-Rodríguez, N. Navas, Study and ICH validation of a reverse-phase liquid chromatographic method for the quantification of the intact monoclonal antibody cetuximab, *J. Pharm. Anal.* 6 (2016) 117–124.
- [40] Analytical Methods Committee, Is my calibration linear? *Analyst* 9 (1994) 2363–2366. [41] Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods (FDA), <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM134409.pdf> (Accessed 7 December 2017).

- [42] Peak Purity Analysis in HPLC and CE Using Diode-array Technology (Agilent Technologies), [https://pdfs.semanticscholar.org/63ec/9fdd2167cb2d545cd1f4c56db3c3d1df1057 .pdf](https://pdfs.semanticscholar.org/63ec/9fdd2167cb2d545cd1f4c56db3c3d1df1057.pdf) (Accessed 7 December 2017).
- [43] ICH Q1B Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002647.pdf (Accessed 7 December 2017).
- [44] L. Cuadros-Rodríguez, M.G. Bagur-González, M. Sánchez-Viñas, A. González-Casado, A.M. Gomez-Saez, Principles of analytical calibration/quantification for the separation sciences, *J. Chromatogr. A* 1158 (2007) 33–46.
- [45] A. Hawe, M. Wiggenhorn, M. Van de Weert, J.H. Garbe, H.C. Mahler, W. Jiskoot, Forced degradation of therapeutic proteins, *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 895–913.
- [46] B.M. Teska, C. Li, B.C. Winn, K.K. Arthur, Y. Jiang, J.P. Gabrielson, Comparison of quantitative spectral similarity analysis methods for protein higher-order structure confirmation, *Anal. Biochem.* 434 (2013) 153–165.
- [47] H. Liu, G. Gaza-Bulsecó, D. Faldu, C. Chumsae, J. Sun, Heterogeneity of monoclonal antibodies, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 2426–2447.
- [48] J.F. Shen, Y.M. Kwong, G.R. Keck, J.R. Harris, The application of tertbutylhydroperoxide oxidation to study sites of potential methionine oxidation in a recombinant antibody, *Tech. Protein. Chem.* 7 (1996) 275–284.
- [49] X.M. Lam, J.Y. Yang, J.L. Cleland, Antioxidants for prevention of methionine oxidation in recombinant monoclonal antibody HER2, *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 1250–1255.
- [50] B.A. Kerwin, R.L. Remmele Jr., Protect from light: photodegradation and protein biologics, *J. Pharm. Sci.* 96 (2007) 1468–1479.
- [51] M.C. Manning, D.K. Chou, B.M. Murphy, R.W. Payne, D.S. Katayama, Stability of protein pharmaceuticals: an update, *Pharm. Res.* 27 (2010) 544–575.
- [52] P. Qi, D.B. Volkin, H. Zhao, M.L. Nedved, R. Hughes, R. Bass, S.C. Yi, M.E. Panek, D. Wang, P. Dalmonte, M.D. Bond, Characterization of the photodegradation of a human IgG1 monoclonal antibody formulated as a high-concentration liquid dosage form, *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 3117–3130.

3.3. Conclusiones

La investigación realizada en este segundo trabajo viene a demostrar nuevamente la idoneidad de la técnica cromatográfica de fase inversa acoplada a un detector UV-visible de diodos en fila para la cuantificación rigurosa de los anticuerpos monoclonales terapéuticos (contenido proteico), aquí demostrada para BVZ, INF y TTZ, a pesar de la complejidad inherente de este tipo de glicoproteínas de alto peso molecular.

En este trabajo queda de manifiesto que los tres mAbs analizados mostraron un comportamiento cromatográfico similar, con perfiles casi indistinguibles entre ellos e incluso semejantes a los perfiles obtenidos para los mAbs RTX y CTX en trabajos anteriores (Anexo. Publicación Científica preliminar a la Tesis y Capítulo 2, respectivamente).

El método se validó satisfactoriamente como indicador de estabilidad para la cuantificación de cada mAb intacto de acuerdo con las directrices de ICH Q2(R1) cumpliendo de manera satisfactoria todos los criterios establecidos a excepción de los criterios relacionados con la separación cromatográfica de los mAbs intactos y sus respectivas formas degradadas, durante los estudios de degradación forzada llevados a cabo. A pesar de la falta de separación cromatográfica, fue posible la detección de estas modificaciones/ degradaciones mediante el análisis de pureza espectral y cromatográfico de los picos, lo que permitió cualificar el método como indicador de la estabilidad.

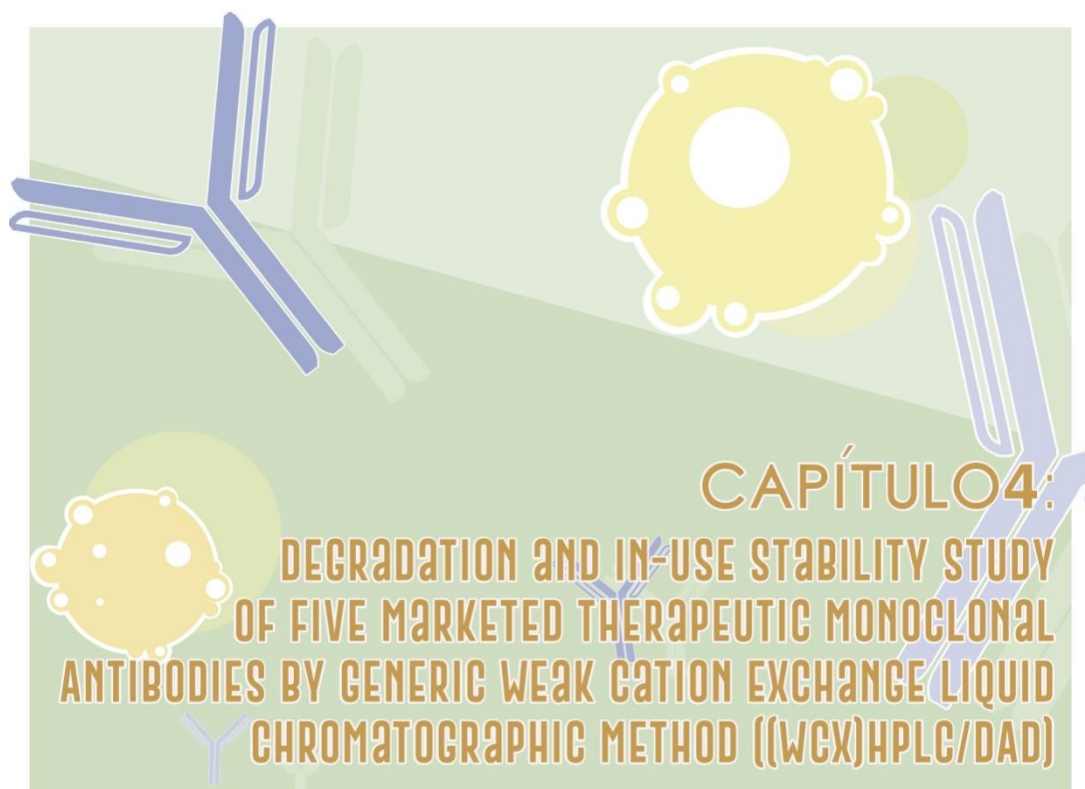
Dados los resultados obtenidos tras la realización de los estudios de degradación controlada, el método propuesto fue validado como indicador de la estabilidad para la cuantificación del contenido proteico de los mAbs BVZ, INF y BBV en sus respectivos medicamentos y preparaciones farmacéuticas. Además, estos datos permiten conocer más a fondo las posibles pautas de degradación de los tres mAbs frente a posibles condiciones ambientales adversas que puedan sufrir en cualquier etapa de su vida, desde la etapa de fabricación hasta su dosificación y administración al paciente, y que puedan impactar en su estabilidad y, en

consecuencia, en la seguridad y eficacia de los mismos. Los resultados de este estudio mostraron un comportamiento similar para los tres mAbs estudiados e incluso similares a los obtenidos para los mAbs RTX y CTX estudiados en trabajos previos, a excepción del estrés por temperatura (50°C), ya que se BVZ mostró un patrón de degradación diferente.

Por ello, el método se considera validado como indicador de la estabilidad para fines de cuantificación proteica de los mAbs intactos BVZ, INF y TTZ, ya que demostró estar cualificado para la detección de degradaciones/ modificaciones en los mAbs estudiados, cumpliendo con los criterios de análisis cromatográfico y pureza espectral propuestos

Así mismo, este método fue aplicado en un estudio de estabilidad en el tiempo (un mes), donde se evaluaron las preparaciones farmacéuticas de uso clínico de los mAbs BVZ, INF y TTZ a diferentes concentraciones, cubriendo el intervalo de uso clínico (0.5 mg/mL, 2.0 mg/mL y 10 mg/mL para BVZ; 0.5 mg/mL, 2.0 mg/mL y 10 mg/mL para INF; y 0.5 mg/mL and 2.5 para TTZ). Éstas fueron preparadas a partir de sus medicamentos innovadores (Avastin®, Remicade® y Herceptin®, respectivamente) en suero salino (NaCl 0.9%) y almacenados a 4°C y protegidos de la luz. Los resultados de este estudio mostraron una gran estabilidad en los tres mAbs durante un mes, ya que no se observaron cambios en los contenidos proteicos con respecto a las concentraciones iniciales ni se detectaron degradaciones ni modificaciones en ninguno de los tres mAbs en este tiempo







4.1. Introducción al capítulo 4

En este tercer trabajo se ha desarrollado y validado un método cromatográfico basado en la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia por intercambio catiónico débil con detección UV-visible mediante DAD ((WCX)HPLC/DAD) para la caracterización del perfil cromatográfico de variantes de carga de 5 mAbs terapéuticos intactos, BVZ, CTX, INF, RTX y TTZ, empleando sus correspondientes medicamentos innovadores Avastin®, Erbitux®, Remicade®, MabThera® y Herceptin®, respectivamente. El método cromatográfico fue desarrollado y optimizado con el objetivo de ser un único método, sin la necesidad de aplicar ajustes específicos de las condiciones cromatográficas para el análisis individual de los cinco mAbs estudiados, lo que supone una cualidad de gran importancia para su aplicación en laboratorios de control de calidad, donde se requieren metodologías rápidas y robustas.

Tras las diferentes estrategias cromatográficas llevadas a cabo durante la optimización del método, el seleccionado para la determinación de los perfiles de carga de los 5 mAbs intactos se basó en la aplicación simultánea de gradiente de pH y gradiente iónico en la fase móvil. A pesar de que los cinco mAbs son IgG1 y que, por lo tanto, poseen una estructura y tamaño similar, cada uno de ellos mostró un comportamiento cromatográfico diferente, con perfiles cromatográficos de variantes de carga característicos y diferenciadores de cada uno de ellos. Esta característica permite la identificación de cada mAb sólo con la evaluación de estos perfiles cromatográficos.

Posteriormente, se procedió a la validación del método seleccionado como indicador de la estabilidad para la detección de modificaciones en los perfiles cromatográficos de las variantes de carga de los cinco mAbs estudiados. A pesar de que las variantes de carga son un CQA, no tienen una guía ICH específica para validación de los métodos correspondientes, más allá de la indicación de ser capaces de detectar de alguna manera los productos de degradación del medicamento, por lo que para validación como indicador de la estabilidad del método se siguieron las pautas descritas en la guía ICH Q2(R1) con respecto a la

especificidad. Para ello, se pusieron en marcha diversos estudios de degradación controlada en los mAbs propuestos, con el fin de demostrar la capacidad del método para detectar cambios en los perfiles cromatográficos de las variantes de carga de los mAbs debido a modificaciones/degradaciones tras someterlos a condiciones de estrés seleccionadas.

Una vez validado el método para detectar modificaciones en los perfiles cromatográficos de carga, se iniciaron los estudios de estabilidad en el tiempo (dos meses) para el análisis de las variantes de carga de disoluciones farmacéuticas de uso clínico de los cinco mAbs, preparadas a partir de sus medicamentos innovadores a una concentración de 2.0 mg/mL NaCl 0.9 % (suero salino) y almacenadas a las condiciones recomendadas por sus respectivos fabricantes (4°C protegidas de la luz). Éstas fueron analizadas en los días 0 (inicio del estudio y empleado como control), 1, 4, 7, 14, 21, 30, 45 y 60 tras su preparación. Otras alícuotas fueron almacenadas a -20°C para evaluar el impacto en el perfil de carga de los ciclos de congelación-descongelación y fueron analizadas los días 7 (solo BVZ y CTX), 30, 45 y 60 del estudio. Todos estos resultados se exponen y comentan en este Capítulo 4.

4.2. Publicación editada.

**Degradation and in-use stability study of five marketed
therapeutic monoclonal antibodies by generic weak
cation exchange liquid chromatographic method
((WCX)HPLC/DAD)**

Antonio Martínez-Ortega ^a, Agustín Herrera ^a, Antonio Salmerón-García ^{bc},
JoséCabeza ^{bc}, Raquel Perez-Robles ^{abd}, Natalia Navas ^{ab*}

^a Department of Analytical Chemistry, Science Faculty, University of Granada, Granada,
Spain

^b Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (ibs.GRANADA), Granada, Spain.

^c Department of Clinical Pharmacy, San Cecilio University Hospital, Granada, Spain.

^d Fundación para la Investigación Biosanitaria de Andalucía Oriental-Alejandro Otero,
Granada, Spain.

Enviado a revista incluida en el JCR el 17 de diciembre de 2021.



Abstract

Therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) represent a very important class of the current biopharmaceutics. The great complexity of their structure made necessary the use of different analytical approaches for assessing different physico-chemical properties. In this work, weak cation exchange (WCX) high performance liquid chromatography with diode array detection ((WCX)HPLC/DAD) is used to assess the charge variant profile. The method here developed combined the effect of ionic strength and controlled pH gradient and allows for the charge variants analysis of the five mAbs studied, namely bevacizumab (BVZ), cetuximab (CTX) infliximab (INF), rituximab (RTX) and trastuzumab (TTZ), which are among the most used mAbs worldwide. The differences in the charge variants in the natural isoforms of the mAbs promoted characteristic WCX chromatograms for each of mAbs that can be also useful for identification purposes. These chromatograms have provided to be suitable for tracking changes in the charge variants of each mAb analyzed both in controlled degraded and in long-term stabilities study of in-use samples solutions at 2 mg/mL in 0.9 % NaCl stored refrigerated (at 4 °C) and frozen (-20 °C) for two months. The results obtained indicated different stabilities of these mAbs, all IgG1, against degradation by different stressed environmental conditions and in-use long term stability.

Keywords: (WCX)HPLC/DAD; Monoclonal Antibodies; Charge variants analysis; in-use mAbs stability.

1. Introduction

Monoclonal antibodies are currently one of the most important class of biotechnological drugs, leading the global pharmaceutical market nowadays. These kinds of glycoproteins, characterized by their specificity and affinity in the recognition of targets and their relatively long half-lives [1], have become the spearhead of new therapies for the treatment of diseases with an increasing incidence in the population such as cancer, autoimmune, inflammatory, infectious and degenerative diseases, consolidating at the top of the biopharmaceutical market [2-4]. Also, from the start of the pandemic of the COVID-19, mAbs has been explored as potential therapeutic [5].

Currently, it is well-known that of the five classes of antibodies in humans, the subclass 1 (IgG1), is the most commonly used for pharmaceutical and biomedical purposes [6,7].

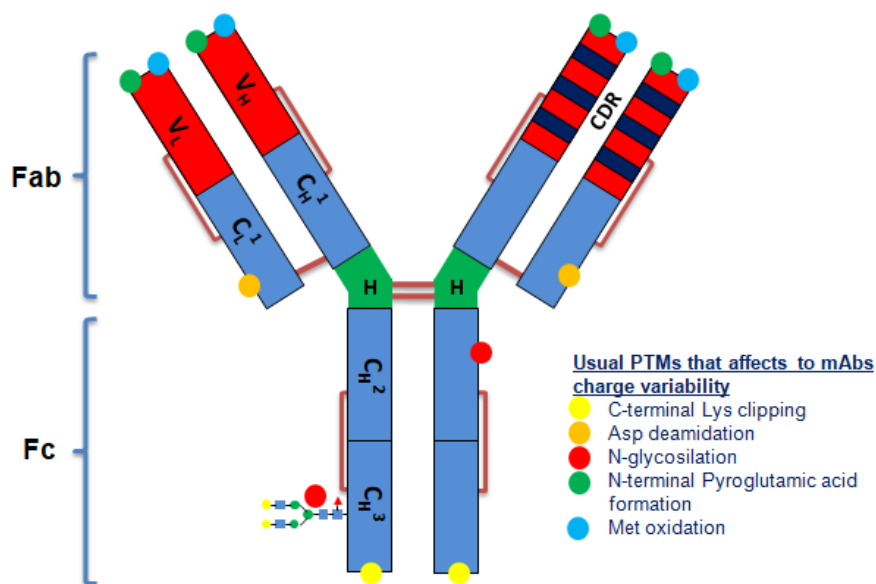


Fig. 1. General structure of IgG1 and the usual PTMs (Post-translational Modifications) that affects to its charge variability.

Example of the IgG1 subclass are the therapeutic marketed mAbs bevacizumab (BVZ), cetuximab (CTX), infliximab (INF), rituximab (RTX) and trastuzumab (TTZ). BVZ (Avastin®) is a humanized antibody indicated mainly for the treatment of various types of cancer, such as metastatic colon carcinoma, metastatic breast cancer, lung cancer, etc. [8]. CTX (Erbix®) is a potent chimeric mouse/human mAb approved for the treatment of colon cancer and other types of squamous cell cancer such as cancer of the mouth or larynx [9]. INF (Remicade®) is a murine-human chimeric antibody indicated for the treatment of many autoimmune diseases such as of Crohn's disease, rheumatoid arthritis, psoriasis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, and ulcerative colitis [10]. RTX (MabThera®) is a murine/human chimeric antibody intended for use in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma [11], rheumatoid polyarthritis [12] and chronic lymphoid leukemia [13]. TTZ (Herceptin®) is a humanized antibody indicated for the treatment of patients with metastatic breast cancer whose tumors over express HER2

(25 % of the patients) [14]. As IgG1, the five mAbs share the same general structure varying mainly in the variable region where the complementary determining region (CDR) is located (Fig. 1) [15]. These 5 mAbs are among the biotechnological drugs most consumed worldwide [16].

MABs characterization is a complex task, due to the characteristic heterogeneity of biotherapeutics. This feature starts at the beginning of the production process originated by both chemical and enzymatic reactions called post-translational modifications (PTMs) that take place not only in upstream and downstream bioprocessing but also in storage and handling procedures before patient administration [17]. Numerous of these PTMs, such as deamidation of asparagine residues, N-glycosylation, C-terminal Lys clipping and N-terminal pyroglutamic formation, are involved in the charge heterogeneity of biotherapeutics by the modification of the charge distribution in the protein surface, altering its isoelectric point (pI) and generating different charge variants [17, 18] in a same sample protein. Therefore, charge heterogeneity is a critical quality attribute (CQA) for therapeutic proteins [18], especially relevant for immunoglobulins subclass IgG1 and derivatives, such as antibody drug conjugates (ADCs) [19] or single-domain antibodies also known as nanobodies [20] and also for Fc-fusion proteins. The charge heterogeneity is a crucial issue related with the quality assessment of the final product, and therefore the ICH guidelines establish that variant profile has to be monitored and characterized [21].

Ion exchange chromatography (IEX) is considered the gold standard technique for the characterization and monitoring of charge heterogeneity in biopharmaceuticals and it is widely used also for the detection of degradation patterns, due to its simplicity and rapid set-up [22,23]. Cation exchange chromatography (CEX) is the most extended form of IEX technique for mAbs and related protein analysis, where differences in the surface charge of the proteins lead to separation based on the interactions between the positive charges on the proteins surface and the negative charges of the column resin [24]. These methods are already well-established for high-resolution monoclonal antibody charge variant separations as demonstrated in the last years [25,26]. The elution is commonly performed basing on the application of a simultaneous controlled pH gradient and an ionic strength gradient both in the mobile phase [25-27]. The charge variant profile generated differentiates the acid forms and basic forms from the main peak. The elution times depend fundamentally on their isoelectric point (pI), lower in acidic forms (earlier elutions) and greater in basic forms (later elutions) with respect to the main peak

[24]. Charge variants have been attributed to PTMs and are directly related to the stability of the protein since they are involved in numerous degradation processes [28]. The use of mobile phases which contains non-volatile high salt concentration restricts the detection by mass spectrometry (MS) due to they are not compatible with the ionization sources [26,29]. Bottom-up approaches are usually carried out for identification purposes, with peptide mapping analysis by LC-MS/MS after IEX peak collection step [18,30]. Despite its high sensitivity, the tryptic digestion procedures together with the reduction of the disulfide bridges and the alkylation prior to the analysis may generate additional degradations [22]. This limitation has led the emergence of alternative strategies for the identification of charge variants, such as the combination of two-dimensional LC methods coupled to mass spectrometry (2D/LC-MS), where in the first step take place the IEX, not compatible with MS, and in the second step the reverse phase chromatography (RP), technique perfectly compatible with MS, allowing the identification by MS of charge variants separated by IEX [31]. However, these techniques are very complex and expensive, which makes them exclusive to a few laboratories specialized in proteomics. For this reason, the development of a simple, fast and unique method for monitoring the charged heterogeneity is required also. More recently, the use of volatile salts for non-denaturing chromatographic techniques, such as IEX, has allowed for coupling the LC eluent to the mass spectrometer detector (IEX-MS) to characterize the mass of the therapeutic proteins [32]. Although the use a MS detector for the characterization of the individual charge variants represents a great advantage, not always the volatile salts allow for obtaining good enough charge variants profiles [26].

In the present work, we developed and validated a generic fast weak cation exchange high performance liquid chromatographic method with diode array detection (WCX)HPLC/DAD to detect changes in the charge heterogeneity -or charge variants- in five of the most used worldwide therapeutic mAbs, i.e. BVZ, CTX, INF, RTX and TTZ. This method was based on the simultaneous application of a controlled pH gradient in the mobile phase and an ionic strength gradient (salt-mediated pH-IEX methods) [25,26,27]. The method was developed as a single method for the analysis of the 5 mAbs studied here, without the need of any specific modification or adjustment in the experimental parameters for the analysis of each individual mAb. Although they share the same IgG1 structure, different charge profiles were exhibited for each mAb allowing the identification of each one. Forced degradation studies were carried out in order to

validate the method as stability-indicating demonstrating its capability to identify degradation by detecting changes in the corresponding charge variants profiles [34]. Furthermore, and once validated the method for detecting modification on the charges profile, a long-term stability study along 2 months was performed on the 5 mAbs under their typical therapeutic condition of use, i.e. clinical concentration and recommended storage temperature when used in hospital [8,9,10,13,14].

2. Material and Methods

2.1 Chemicals and reagents

All reagents were of analytical reagent grade unless otherwise stated. Reverse-osmosis quality water (purified with a Milli-RO plus Milli-Q station from Millipore Corp., Madrid, Spain) was used throughout hydrochloric acid, sodium hydroxide, disodium phosphate, sodium dihydrogen phosphate and sodium chloride were supplied by Panreac (Barcelona, Spain). Hydrogen peroxide was supplied by Technical Fontenay (Sous-Bois, France). An isotonic solution of 0.9 % NaCl was supplied by B. Braun Medical (Madrid, Spain).

2.2 Therapeutic monoclonal antibodies (mAbs)

The monoclonal antibodies BVZ, CTX, INF, RTX and TTZ were purchased as Avastin®, Erbitux® (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), Remicade® (Janssen Biotech, Inc. Horsham, Pennsylvania, USA), MabThera® (Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Germany) and Herceptin® (Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Germany) respectively. Avastin®, MabThera® and Herceptin® respectively (Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Germany). CTX was obtained as Erbitux® (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and INF as Remicade® (Janssen Biotech, Inc. Horsham, Pennsylvania, USA). Units of these medicines were kindly supplied for this study by the Pharmacy Unit of the University Hospital "San Cecilio" (Granada, Spain). The medicines indicated a quantitative composition of 25 mg/ml of BVZ [8], 5 mg/ml of CTX [9], 100 mg/vial of INF [10], 10 mg/ml of RTX [13] and 150 mg/vial of TTZ [14]. The working standard solutions of each mAb were prepared daily from the corresponding medicine immediately after opening it by appropriate dilution with 0.9 % NaCl isotonic solution to avoid any kind of degradation in the drugs. All the experiments were conducted with fresh mAb medicine

samples to ensure full molecular and structural integrity of the mAbs during the whole study.

2.3 Chromatographic system and software

Chromatography was performed using an Agilent 1100 liquid chromatograph equipped with a quaternary pump, degasser, autosampler, column oven and photodiode array detector (Agilent Technologies, Madrid, Spain). The instrument was connected to a personal computer fitted with an HPLC ChemStation workstation for LC 3D systems (rev. A.0903, Agilent Technologies). Chromatographic analyses were carried out in a BIO MAb NP10 250 mm × 4.6 mm i.d., 10 µm particle size, weak cation exchange analytical column (Agilent Technologies, USA). A Bio MAb NP10 50 mm × 4.6 mm i.d., 10 µm particle size, weak cation exchange guard column (Agilent Technologies, USA) was also used. The eluent flow rate was 0.8 ml/min and consisted of a gradient of Na₂HPO₄ 10 mM in Milli-Q water at pH 6.0 adjusted with HCl 2 M (eluent A) and a mixture of Na₂HPO₄ 10 mM and NaCl 1 M in Milli-Q water at pH 8.1 (eluent B). The gradient started at 10 % of eluent B and was increased to 100 % in 25 min. A post time of 3 min was used keeping 10 % of eluent B. The temperature of the column was maintained at 2±, and the injection volume was 1 µL. UV spectra were recorded between 200 nm and 399 nm, with a data point every 0.5 nm. Chromatograms were registered at 214 nm, 220 nm, 235 nm and 280 nm using 360 ± 20 nm as the reference wavelength. The chromatographic conditions are summarized in Table 1.

Table 1. Chromatographic conditions

Column	Bio MAb NP10 (50 mm x 4.6 mm, 10 µm, Agilent Technologies)
Eluent	A: Na ₂ HPO ₄ 10 mM in Milli-Q water at pH 6.0 B: Na ₂ HPO ₄ 10 mM and NaCl 1 M in Milli-Q water at pH 8.1
Elution	Gradient program: 0 min –10% B; 25 min – 100% B; PostTime: 3 min
Flow rate	0.8 mL/min
Injection volume	1 µL
Column temperature	25 °C
Autosampler temperature	5 °C
Injection washing solution	Milli-Q water
Detection	214 nm 220 nm 235 nm 280 nm

The STATGRAPHICS Plus 6.0 (Statistical Graphics System, 1992, Warrenton, VA) statistical software package was used for processing the chromatographic data.

2.4 Forced degradation studies of the mAbs

Forced degradation studies were performed using solutions of 2.0 mg/ml of each mAb prepared in NaCl 0.9 % and placed in glass vials to perform the stress. This concentration was selected as representative of the lowest concentration of the final product used in hospital. This study was conducted to validate the method for its intended propose, that is, to detect and track changes in the charge variant isoforms chromatographic profile and also to get knowledge about degradation when the mAbs solutions are handled and administered in hospital conditions. We therefore studied factors such as high temperature, high ionic strength and UV light exposure, in addition to subject the mAbs solution to acidic, basic and oxidant media in order to degrade the mAbs. The effect of agitation in mAbs was not evaluated in this work. The chromatograms of the stressed samples were compared with those of the fresh mAbs samples to detect the changes in the isoform profiles. Samples were analyzed in triplicate and the most representative chromatogram for each mAbs is showed in the corresponding Figures.

The effects of acid and alkaline media, ionic strength and oxidation medium were evaluated using solutions of HCl 1.0 M, NaOH 0.1 M, NaCl 1.5 M and H₂O₂ 1 % respectively. The stressed agent concentration was 25.0 %(v/v) (500 µL of the stressing agent was added to 1.5 ml of mAb standard solution). The samples were analyzed 24 hours after preparation. The effect of high temperature was evaluated by placing aliquots of each mAb solution in an oven (Heraeus S.A., Madrid, Spain) at 50°C for 24 hours. All stress conditions, except temperature stress, were carried out at room temperature (22 °C aprox). The effect of UV light was investigated by exposing aliquots in a UV chamber (SUNTEST CPS, Heraeus, Hanau, Germany) with the walls covered in mirrors and equipped with a Xenon lamp. Irradiation at 250 nm was established at 765 W/m² and chromatograms were recorded after 24 hours of irradiation.

2.5 Long-term stability studies of the mAbs clinical solutions

Samples of BVZ, CTX, INF, RTX and TTZ, (2.0 mg/mL) with 0.9% NaCl, were prepared from their innovative medicines Avastin®, Erbitux®, Remicade®, MabThera® and Herceptin®, respectively. The specification included in their scientific technical reports were followed for preparing all these solutions [8,9,10,13,14], including working in aseptic conditions using a laminar flow cabinet (Aura Vertical S.D.4, Bio Air Instruments, Italy). Since this study was focused in the evaluation of the charge variants by the proposed method and not in a wider stability study of the studied proteins, the clinical samples solutions were prepared in glass devices, then aliquoted, placed in amber glass vials (protected from daylight) and stored refrigerated at 4 °C. Likewise, several aliquots were stored frozen at -20 °C. The refrigerated samples were analyzed at 1, 4, 7, 14, 30, 45 and 60 days after preparation. The frozen samples were analyzed after 7 (only for CTX and BVZ) 30, 45 and 60 days of storage, performing in the samples only one frozen/thawed cycle. In the long-term study, % of area and the retention time (RT) of the main isoforms, the disappearance of initial isoforms and the detection of new degradation peaks of the 5 mAbs were evaluated, all this by comparing the charge variant profile of the analyzed samples along time with the initial chromatographic profiles recorded in the fresh samples, i.e. the day when the samples were prepared (Day 0). Samples were analyzed in triplicate and the most representative chromatogram for each mAbs is showed in the corresponding Figures.

3. Results and Discussion

3.1 (WCX)HPLC/DAD method performance for mAbs characteristic charge variant profile

The preliminary analyses were performed using the mobile phase composition indicated by the manufacturer of the column which was selected from the market [36], which corresponds to salt gradient conditions. As indicated in the technical report of the WCX column, the followed salt gradient was initially checked in the mobile phase: constant pH value of 6 adjusted with NaH_2PO_4 10 mM and a gradient of ionic strength from 0 to 100 % adjusted with NaCl 0.1M. Solutions of 2.0 mg/mL of each mAb were prepared by appropriated dilution of the corresponding medicine in NaCl 0.9 %. No chromatographic peaks were obtained for any of the five mAbs with these salt gradient conditions, indicating strong binding to the cation-exchanger. This was expected since the pI values of the five therapeutic mAbs are very close and higher than 8 since they all are representative of IgG1 structure. The theoretical pI values estimated by their amino acid sequences were: 8.4 for BVZ [37], 8.48 for CTX [38], 8.25 for INF [39], 8.68 for RTX [40] and 8.45 for TTZ [41]; Then, pH 6 is 2 unit below the theoretical pI and it justifies mAbs were strong retained into the column.

Therefore, salt-mediated pH-gradients conditions were selected to obtain the chromatographic charge variant profiles. The first step was the selection of the nature of the buffer. A stronger ionic strength buffer was checked using the same pH value (6) in the mobile phase, i.e. Na_2HPO_4 with a concentration of 6 mM, 8 mM and 10 mM. Results demonstrated that higher concentration gave shorter retention times for all the mAbs, not affecting the particular profile of the chromatographic charge variants. This was attributed to the increase of the eluting power with the increase of the ionic strength of the mobile phase.

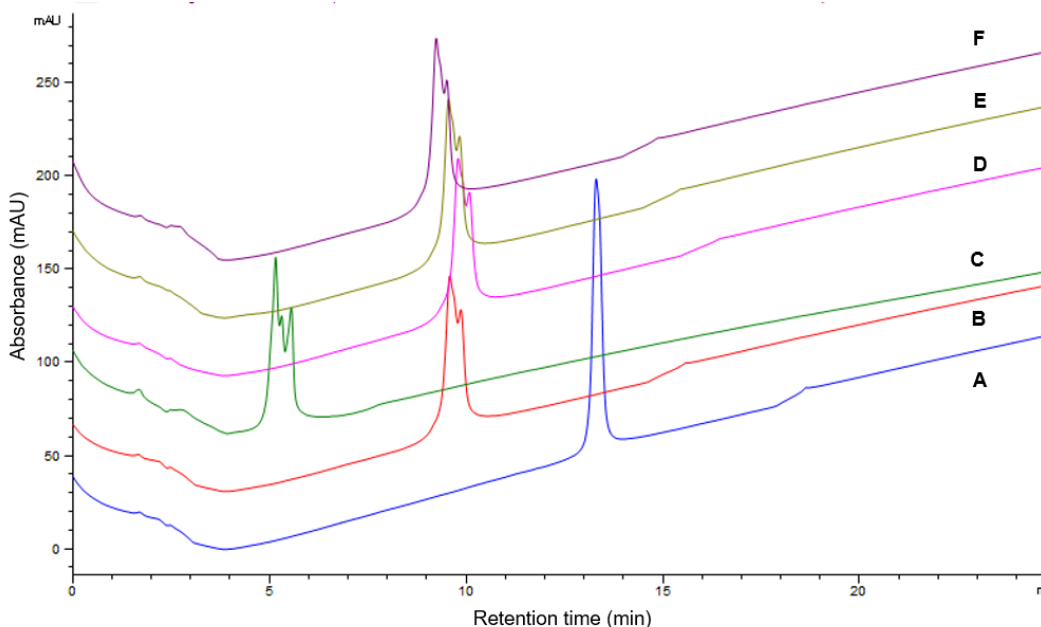


Fig 2. WCX Method optimization tests based on the pH gradient windows using INF at 2.0 mg/mL: 4.0 to 8.1 (A), 6.0 to 8.1 (B), 7.0 to 8.1 (C), 6.0 to 7.0 (D), 6.0 to 9.0 (E) and 6.0 to 10.0 (F).

Once selected the buffer (Na_2HPO_4 10 mM), several experiments were carried out testing different pH windows looking for high-resolution on the chromatographic charge variants separation, since this factor is crucial for that aim. For this optimization, a unique mAb was selected as a representative sample, i.e. INF at 2.0 mg/mL since it is one of the most structurally complex of the 5 studied (high glycosylated and not N-terminal lysine completely removed) [149]. The lower values tested for the pH window were 4.0, 6.0 and 7.0, and the higher values were 7.0, 8.1, 9.0 and 10.0. Each pH window was checked at least with two different gradient times, i.e. 15 min and 30 min. Fig. 2 shows results of this experiment 30 min of analysis. As it was expected, the elution time increased with the decrease of the starting pH value in the gradient (see Fig. 2 A, B and C) and from pH > 7 INF was not retained into the column, eluting in the front (chromatogram not shown) in a single chromatographic peak. Again, as expected, the increase of the final pH value in the gradient promoted the increase of the eluting time, as the INF was retained into the column with no improvements observed in the chromatographic profiles since they tended to show a more defined INF chromatographic peak overlaying the variants (Fig. 2 D, E and F). Two peaks were clearly detected (that not chromatographically resolved) in the INF chromatographic

charge variants profile for these pH windows tested. Finally, pH 6.0 to pH 8.1 was selected since allowed for the suitable detection of the INF charge variants in a reasonable time of analysis considering the aim of propose a single method for the charge variants of 5 deferent IgG1.

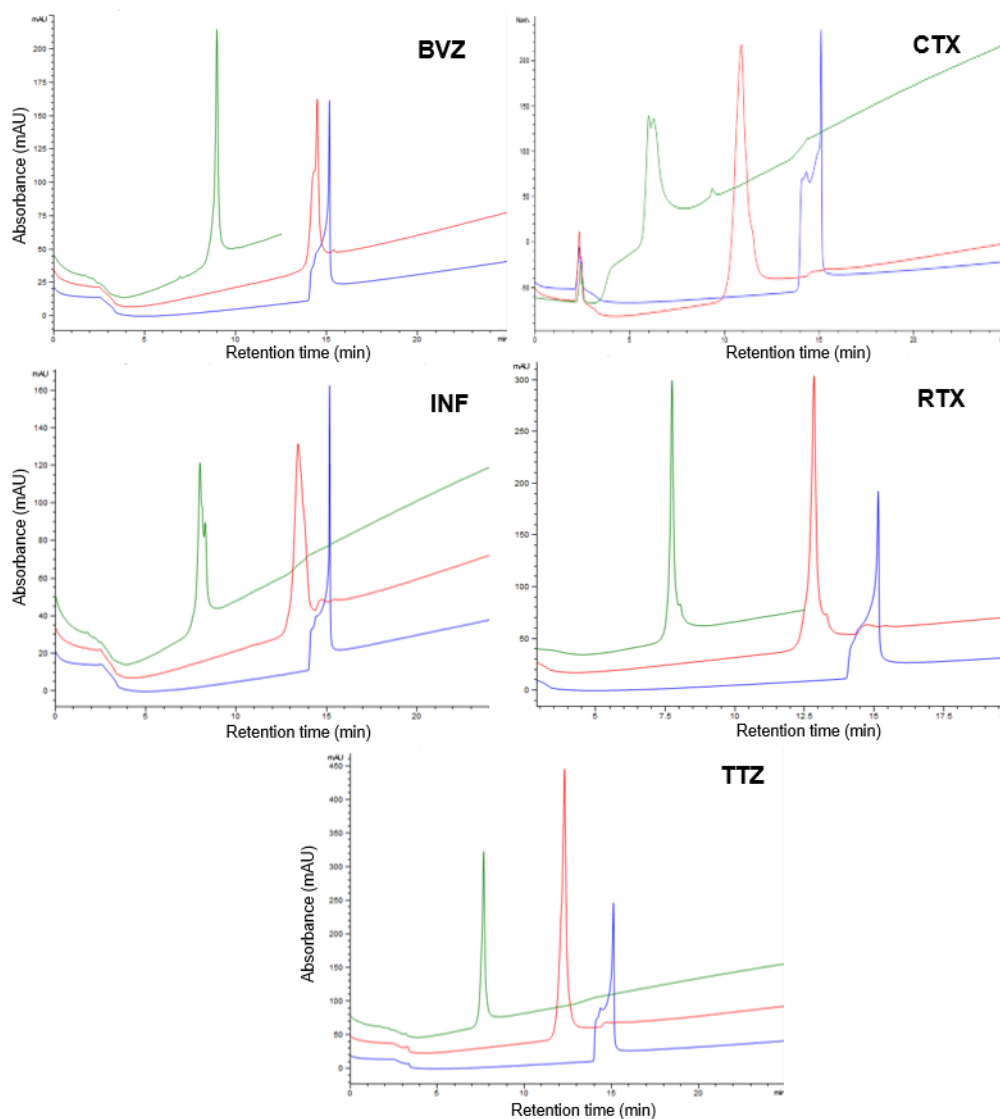


Fig. 3. WCX Method optimization tests based on Salt gradient of medicine samples solutions of BVZ, CTX, INF, RTX and TTZ. Effect of the ionic strength (NaCl) of mobile phase: 0.25 M (blue trace), 0.5 M (red trace) and 1.0 M (green trace) with optimized pH window from pH 6.0 to pH 8.1 in all cases.

The effect of the ionic strength was evaluated in the 5 mAbs by decreasing the concentration of NaCl (1.0 M) in the mobile phase using the above selected pH window. Experiments were carried out using 0.25 M, 0.5 M and 1.0 M of NaCl, with optimized pH window from pH 6.0 to pH 8.1, and they are summarized in Fig. 3. The lowering of the ionic strength sent back the elution time of all the mAbs. The charge variant profiles were very similar for all the mAbs, both in shape and retention time, when using the lower NaCl concentration tested (0.25 M), this was attributed to the low ionic strength power of the mobile phase at this NaCl concentration, which affect the resolving power of the mobile phase on the charge variants separation. As the concentration of the salt increased, the charge variant profiles were more defined and a greater number of peaks were detected in all the chromatograms. Consequently, the use of a concentration 1.0 M of NaCl in the mobile phase was confirmed since the decrease of the ionic strength prevented the detection of charge variants in the 5 mAbs analyzed.

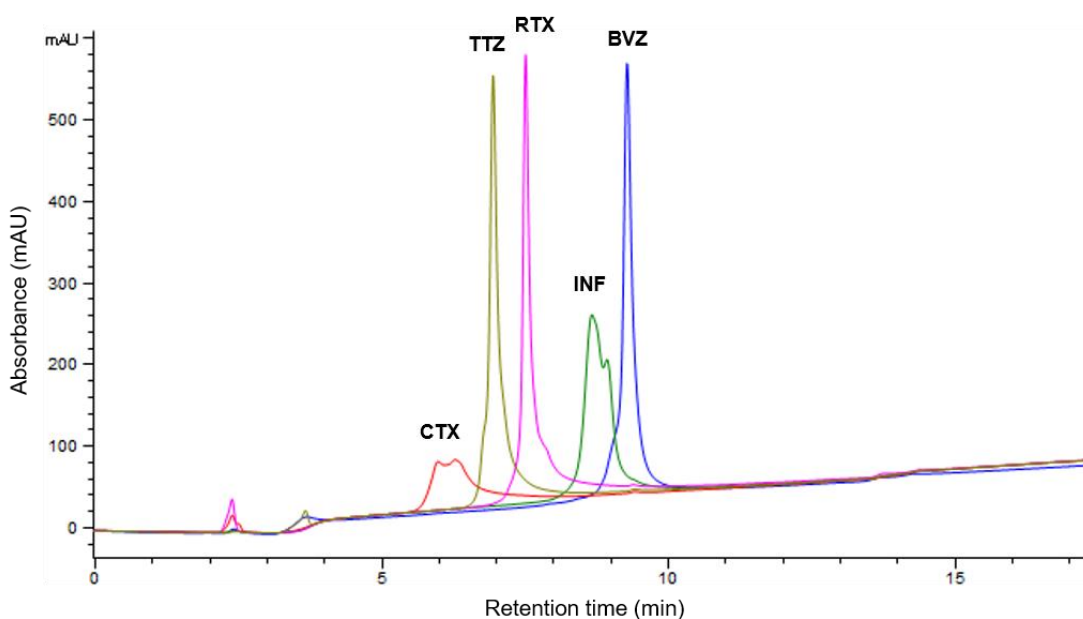


Fig. 4. Final conditions for the WCX Method after optimization for medicine samples solutions of BVZ (9.3 min), CTX (6.0 min), INF (8.6 min), RTX (7.5 min) and TTZ (7.0 min) at 2.0 mg/mL.

In Fig. 4 the cation exchange chromatographic elution profiles obtained for the mAbs using the above optimized conditions are shown. Each one has a clearly different charge variant profile that could be used even with identification purposes. The chromatograms

showed a main peak with different variant pattern for each protein. All the main chromatographic peaks in the profiles showed shoulders and unresolved peaks demonstrating the presence of charge variants in the final medicine product (dilutions at 2.0 mg/ml). In the case on TTZ and BVZ (Fig. 4, TTZ and BVZ respectively), acid variants (those early eluted) were noted although not resolved, being most evident for BVZ. It was preferred to develop a single method for the 5 mAbs instead of adjusting conditions for a complete separation of the variants of each one. For RTX (Fig. 4, RTX), clearly were noted basic variants (those lately eluted regarding the main peak). For CTX and INF, (Fig. 4, CTX and INF respectively) charge variant profiles were the most different from the other profiles. CTX showed an important acid variant eluting close to the main peak but not completely resolved, and the INF profile was characterized by a main peak eluting early and two important basic variants, one eluting close to the main peak although not completely resolved and the other eluting in a separated chromatographic basic peak. It is interesting to highlight the different eluting time observed for each mAb despite their similar pI (between 8.25 and 8.68): CTX eluted at the lower pH value in the gradients (therefore, at the lower retention times), followed by TTZ, RTX, INF and BVZ that eluted the last one at the highest pH (Fig. 4). Therefore, the mAb with the smallest pI (INF) eluted in fourth position, and the one with greatest pI (RTX) eluted in third position. These results suggested that the behavior of the elution of the mAbs in salt-mediated pH-gradients conditions in weak cation exchange chromatography not only depends on the charged surface, because in the case of high molecular weight multi-domain proteins the surface charge is not the only factor that influence the chromatographic separation processes, which avoid predicting the elution order based on the pI of a mixture of mAbs [28,43].

3.2 Controlled degradation study: Charge variants chromatographic profile of the mAbs

Forced degradation experiments were performed on the 5 medicines: Erbitux®, Avastin®, Remicade®, MabThera® and Herceptin®, to validate the method for detecting changes in the optimized charge variant profile of CTX, BVZ, INF, RTX and TTZ respectively. Also, this stress study was carried out with the aim of obtaining information of the degradation patterns of these 5 mAbs when hospital handle, for a deeper knowledge of their robustness to modification by ambient conditions during storage or administration. This is important because these kinds of therapeutic protein are exposed to various types of stress during administration and could suffer more

serious changes or degradation than chemical drugs [44], so this study was also focused on the factors that may affect their stability. Furthermore, whereas stability testing requirements are defined in regulatory guidelines, the specific procedures for forced degradation studies of therapeutic proteins have not yet been standardized [45]. We therefore carried out the forced degradation studies described below.

In the forced degradation experiments, the evaluation of the degradation of each of the antibodies was carried out by comparing the chromatographic profiles with a reference profile (quality control) of each mAbs. The quality control profiles were the charge variants profile of the medicine without submitting to any stressful condition and prepared fresh prior to its analysis.

As a general behavior, it could be highlighted that when subjected to the accelerated degradation conditions, different results were obtained for the 5 mAbs (Fig. 5). Although, all of them showed a similar tendency to elute at earlier retention time, thus indicating acidification as a common pattern of the degradation processes in all of them.

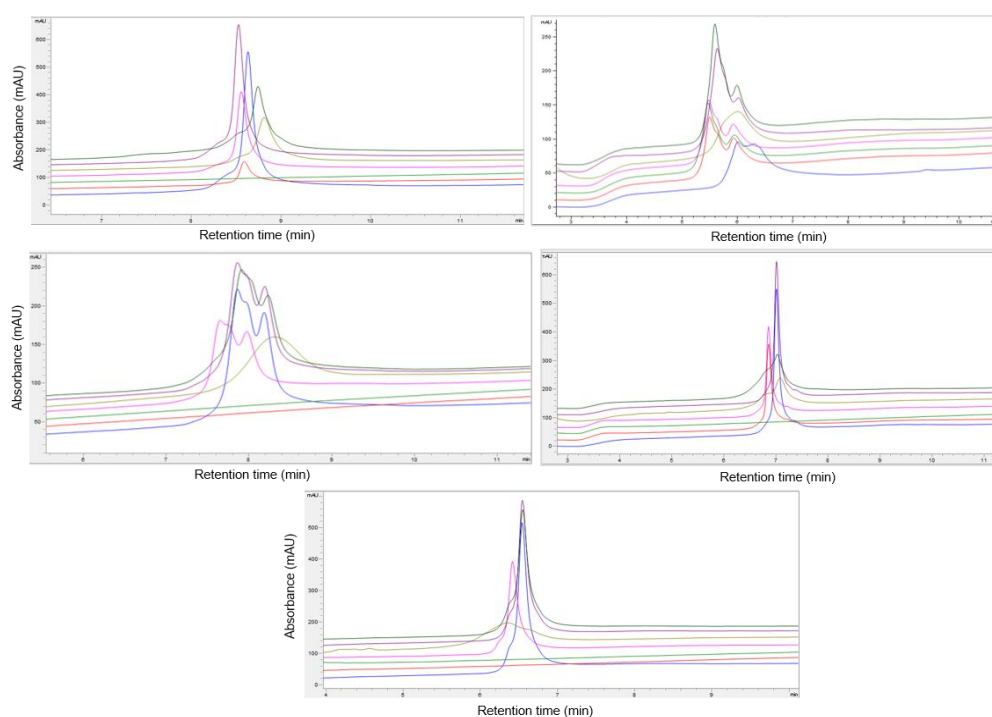


Fig. 5. Stress study of medicine samples solutions of BVZ, CTX, INF, RTX and TTZ. Stress conditions: acid stress (red trace), basic stress (green trace), high ionic strength (pink trace), oxidative stress (olive green), high temperature stress (purple trace), light exposure stress (dark green) and fresh prepared antibody (blue trace).

Temperature stress was carried out at 50 °C for 24 hours (Fig. 5). Most of the mAb showed no differences in their chromatographic profile compared to the reference sample (undegraded mAbs) and only CTX showed important change on its profile, with an increase of the acidic peak showed by a decrease in the retention times (Fig. 5, CTX). In the case of BVZ, chromatogram also exhibited a slightly decrease in its retention times (Fig. 5, BVZ).

The force-oxidative conditions promoted asymmetric chromatographic peaks with a drastic decrease in resolution compared with the undegraded samples and also higher elution times in the chromatograms of the 5 mAbs (Fig. 5, all cases). This behavior could be explained by conformational modification in the structure of mAbs that modify the exposition of the ionic residues of the protein [43]. In this case, in which the oxidative medium is relatively strong, the modification affects to important domine of the proteins, resulting in important modification of the charge variant profiles. These results agree with our previous works where reverse phase technique [1,46,47] was used, in which the behavior of the oxidized variants was attributed to the oxidation of the Met residues from the sulfhydryl to the sulfoxide group affecting the polarity of the mAb. This modification is one of the most common degradations known to occur in mAbs during the manufacturing, formulation, and/or storage process [43].

The acidic and basic stresses showed very similar results, except in the case of CTX. In any case, with the acidic stress, a high rate of degradation was observed in the 5 mAbs. An important decrease in the area of the chromatographic peaks was observed in the case of BVZ (80 % lost) and RTX (39 % lost) (Fig. 5, BVZ and RTX respectively). Total degradation was induced in INF and TTZ samples, with no chromatographic peak detection (Fig. 5, INF and TTZ respectively). This could be attributed to the strong stress conditions used (HCl 1 M) that could have promoted acid total hydrolyzation of the proteins. In the CTX stressed samples, the chromatographic peaks eluted at shorter retention time than the control samples (undegraded sample), indicating an increase in the acidity of the charge variants, which were also revealed with a different pattern profile. The basic stress results were very similar to those obtained in the acid stress, but even more drastic, including a total degradation of the mAbs except in the case of the CTX, that was again the most robust. CTX results were similar to those obtained in the acidic stress, with a decrease in the retention time of the charge variants to a more acidic behavior. Also, the charge variant profile was similar to those obtained for the acidic stress and different from the undegraded samples (Fig. 5, CTX). The total

degradation of the others mAbs, was again attributed to the strong stress conditions applied that could have promoted basic protein hydrolyzation.

The results of the ionic strength checked indicated no modification in the charge variant profiles of the mAbs, except for CTX samples, in which a shift of the profile to shorter retention time was observed. Regarding the charge profile pattern, an increase of the acidic peak was observed, very similar to the profiles obtained in acid and basic stress, which demonstrates the sensitivity of CTX to change in aqueous medium (Fig. 5, CTX). Nevertheless, all mAbs except CTX seem to be robust against degradation promoted by the increase of the ionic strength of the aqueous medium.

Light exposure is considered a critical condition in therapeutic proteins that affect directly to the mAbs quality during all product steps, including storage and patient's administration [45]. It is well known that light promote aggregation in therapeutic proteins [33,48] likely related with the oxidation of the aromatic amino acids (Trp, Tyr and Phe) [45]. Regarding charge variants, the resulting chromatograms here showed that light promoted different degradation behavior. INF and TTZ results indicated no modification respect the controls samples since no changes were observed neither in the area nor in the shape of the chromatograms (Fig. 5, INF and TTZ respectively); on the contrary, BVZ and RTX did suffer a significant decrease in the area of the main peaks (Fig. 5, BVZ and RTX respectively). CTX degradation pattern was very similar to the other stress conditions applied except the oxidation stress, therefore indicating a main path-way of degradation which two more acidic charge variants (Fig. 5, CTX).

Table 2. Stress study results

Stress type	BBZ		CTX		IFX		RTX		TTZ	
	% Loss area ¹	Peak change/ new peaks	% Loss area ¹	Peak change/ new peaks	% Loss area ¹	Peak change/ new peaks	% Loss area ¹	Peak change/ new peaks	% Loss area ¹	Peak change/ new peaks
Temperature	4.9	No	0.0	No	4.1	No	3.8	No	0.0	No
UV Stress	No	No	24.6	No	12.6	No	70.6	No	0.0	No
Ionic Stress	34.9	No	39.0	No	50.1	No	35.4	No	35.5	No
Oxidative Media	46.2	Yes	43.4	Yes	47.8	Yes	39.5	Yes	42.0	Yes
Acidic Media	79.9	No	37.5	No	100	n.d ²	38.9	No	100	n.d ²
Basic Media	100	n.d ²	37.3	No	100	n.d ²	100	n.d ²	100	n.d ²

¹ With respect to the control sample² No chromatographic peak detection

The results of these stress study, in addition to show patten of degradation of the 5 mAbs, validated the method for detecting charge variants modifications. Gathering all the results, the main degradation pattern indicated the increase of the acidic forms since there was detected a shift to shorter retention times of the chromatographic profiles to a more acidic pH with respect to the control samples (fresh mAbs). The decrease of the area under the main chromatographic peaks, the detection of new chromatographic peaks at different retention times or changes in the shape of the profiles were degradation patterns shared by the 5 mAbs with more or less extension (Table 2). Nevertheless, these modifications were specific for each mAb and also for each stress applied, in the way that the profile could be useful to identify a particular mAbs and also their environmental conditions. The degradation conditions here tested also have demonstrated to promote change of concern by the modification of the chromatographic size exclusion profile, detecting no-natural aggregation increased among others [49, 48].

3.3 Long-term stability study: evolution of the mAbs charge variants chromatographic profile

Once the (WCX)HPLC-DAD method was validated to detect modifications on the charge variants profile in these 5 marketed mAbs, we checked its suitability for tracking changes in this critical quality attribute when stored (refrigerated at 4°C and frozen at -20 °C) in-use samples in hospital. As in the previous stress study, we analyzed mAbs clinical solutions at 2.0 mg/mL, the lowest concentration used when administered in hospital

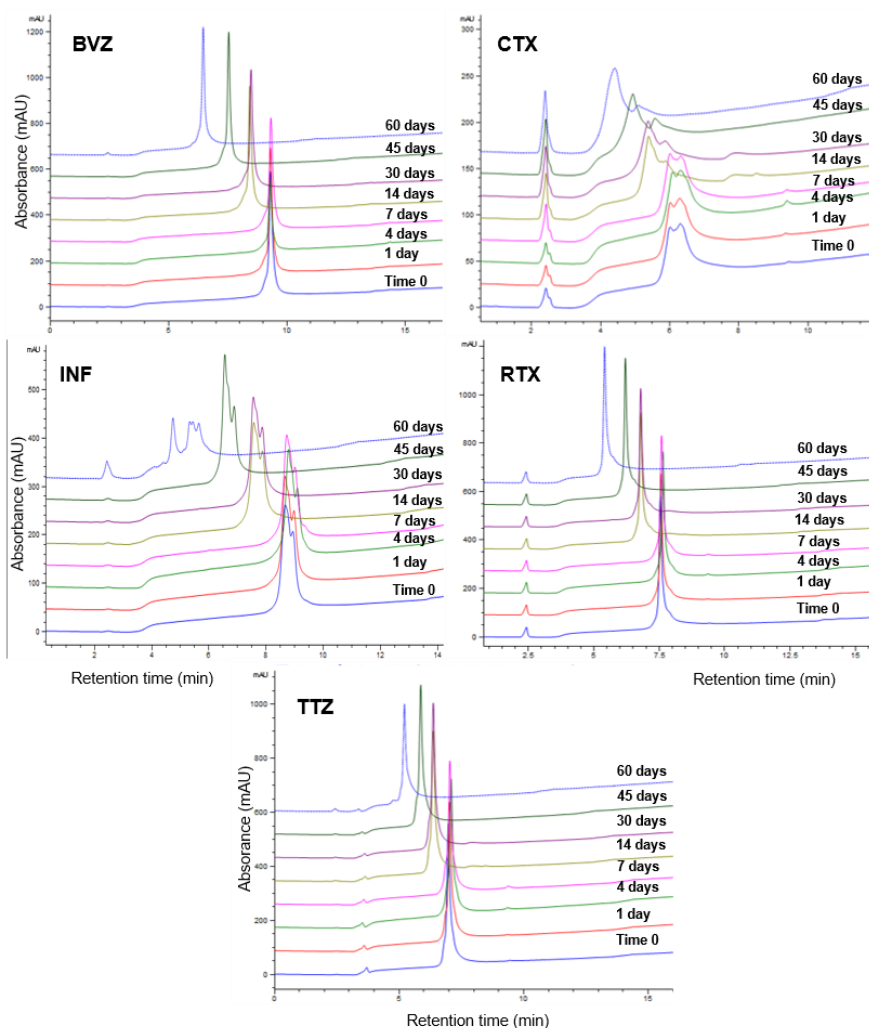


Fig. 6. Long-term stability study of medicine samples solutions at 2.0 mg/mL of BVZ, CTX, INF, RTX and TTZ until 60 days.

The results of this long-term stability study from the refrigerated stored samples are showed in Fig. 6 and Table 3. The first evident result was the common chromatographic behavior of the 5 mAbs, i.e. the decrease on the retention time in all the profiles which was detected from the 7th day of the storage at 4°C until the end of the study (60 days) in all the tested mAbs, (Fig. 6 and Table 3). This change could be attributed to a progressive loss of ion exchange capacity of the stationary phase functional groups (carboxylic acids), due to a decrease of specific surface area which leads in an earlier elution of the mAb isoforms and therefore a decrease in the retention time [50]. This behavior could be produced by an incomplete regeneration of the column charges, which resulted in a decrease in the number of positive charges and, consequently, in a lower chromatographic retention capacity [51]. Despite this, this phenomenon is very common in this kind of WCX columns and had no impact on the chromatographic performance, that is, on the selectivity and resolution of the isoforms, since only the retention time was affected.

Table 3. Charge variants long-term stability study results: 2.0 mg/mL mAbs clinical solutions stored refrigerated at 4 °C.

Day	BBZ		CTX		IFX		RTX		TTX	
	RT to acid (min) ¹	Degradation Peaks/ Mod peaks	RT to acid (min)	Degradation Peaks/ Mod peaks	RT to acid (min)	Degradation Peaks/ Mod peaks	RT to acid (min)	Degradation Peaks/ Mod peaks	RT to acid (min)	Degradation Peaks/ Mod peaks
1	0.0	No	0.0	No	0.0	No	0.0	No	0.0	No
4	0.1	No	0.1	No	0.1	No	0.1	No	0.1	No
7	0.0	No	0.0	No	0.1	No	0.0	No	0.0	No
14	0.9	No	0.6	Yes	1.1	No	0.8	No	0.7	No
21	0.8	No	0.6	Yes	1.1	No	0.8	No	0.6	No
30	1.7	No	1.1	Yes	2.1	Yes	1.4	No	1.1	No
60	2.8	Yes	1.6	Yes	3.3	Yes	2.1	No	1.8	Yes

¹ Shift measured in min referred to the control sample registered at day 0 (day of the sample preparation).

Regarding the individual mAbs, it was observed for BVZ that the retention time was unchanged up to the 7th day of the study, eluting around 9.2 min; however, from 14th day, the retention time progressively decreased until the end of the study, eluting at 6.4

min after 2 months of refrigerated storage, which represented a decrease of 2.8 min compared to the eluting time of the fresh sample (day of preparation, Time 0). No changes in the profile shape were observed in any of the recorded chromatograms (Fig. 6, BVZ).

In CTX samples, the most evident modification was the change in the proportion of the charged variants profile from day 7 until the end of the study (Table 4). At the beginning of the study, the charged profile showed two peaks, one main basic peak eluting at 6.2 min with a % area of 72.3 %, and other at retention times corresponding to a more acidic compound, eluting at 6.0 min representing the 27.7 % of the chromatographic area. These percentages and retention times remained almost unaltered until the 14th day of the study. A noticeable change in the proportion of the acidic/basic charge variants started at the 14th day, increasing the acidic form even to show higher percentage (60.5 %) than the basic form (39.5 %) arising to 75.1 % the last checked day (see Table 4) probably related with deamidation of Asn and Gln residues, which leads to more mAbs acidic forms [52,53]. In addition, it was observed an advance of 1.6 min in the retention time of the acid variant regarding the fresh sample checked the day of preparation (Time 0) (Fig. 6, CTX).

Table 4. CTX and INF: acidic and basic charge variants modification along time.

Day	Cetuximab (CTX)			Infliximab (IFX)		
	Acid forms (%)	Basic forms (%)	Acidic Peak Retention time	Acid forms (%)	Basic forms (%)	Acidic Peak Retention time (min)
0	27.7	72.3	6.0	66.1	33.9	8.6
1	27.7	72.3	6.0	66.2	33.8	8.6
4	31.6	68.4	6.0	69.5	30.5	8.7
7	36.7	63.3	6.0	66.7	33.3	8.7
14	60.5	39.5	5.3	61.3	38.7	7.5
21	56.4	43.6	5.3	62.7	37.3	7.5
30	66.0	34.0	4.9	66.5	33.5	6.5
60	75.1	24.9	4.3	66.1	33.9	5.3

In INF samples, unaltered profiles were observed up to 7th day of the study. At the beginning of the study (Time 0), the INF showed a basic peak eluting at 8.9 min with 33.9 % of the area and a main acidic peak eluting at 8.6 min with 66.1 % of the area (Table 4). Some slight modifications were observed in these percentages until the important modification in the shape of the profile from the 45th day and showing a different charge variant profile at the end of the study (Fig. 6, INF). In terms of retention time, a forward shift of the chromatogram of 1.1 min compared to the initial values at Time 0 was observed. This behavior was progressive up to the end of the study, with a forward shift of 3.3 minutes regarding the initial value, i.e first peak detected at 5.3 min (Time 60) instead of at 8.6 min (Time 0).

RTX charge variant chromatographic profile were invariant up to the 7th day of the study; from this checked day the forward shift occurred. Although the observed proportion of the main peak and its basic charge variants was kept practically invariant in terms of percentage up to 45th of the study, a slight modification on the shape of the profile can be clearly observed at 45th day with a (Fig. 6, RTX, 45 days). Results regarding the retention time were similar to the previous mAbs, i.e. the retention time of the main variant was unaltered up to the 14th day (around 7.4 min), where was already observed a slight decrease of 0.8 min. From this checked day on, the retention time progressively decrease until the last day of the study, observing a decrease of 2.1 min after the two months of storage with respect to the results at Time 0 (Fig. 6, RTX). Also, the last checked day was observed an important degradation of RTX evidence from the important charge variants modifications, with the detection of new charge variants (Fig. 6, RTX, 60 days).

Finally, TTZ results showed an invariant shape of the charge variant profile with a forward shift in the elution detected from the 14th checked day (Fig. 6, TTZ). This profile was characterized by just one peak at around 7.0 min, which eluted progressively to shorter retention time from the 14th days to the end of the study (5.2 min), with a decrease of 1.8 min in terms of retention time. It was also detected a decrease in the area under the profile.

Therefore, based on these results, it can be proposed that BVZ, RTZ and TTZ samples were the most stable mAbs along time regarding the charge variant profile modifications, with CTX and INF the most unstable when stored refrigerated at 4 °C (table 3).

Regarding the frozen stored samples, results were close to the refrigerated samples (Fig. 7), with BVZ, RTZ and TTZ suffering no modification in the shape of the profile but just the forward shift to shorter retention times. Only for BVZ and CTX, samples were checked at the first week of the frozen storage, no detecting modification, neither in the shape nor in the elution time. For all the five mAbs, after one month of storage, the forward shift of the profile to shorter retention times was detected which was progressive to the end of the study (two months). Similarly to the refrigerated samples, CTX and INF suffered modifications in their charge variants as to promote changes in their chromatographic shape of the profiles (Fig. 7). These results indicated that the frozen storage at -20 °C of these mAbs samples is not adequate to prevent modification on mAbs structure.

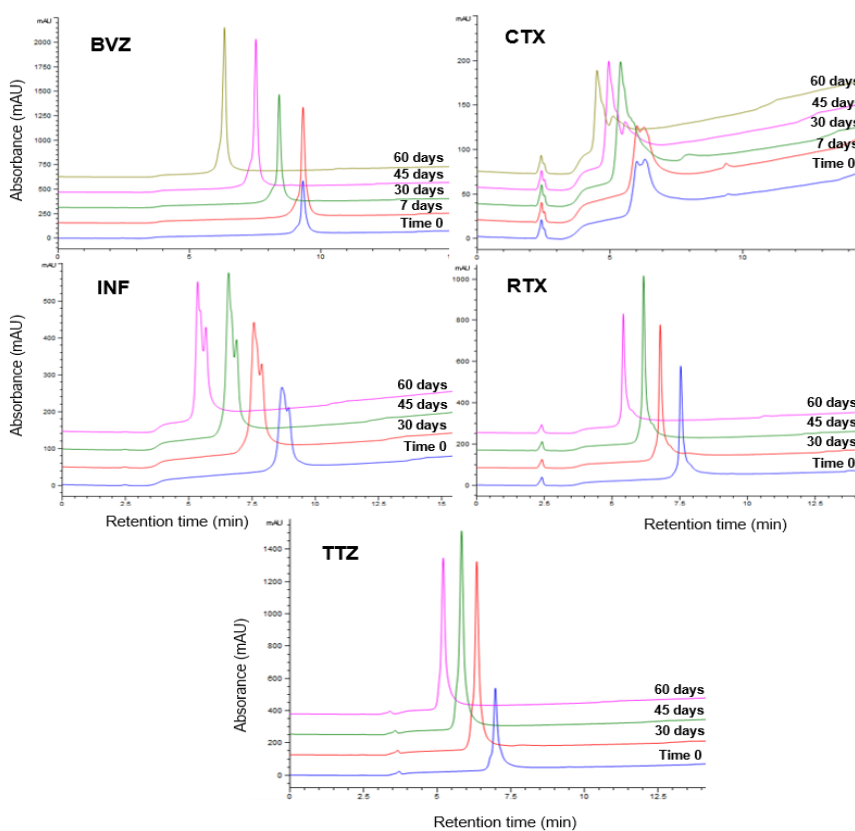


Fig. 7. Long-term stability study (two months) of mAbs clinical samples solutions 2.0 mg/mL in 0.9 % NaCl stored frozen at -20 °C. Representative chromatographic charge variant profiles from BVZ, CTX, INF, RTX and TTZ.

4. Conclusions

A generic analytical weak cation exchange chromatographic method which allows for the detection and characterization of the charge variants profile of BVZ, CTX, INF, RTX and TTZ is here described. This method uses a salt-mediated pH gradient mode and classical non-volatile, high ionic strength buffers which were compatible with ultraviolet detection. The method enables the recording of particular and very specific charge variant chromatographic profiles for each studied mAb, which demonstrated to be very useful to further track modifications, both in the stress studied conducted and in the long-term stability study along two months of diluted clinical solutions of the 5 mAbs here studied. Also, the characteristic of each profile could be useful for identification purposes. The stress study conducted, in addition to provide information about stability of the mAbs solutions against environmental factor degradation, was used to validate the method for the detection modification in the charge variant profiles. It has been proved that these modifications were very specific for each mAb and for each stress applied, in the way that the profile could be useful for detecting environmental conditions to which the mAbs would have been submitted to.

This method is simple and offers a simple strategy for 5 mAbs characterization on the natural intact level without any need of sample preparation. No changes in the chromatographic parameters neither in the mobile phases had to be applied to enable the characterization of the charge variant profiles of these 5 commercial mAbs widely used world-wide. This feature makes this method very useful and applicable to be used in those situations in which fast and easy analyses are required, as for example in hospital control laboratories, when a quick response is required.

Regarding the results obtained on the particular mAbs, they indicated different stability both against degradation and in the long-term study. The modifications on the profiles when submitted to stress were specific for each mAb and for each stress applied, in that way that the profile could be useful to identify the particular environmental conditions a mAbs has been submitted to. The charge variants chromatographic profiles observed during the long-term stability study indicated that BVZ, RTX and TTZ 2.0 mg/mL clinical samples solution were most stable than CTX and INF in the two storage conditions checked. To highlight that, all of them were very stable during the first 7th days when stored refrigerated at 4 °C, also for those samples checked after one week of frozen storage, i.e. BVZ and CTX, with no modification on the charge variants observed, therefore indicating stability regarding this critical quality attribute.

Therefore, frozen storage at -20 °C is not enough to prevent modification in these mAbs solutions. Furthermore, a progressive decrease on the retention time of the profiles was detected in all the samples from the second week of refrigerated storage and from the first months of frozen storage, this fact could be attributed to a column efficiency decrease with no impact in the charge variant profile of the proteins.

5. Acknowledgements

Financial support was provided by the Project FIS-PI10/00201 (Instituto Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Spain); this project has also been partially supported by European Regional Development Funds (ERDF). The authors would like to thank the Hospital Pharmacy Unit of the University Hospital of "San Cecilio" 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.

6. References

- [1] N. Navas, A. Herrera, A. Martínez-Ortega, A. Salmerón-García, J. Cabeza, L. Cuadros-Rodríguez, Quantification of an intact monoclonal antibody, rituximab, by (RP)HPLC/DAD in compliance with ICH guidelines, *Anal Biochem.* 405 (2013) 9351-63, <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7368-1>.
- [2] Z. Elgundi, M. Reslan, E. Cruz, V. Sifniotis, V. Kayser, The state-of-play and future of antibody therapeutics, *Adv. Drug Deliv.* 122 (2017) 2–19, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.11.004>.
- [3] H. Kaplon, J.M. Reichert, Antibodies to watch in 2021, *MAbs.* 13 (2021) 1-34, <https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1860476>.
- [4] D. Dimitrov, Therapeutic proteins, in: V. Voynov, J.A. Caravella (Eds.), *Methods of Molecular Biology*, Humana Press/ Springer, New York, 2012, pp. 1-26.
- [5] N. Navas, J. Hermosilla, A. Torrente-Lopez, J. Hernández, J. Cabeza, R. Pérez-Robles, A. Salmerón-García, Use of subcutaneous tocilizumab to prepare intravenous solutions for COVID-19 emergency shortage: Comparative analytical study of physicochemical quality attributes, *J. Pharm. Anal.* 10 (2020) 532-545, <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.06.003>.
- [6] D. Voet, J. Voet, *Biochemistry*, fourth ed., John Wiley and Sons, New York; 2010.
- [7] V. Irani, A.J. Guy, D. Andrew, J.G. Beeson, P.A. Ramsland, J.S. Richards, Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases, *Mol Immunol.* 67 (2015) 171–182, <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.03.255>.

- [8] European Medicines Agency (EMA), Scientific discussion bevacizumab.. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR-Scientific_Discussion/human/000582/WC500029262.pdf, 2005 (accessed 10 feb 2021).
- [9] European Medicines Agency (EMA), Scientific discussion cetuximab. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-discussion/erbitux-epar-scientific-discussion_en.pdf, 2004 (accessed 10 feb 2021).
- [10] European Medicines Agency (EMA), Scientific discussion infliximab. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR-Scientific-discussion/human/000240/WC500050885.pdf, 2005 (accessed 10 feb 2021).
- [11] M.C. Cheung, A.E. Haynes, R.M. Meyer, A. Stevens, K.R. Imrie, Rituximab in lymphoma: a systematic review and consensus practice guideline from Cancer Care Ontario, *Cancer Treat Rev.* 33 (2007) 161–176, <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2006.10.005>.
- [12] J.C. Edwards, L. Szczepanski, J. Szechinski, A. Filipowicz-Sosnowska, P. Emery, D.R. Close, R.M. Stevens, T. Shaw, Efficacy of B-cell targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis, *N Engl J Med.* 350 (2004) 2572–2581, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032534>.
- [13] European Medicines Agency (EMA), MabThera INN-rituximab. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/mabthera-epar-product-information_en.pdf. 2008 (accessed 10 feb 2021).
- [14] European Medicines Agency (EMA), Scientific discussion trastuzumab. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000278/WC500049816.pdf. 2005 (accessed 10 feb 2021).
- [15] E. Gabrielli, E. Pericolini, E. Cenci, F. Ortelli, W. Magliani, T. Ciociola, F. Bistoni, S. Conti, A. Vecchiarelli, L. Polonelli, Antibody Complementarity-Determining Regions (CDRs): A Bridge between Adaptive and Innate Immunity, *PLoS ONE.* 4 (2009) 81-87, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008187>.
- [16] L. Urquhar, Top product forecasts for 2020, *Nature.* 19 (2020) 86, <https://doi.org/10.1038/d41573-020-00011-5>.
- [17] B.L. Duivelshof, S. Fekete, D. Guillaume, V. D'Atri, A generic workflow for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies-application to daratumumab, *Anal Bioanal Chem.* 411 (2019) 4615-4627, <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1561-1>.
- [18] C. Xinling, M. Wei, H. Zhishang, L. Xiaoyu, M. Bo, Z. Xinyuan, Q. Xiaohong, Z. Tao, Y. Wantao, Global characterization of modifications to the charge isomers of IgG antibody, *J. Pharm. Anal.* 2095-1779 (2020) 31081-9, <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.11.006>.
- [19] R.Y.D. Huang, C. Guodong, Characterization of antibody–drug conjugates by mass spectrometry: advances and future trends, *Drug Discov.* 21(2016) 850-855, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.04.004>.

- [20] S. Muyldermans, Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies, *Annu. Rev. Biochem.* 82 (2013) 775-97, <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>.
- [21] International Conference on Harmonization (ICH), ICH Q6B: Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products. https://database.ich.org/sites/default/files/Q6B_Guideline.pdf, 1999 (accessed 13 feb 2021).
- [22] S. Gandhi, D. Ren, G. Xiao, P. Bondarenko, C. Sloey, M.S. Ricci, S. Krishnan, Elucidation of Degradants in Acidic Peak of Cation Exchange Chromatography in an IgG1 Monoclonal Antibody Formed on Long-Term Storage in a Liquid Formulation, *Pharm. Res.* 29 (2012) 209-224, <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0536-0>.
- [23] S. Fekete, A.B. Beck, J.L. Veutheya, D. Guillarme, Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals, *J Pharm Biomed Anal.* 113 (2015) 43-55, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.02.037>
- [24] P.K. Ng, M.A. Snyder, pH-based cation exchange chromatography in the capture and elution of monoclonal antibodies, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 29-35, <https://doi.org/10.1002/jssc.201100720>.
- [25] J. Kang, T. Halseth, D. Vallejo, Z.I. Najafabadi, K.I. Sen, M. Ford, B.T. Ruotolo, A. Schwendeman, Assessment of biosimilarity under native and heat-stressed conditions: rituximab, bevacizumab, and trastuzumab originators and biosimilars, *Anal Bioanal Chem.* 412 (2020) 763-775, <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02298-9>.
- [26] R. Pérez-Robles, L. Cuadros-Rodríguez, A. Salmerón-García, J. Cabeza-Barrera, N. Navas, 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, *J Pharm Biomed Anal.* 185 (2020) 113-223, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113233>.
- [27] L. Zhang, T. Patapoff, D. Farnan, B. Zhang, Improving pH gradient cation-exchange chromatography of monoclonal antibodies by controlling ionic strength, *J Chromatogr A.* 1272 (2013) 56-64, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.11.060>.
- [28] Y. Le Basle, P. Chennell, N. Tokhadze, A. Astier, V. Sautou, Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review, *J Pharm Sci.* 109 (2020) 169-190, <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.08.009>.
- [29] Y. Leblanc, C. Ramon, N. Bihoreau, G. Chevreux, Charge variants characterization of a monoclonal antibody by ion exchange chromatography coupled on-line to native mass spectrometry: Case study after a long-term storage at +5°C, *J Chromatogr B.* 1048 (2017) 130-139, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.02.017>.
- [30] F. Füssl, A. Trappe, K. Cook, K. Scheffler, O. Fitzgerald, J. Bones, Comprehensive characterization of the heterogeneity of adalimumab via charge variant analysis

- hyphenated on-line to native high resolution Orbitrap mass spectrometry, *MAbs*. 11 (2019) 116-128, <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1531664>.
- [31] M Sorensen, D.C. Harmes, R.D. Stoll, G.O. Staples, S. Fekete, D. Guillaume, A. Beck, Comparison of originator and biosimilar therapeutic monoclonal antibodies using comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry, *mAbs*. 8 (2016) 1224-1234, <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1203497>.
- [32] F. Florian, K. Cook, K. Scheffler, A. Farrell, S. Mittermayr, J. Bones, Charge Variant Analysis of Monoclonal Antibodies Using Direct Coupled pH Gradient Cation Exchange Chromatography to High Resolution Native Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 90 (2018) 4669-4676, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05241>.
- [33] R.L. Shi, G. Xiao, T.M. Dillon, M.S. Ricci, P.V. Bondarenko, Characterization of therapeutic proteins by cation exchange chromatography-mass spectrometry and top-down analysis, *MAbs*. 12 (2020) 1-12, <https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1739825>.
- [34] International Conference on Harmonization (ICH), ICH Q2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf, 2005 (accessed 13 feb 2021).
- [35] European Medicines Agency (EMA), Erbitux INN-cetuximab. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/erbitux-epar-product-information_en.pdf, 2004 (accessed 13 feb 2021).
- [36] Agilent Bio MAb HPLC columns, Ion-Exchange chromatography for Biomolecule analysis: A "How To" Guide. https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-3775EN_BioIEX_HowTo_LR.pdf, 2014 (accessed 13 feb 2021).
- [37] Drugbank online data base, Bevacizumab molecule information. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00112>, 2020 (accessed 13 feb 2021).
- [38] Drugbank online data base, Cetuximab molecule information. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00002>, 2020 (accessed 13 feb 2021).
- [39] Drugbank online data base, Infliximab molecule information. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00065>, 2017 (accessed 13 feb 2021).
- [40] Drugbank online data base, Rituximab molecule information. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00073>, 2019 (accessed 13 feb 2021).
- [41] Drugbank online data base, Trastuzumab molecule information. <https://go.drugbank.com/drugs/DB00072>, 2020 (accessed 13 feb 2021).
- [42] S. Carrillo, R. Pérez-Robles, C. Jakes, M. Ribeiro da Silva, S. Millán-Martín, A. Farrell, N. Navas, J. Bones, Comparing Different Domains of Analysis for the Characterisation of N-Glycans on Monoclonal Antibodies, *J. Pharm. Anal.* 10.1 (2020), 23–34. <<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2019.11.008>>

- [43] G. Teshima, M.X. Li, R. Danishmand, C. Obi, R. To, C. Huang, V. Lahidji, J. Freeberg, L. Thorner, M. Tomic, Separation of Oxidized Variants of a Monoclonal Antibody by Anion-Exchange, *J Chromatogr A*.1218 (2011) 2091-2097. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.107>.
- [44] A. Hawe, M. Wiggenhorn, M. Van de Weert, J.H.O. Garbe, H.C. Mahler, W. Jiskoot, Forced Degradation of Therapeutic Proteins, *J Pharm Sci.* 101(2012) 895-913. <https://doi.org/10.1002/jps.22812>.
- [45] P. Qi, D.B. Volkin, H. Zhao, M.L. Nedved, R. Hughes, R. Bass, S.C. Yi, M.E. Panek, D. Wang, P. Dalmonte, M.D. Bond, Characterization of the photodegradation of a human IgG1 monoclonal antibody formulated as a high-concentration liquid dosage form, *J Pharm Sci.* 98 (2009) 3117-30. <https://doi.org/10.1002/jps.21617>.
- [46] A. Martínez-Ortega, A. Herrera, A. Salmerón-García, J. Cabeza, L. Cuadros-Rodríguez, N. Navas, Study and ICH validation of a reverse-phase liquid chromatographic method for the quantification of the intact monoclonal antibody cetuximab, *J. Pharm. Anal.* 6 (2016) 117-124, <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.007>.
- [47] A. Martínez-Ortega, A. Herrera, A. Salmerón-García, J. Cabeza, L. Cuadros-Rodríguez, N. Navas, Validated reverse phase HPLC diode array method for the quantification of intact bevacizumab, infliximab and trastuzumab for long-term stability study, *Int. J. Biol. Macromol.* 116 (2018) 993-1003, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.142>.
- [48] J. Hernández-Jiménez, A. Martínez-Ortega, A. Salmerón-García, J. Cabeza J.C. R. Prados, Ortiz, N. Navas, Study of aggregation in therapeutic monoclonal antibodies subjected to stress and long-term stability tests by analyzing size exclusion liquid chromatographic profiles, *Int J Biol Macromol.*118 (2018) 511-524, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.105>.
- [49] J. Hernández-Jiménez, A. Salmerón-García, J. Cabeza, V. Celia, L.F. Capitan-Vallvey, N. Navas The Effects of Light-Accelerated Degradation on the Aggregation of Marketed Therapeutic Monoclonal Antibodies Evaluated by Size-Exclusion Chromatography With Diode Array Detection, *J. Pharm. Sci.* 105 (2016) 1405-18, <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.01.012>.
- [50] E. Farsang, K. Horvath, A. Beck, Q. Wang, M. Lauber, D. Guillarme, S. Fekete, Impact of the column on effluent pH in cation exchange pH gradient chromatography, a practical study, *J. Chromatogr. A.* 1626 (2020) 461350, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461350>.
- [51] A. Murisier, E. Farsang, K. Horvath, M. Lauber, A. Beck, D. Guillarme, S. Fekete, Tuning selectivity in cation-exchange chromatography applied for monoclonal antibody separations, part 2: Evaluation of recent stationary phases, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 172 (2019) 320-328, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.05.011>.

- [52] J. Vlasak, M.C. Bussat, S. Wang, E. Wagner-Rousset, M. Schaefer, C. Klinguer-Hamour, M. Kirchmeier, N. Corvaia, R. Ionescu, A. Beck, Identification and characterization of asparagine deamidation in the light chain CDR1 of a humanized IgG1 antibody, *Anal. Biochem.* 392 (2009) 145-154, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.05.043>.
- [53] C. Nowak, J.K. Cheung, S.M. Dellatore, A. Katiyar, R. Bhat, J. Sun, G. Ponniah, A. Neill, A. Mason, A. Beck, H. Liu, Forced degradation of recombinant monoclonal antibodies: A practical guide, *Mabs.* 9 (2017) 1217-1230, <https://doi.org/10.1080/19420862.2017.1368602>.

4.3. Conclusiones

En vista de los resultados obtenidos, se puede confirmar la idoneidad del método optimizado y validado (WCX)HPLC/DAD para la detección y caracterización del perfil de variantes de carga en los mAbs terapéuticos intactos BVZ, CTX, INF, RTX y TTZ, a partir de sus medicamentos innovadores: Avastin®, Erbitux®, Remicade®, MabThera® y Herceptin®, respectivamente.

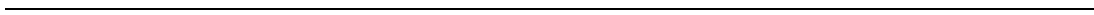
La optimización y desarrollo del método se realizó con el objetivo de obtener un método único y sencillo, que permitiera el análisis de los cinco mAbs de forma rápida y sin la necesidad de llevar a cabo ajustes previos de las condiciones cromatográficas y que fueran específicos para el análisis de cada mAb. El método seleccionado, basado en la aplicación simultánea de un gradiente de pH y un gradiente salino y en el uso tampones clásicos no volátiles de alta fuerza iónica compatibles con la detección ultravioleta, demostró su capacidad para la determinación de los perfiles cromatográficos de variantes de carga específicos para cada mAb analizado, característica que puede también emplearse con fines de identificación.

Tras la optimización del método, éste ha demostrado su validez en la detección de modificaciones en los perfiles cromatográficos de las variantes de carga. El desarrollo de estudios de stress controlado permite esta validación del método como indicador de la estabilidad además de obtener resultados de gran utilidad ya que proporcionan información sobre la estabilidad de los mAbs y sus posibles vías de degradación frente a factores ambientales específicos a los que puedan ser sometidos. También, el comportamiento de cada mAbs fue diferente a la degradación, obteniéndose perfiles de carga diferentes para cada uno de los cinco mAbs estudiados en cada condición de estrés aplicada, de forma que estos perfiles podrían ser útiles para determinar condiciones ambientales adversas a las que se habrían sido sometidos los mAbs durante su almacenamiento.

En cuanto al estudio de estabilidad en el tiempo (dos meses), éste se realizó empleando preparaciones farmacéuticas de uso clínico de 2.0 mg/ml de los mAbs

BVZ, CTX, INF, RTX y TTZ a partir de sus medicamentos innovadores, preparadas en suero salino (NaCl 0.9%) y almacenados a 4°C y protegidos de la luz. Los resultados concluyeron que el RTX es el mAb más estable ya que mantuvo inalterado su perfil cromatográfico durante los dos meses del estudio, seguido de BVZ y TTZ que tampoco mostraron modificaciones en su perfil de carga ni aparición de picos de degradación durante todo el estudio, aunque ambos sufrieron una pérdida de área cromatográfica en el último día de control (día 60). CTX e INF fueron los mAb que presentaron mayor inestabilidad debido a que sufrieron cambios importantes en sus respectivos perfiles de carga a partir del 7º día de estudio, acompañado por un aumento de las variantes ácidas con respecto al pico principal, que en el caso de CTX, se mostró un aumento progresivo y constante hasta el final del estudio. En el caso de INF, el perfil de carga obtenido al finalizar el estudio (día 60) presentó un importante proceso degradativo, con la detección de un nuevo pico de ácido y una disminución sustancial en la abundancia de las principales variantes de carga.





A partir de los resultados globales de la presente Tesis Doctoral, se extraen las siguientes conclusiones generales. Las conclusiones específicas de cada uno de los capítulos quedan recogidas en la sección de conclusiones de cada uno de ellos.

- Se ha validado como indicador de la estabilidad un método analítico basado en la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia en la modalidad de fase inversa con detección UV-visible por diodos en filas ((RP)HPLC/DAD) siguiendo las recomendaciones indicadas en la guía ICH Q2(R1). Este método ha demostrado ser idóneo para los fines propuestos, es decir, para la cuantificación proteica de los mAbs terapéuticos estudiados incluidos en sus medicamentos innovadores: BVZ (Avastin®), CTX (Erbix®), INF (Remicade®) y TTZ (Herceptin®), preparados en condiciones típicas de uso hospitalario.
- Los estudios de degradación forzada realizados en los 4 mAbs estudiados para la validación del método propuesto como indicador de la estabilidad ((RP)HPLC/DAD), demostraron la idoneidad de éste para la detección de modificaciones/ degradaciones en los mAbs analizados mediante la aplicación de estrategias analíticas de pureza espectral y análisis cromatográfico. Además, estos resultados contribuyen al conocimiento de la estabilidad de los mAbs frente a agentes externos para así poder establecer las potenciales vías de degradación de cada mAb y recomendar pautas de almacenamiento y manipulación específicas.
- Se han puesto en marcha estudios de estabilidad a largo plazo para la evaluación de la estabilidad, desde el punto de vista de la cuantificación proteica, de 4 mAbs terapéuticos presentes en sus medicamentos innovadores en condiciones típicas de uso hospitalario, es decir, en sus preparaciones farmacéuticas de uso clínico preparadas en suero salino (NaCl 0.9%) y almacenadas a 4°C protegidos de la luz. Estos resultados demostraron una alta estabilidad de los 4 mAbs estudiados, que no

mostraron modificaciones/degradaciones durante el mes de estudio en las condiciones de almacenamiento establecidas y recomendadas por los fabricantes. Las concentraciones estudiadas han sido: 2.0 mg/mL para CTX; 0.5 mg/mL, 2.0 mg/mL y 10 mg/mL para BVZ; 0.5 mg/mL, 2.0 mg/mL y 10 mg/mL para INF; y 0.5 mg/mL and 2.5 para TTZ.

- El análisis espectral ha demostrado ser una herramienta adecuada para la detección de modificaciones/ degradaciones de los mAbs durante los estudios de degradación forzada y los estudios de estabilidad en el tiempo. A pesar de la falta de separación cromatográfica de las formas degradadas de los mAbs mediante la cromatografía en fase inversa, la aplicación de estrategias de análisis de pureza espectral, comparando el factor de pureza o similitud de los picos cromatográficos correspondientes a los mAbs intactos y degradados ha permitido la identificación de estas últimas formas de los mAbs en los estudios realizados, haciendo posible determinar la estabilidad de los 4 mAbs desde el punto de vista de la determinación del contenido proteico por cromatografía líquida en fase inversa.
- Se ha desarrollado una metodología de análisis basada en cromatografía líquida de alta eficacia en la modalidad de intercambio catiónico débil con detección UV-visible por diodos en filas ((WCX)HPLC/DAD) para el estudio de la heterogeneidad de carga de los mAbs terapéuticos intactos BVZ, CTX, INF, RTX y TTZ, preparados a partir de sus medicamentos innovadores: Avastin®, Erbitux®, Remicade®, MabThera® y Herceptin® en condiciones de uso hospitalario. Esta metodología permite, mediante la evaluación de los perfiles de carga, la identificación de cada mAb al considerarse específicos y característicos de cada mAb.

- Se ha validado el método como indicador de la estabilidad, mediante la puesta en marcha estudios de estrés específicos en los 5 mAbs estudiados y de acuerdo con las pautas indicadas en la guía ICH Q2(R1) sobre la evaluación de la especificidad. Estos estudios demostraron la capacidad del método para detectar cambios en el perfil de variantes de carga de estos mAbs terapéuticos, lo que permite la identificación de las pautas de degradación de estos mAbs en condiciones ambientales concretas de modo que puedan aportar información para la mejora de las indicaciones de almacenamiento de estos productos.
- Se ha aplicado esta metodología en estudios de estabilidad en el tiempo en condiciones de uso hospitalario para la evaluación de los perfiles cromatográficos de las variantes de carga de los 5 mAbs terapéuticos preparados a partir de sus medicamentos innovadores. Durante el tiempo de ejecución de estos estudios, se observaron gran diversidad de cambios en los perfiles de carga dependiendo del mAb analizado, evidenciando una mayor o menor estabilidad de los mAbs estudiados.
- Los resultados de estabilidad en el tiempo de los mAbs intactos BVZ, CTX, INF, RTX y TTZ, obtenidos a partir de los dos métodos validados en esta Tesis Doctoral, han aportado información muy útil sobre la estabilidad en el tiempo de estos 5 mAbs permitiendo establecer cambios en las especificaciones de los respectivos productos biotecnológicos. Los datos de estabilidad aportados contribuyen a una toma de decisión sobre la posibilidad de reutilización de los sobrantes diarios de estos medicamentos con plena seguridad y eficacia para el paciente, posibilitando el ahorro en el gasto sanitario y contribuyendo a la sostenibilidad del sistema sanitario público.
- Los estudios de degradación acelerada, además de haber permitido la validación de los métodos propuestos en esta Tesis, muestran información sobre las posibles vías de degradación de los

medicamentos estudiados, pudiendo determinar aquellos factores ambientales críticos a la hora de su manipulación.

- Toda la información extraída de los 3 trabajos experimentales junto con la información proporcionada en otros trabajos realizados en esta línea de investigación, pone de manifiesto la necesidad de la implementación de metodologías basadas en técnicas analítica con un enfoque ortogonal, que permitan determinar características estructurales y de estabilidad de moléculas complejas, como por ejemplo los mAbs, desde puntos de vista analíticos diferentes.



- **Título:** *Long-term study of the formation of aggregates in undiluted Cetuximab 5 mg/ml.*
Autores: A. Martínez-Ortega, A. Salmerón-García, N. Navas-Iglesias, J. Hernández-Jiménez, J. Cabeza-Barrera, LF Capitán-Vallvey.
Congreso: 18th Congreso de la Asociación Europea de Farmacéuticos Hospitalarios (18th EAHP), European Journal of Hospital Pharmacy, 20:A77.13-15 Marzo 2013, Paris (Francia).

- **Título:** *Long-term study of the formation of aggregates in undiluted Bevacizumab 25 mg/ml.*
Autores: J. Hernández-Jiménez, A. Salmerón-García, N. Navas-Iglesias, A. Martínez-Ortega, J. Cabeza-Barrera, LF. Capitán-Vallvey.
Congreso: 18th Congreso de la Asociación Europea de Farmacéuticos Hospitalarios (18th EAHP), European Journal of Hospital Pharmacy, 20:A77.13-15 Marzo 2013, Paris (Francia).

- **Título:** *Ionic stress study of the therapeutic monoclonal antibody Cetuximab.*
Autores: A. Martínez-Ortega, A. Salmerón-García, A. Herrera-Rubia, A. Navas-Iglesias, N. Cuadros-Rodríguez, L. Cabeza-Barrera, J. Capitán-Vallvey.
Congreso: VII Congreso nacional de Biotecnología (ISBN: 84-697-0793-0), Julio 2014, Barcelona (España).

- **Título:** *Ionic stress study of the therapeutic monoclonal antibody Rituximab.*
Autores: A. Herrera-Rubia, A. Salmerón-García, A. Martínez-Ortega, N. Navas-Iglesias, L. Cuadros-Rodríguez, J. Cabeza-Barrera, LF. Capitán-Vallvey, LF.
Congreso: VII Congreso nacional de Biotecnología (ISBN: 84-697-0793-0), Julio 2014, Barcelona (España).

- **Título:** Formación de agregados de Trastuzumab en condiciones de estrés ácido, básico y oxidante.

Autores: J. Hernández-Jiménez, A. Salmerón-García, A. Martínez-Ortega, N. Navas-Iglesias, L. Cuadros-Rodríguez, J. Cabeza-Barrera, LF. Capitán-Vallvey.

Congreso: VII Congreso nacional de Biotecnología (ISBN: 84-697-0793-0), Julio 2014, Barcelona (España).





En esta sección se incluye el primer trabajo publicado en esta línea de investigación y que ha sido citado en la sección inicial de la presente Tesis Doctoral, concretamente en el apartado de Resumen. A continuación, se incluye la información sobre la publicación y además se incluye el propio artículo en su formato adaptado a las características de esta Tesis.

- **Autores:** Natalia Navas, Agustín Herrera, Antonio Martínez-Ortega, Antonio Salmerón-García, José Cabeza, Luis Cuadros-Rodríguez
- **Título:** *Quantification of an intact monoclonal antibody, rituximab, by (RP)HPLC/DAD in compliance with ICH guidelines.*
- **Volumen:** 405
- **Páginas:** 9351–9363
- **DOI:** 10.1007/s00216-013-7368-1
- **Revista:** Analytical and Bioanalytical Chemistry. JCR abbreviation: ANAL. BIOANAL. CHEM. ISSN 1618-2642.
- **Categoría Journal Citation Reports (JCR):** CHEMISTRY, ANALYTICAL
- **Índice de impacto (2013) (JCR):** 3.578
- **Posición:** 11/76 (Percentil 85.53, Q1)
- **Fecha de Publicación:** 12 de octubre de 2013.

Quantification of an intact monoclonal antibody, rituximab, by (RP)HPLC/DAD in compliance with ICH guidelines

Natalia Navas · Agustín Herrera · Antonio Martínez-Ortega · Antonio Salmerón-García · José Cabeza · Luis Cuadros-Rodríguez

Received: 18 April 2013 / Revised: 11 September 2013 / Accepted: 13 September 2013 / Published online: 12 October 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract We studied the quantification of an intact therapeutic monoclonal antibody (mAb), rituximab (RTX), using (reverse-phase) high-performance liquid chromatography with diode array detection ((RP)HPLC/DAD). To this end, we developed a chromatographic method and validated it as stability-indicating in accordance with the International Conference on Harmonization guidelines (ICH). A 300-Å C8 column (250 mm×4.6 mm, 5 µm) was used to perform the analysis, and the temperature was maintained at 70 °C. Although only one mAb was analyzed, it was necessary to apply a gradient to elute it with a complex organic mixture. Chromatograms were registered at several wavelengths, with $\lambda=214$ nm employed for quantification purposes. The method was developed to quantify marketed RTX under typical hospital administration conditions. Further dilution was avoided in order to prevent additional mAb modification, and in this way the method was shown to be linear from 60 to 5000 mg/L. The precision of the method (repeatability and intermediate precision, estimated as the relative standard deviation, RSD %), was less than 1.0 %.

Accuracy, specificity, robustness, and system suitability were also evaluated as specified in the ICH guidelines. We conducted a comprehensive chromatographic analysis by submitting RTX to several informative stress conditions. These forced degradation studies were conducted for two reasons: to estimate the specificity of the method, and to evaluate the robustness of the mAb formulation against external stress factors when handling it in preparation for administration. Thus, we investigated the effects of acid, base, oxidation, ionic strength, temperature, and UV light. Although a slight modification to the intact mAb could not be distinguished chromatographically in the stress studies we conducted, the procedure proposed here to evaluate peak purity enabled us to detect it with a satisfactory level of confidence. The proposed method could therefore be considered stability-indicating for quantifying the intact mAb since it is qualified to detect its degradation/modification. Finally, the method was used to evaluate RTX in a long-term stability study performed under hospital conditions of use.

Keywords (Reverse-phase) high-performance liquid chromatography/diode array detector · Peak purity analysis · Stress study · Monoclonal antibody quantification · Rituximab

N. Navas (✉) · L. Cuadros-Rodríguez
Department of Analytical Chemistry, and Instituto Investigación Biosanitaria Granada (IBIG), Faculty of Science, University of Granada, Campus Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain
e-mail: natalia@ugr.es

A. Herrera · A. Martínez-Ortega
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, University of Granada, Campus Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain

A. Salmerón-García
UGC Intercentro Intermiveles Farmacia Granada, Instituto Investigación Biosanitaria Granada (IBIG), Baza Hospital, 18012 Granada, Spain

J. Cabeza
UGC Intercentro Intermiveles Farmacia Granada, Instituto Investigación Biosanitaria Granada (IBIG), University Hospital San Cecilio, 18012 Granada, Spain

Introduction

Over the past 20 years, therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) have played a significant role in drugs and medicines, and they look set to play an even more significant role in the future [1]. There is therefore considerable global interest in these advanced, albeit very expensive, medicines from many biopharmaceutical fields, including manufacturers, regulatory bodies, researchers, and clinicians.

The characterization of therapeutic mAbs poses many challenges compared to the characterization of traditional chemical drugs with low molecular masses because of their inherent

complexity due to their proteinaceous nature [2]. MAbs are a class of glycoproteins with high molecular masses (approximately 150,000 Da) to which specific analytical methodologies must be applied [3]. Different analytical techniques based on different principles are also required to fully characterize mAbs. As they are intended for therapeutic use, each analytical method used to characterize any aspect of a therapeutic mAb must fulfill the requirements of international regulatory organizations, such as the International Conference on Harmonization (ICH) guideline ICH Q6B [4]. This document indicates that the analytical procedures used in the characterization of biotechnological products (e.g., mAbs) should be validated in compliance with the ICH Q2(R1) guideline relating to the validation of analytical procedures [5].

Rituximab (RTX) is a chimeric mouse/human IgG1 mAb that binds to CD20, a transmembrane protein, located on pre-B and mature B-lymphocytes [6]. It is intended for use in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma [7], rheumatoid polyarthritis [8], and chronic lymphoid leukemia. Several typical protein characterization methods have been used recently in a long-term stability study focusing on the determination of the physicochemical modification of RTX, including size exclusion chromatography (SEC), cation exchange chromatography (CEX), dynamic light scattering (DLS), turbidimetry, second-derivative ultraviolet absorption, Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), and peptide mapping [9]. None of these methods have been sufficiently rigorously validated to be considered stability-indicating. To the best of our knowledge, none of the methods developed so far have followed and fulfilled all of the requirements of a stability-indicating method for the determination of therapeutic mAbs based on physicochemical parameters according to the ICH. Thus, efforts must be made from an analytical point of view to provide a rigorous, validated method for the determination of all of the characteristics of mAbs. Two validated immunoassay methods for determining RTX in human serum have been proposed [10, 11]. The specificities of these methods were tested using flow cytometry or by analyzing blank samples, respectively, but no degradation studies were conducted to test the fitness for purpose of the method when modification or degradation of the mAb occurred.

High-performance liquid chromatography (HPLC) is already a well-established technique for the determination of intact protein by size exclusion or ion exchange. However, recent technological developments in the field of reverse-phase (RP) chromatographic stationary phases (a large pore size of 300 Å or fused core particles with short alkyl chains) have made them promising tools for analyzing intact proteins [3]. In a very recently published paper about protein quantification using various HPLC methods, it was even claimed that the next step would be the characterization and quantification of mAbs by CEX and RP liquid chromatography, focusing particularly on the development of the method [12]. In this context, in the work described in the present paper, we investigated the

quantification of intact RTX by (RP)HPLC with diode array detection (DAD), developing and validating the method as stability-indicating in compliance with the ICH guidelines.

Despite the evident advantages of mass spectrometry (MS) for the qualitative identification of mAbs, ELISA has traditionally been the most widely applied technique for quantification [10, 11, 13, 14]. Nevertheless, the fact that immunoassays showed lower levels of precision (relative standard deviation of repeatability of about 10 %) and of robustness compared with physicochemical techniques led the ICH to recommend the latter for quantification purposes [4]. (RP)LC-MS has mainly been proposed for use in identifying and quantifying mAb modifications, such as deamidation [15] or tryptophan oxidation [16] with previous fragmentation of the mAbs into their light and heavy chains or enzymatic digestion. Recent advances in tandem mass-spectrometric instrumentation [triple quadrupole (tQ), quadrupole-time of flight (qTOF), high-resolution Orbitrap, and Fourier transform ion cyclotron MS equipment] have made this the most powerful technique for the structural analysis of intact mAbs, despite their high molecular masses [17–20]. Nevertheless, all of these are complex, highly expensive techniques that are not always available for quality control purposes. Also, when using a (tQ)MS instrument, high degrees of charge (m/z up to 5000) are needed to achieve the detection of mAbs. Quantitative aspects of the analysis of the mAb trastuzumab were investigated by LC electrospray (ESI) triple-quadrupole MS. A method was reported that had only been validated in terms of its linear range and limit of quantification [21], and the protein-specific envelope had to be deconvoluted to measure the mass of the molecule. No information about the heterogeneity of the mAb was reported in the study. Previous works have focused on the development of analytical (RT)HPLC-MS(Q-TOF MS) methods, but have optimized both the mobile and stationary chromatographic phases rather than validating the method [22, 23]. The heterogeneity and stability were also studied [23], but marketed mAbs were not analyzed in either of these two papers. The characterization of therapeutic mAbs by MS has been reviewed extensively recently [24].

In this work, we propose a (RP)HPLC-DAD method for the quantification of the intact mAb RTX. The method has been developed and validated in accordance with the ICH guidelines for biotechnological products. To this end, we carried out a stress study in order to test the feasibility of using it in the presence of modified or degraded products. We propose to use spectral peak purity analysis to characterize RTX, taking into account its natural heterogeneity. In terms of analytical quality assurance, the method has been validated for quantification purposes and qualified for the detection of mAb modification/degradation. All of the studies were conducted with fresh RTX standard samples. Finally, the method was successfully applied in a study analyzing the stability of diluted RTX solutions prepared under hospital conditions of use for up to a week.

Materials and methods

Standards, substances, and solvents

MabThera[®] (Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Germany) was used as a representative RTX reference material. The daily surplus was kindly supplied for this study by the Pharmacy Unit of the University Hospital "San Cecilio" (Granada, Spain). All of the standard solutions of RTX were prepared from this medicine. This was an essential preliminary step to enable us to conduct the study because it was impossible to obtain a proper standard of RTX. The medicine indicated that there were 100 mg of RTX in each single-use vial along with sodium citrate, polysorbate 80, sodium chloride, sodium hydroxide, hydrochloric acid, and water for injections, giving a final concentration of 10.0 mg/ml RTX [25]. The working standard solutions of RTX were prepared daily from marketed RTX (immediately after opening it) by appropriate dilution with 0.9 % NaCl aqueous solution. Our aim here was to avoid any kind of change or degradation in the mAb due to its complex protein nature. Also, different batches were used randomly throughout the study.

All reagents were of analytical reagent grade unless otherwise stated. Reverse-osmosis-quality water (purified with a Milli-RO plus Milli-Q station from Millipore Corp., Madrid, Spain) was used throughout. Methanol, hydrochloric acid, sodium hydroxide, propan-2-ol, and sodium chloride were supplied by Panreac (Barcelona, Spain). Hydrogen peroxide was supplied by Technical (Fontenay-sous-Bois, France). Trifluoroacetic acid (TFA) was from Merck KGaA (Darmstadt, Germany) and acetonitrile was from Poch S.A. (Gliwice, Poland). An isotonic solution of 0.9 % NaCl was supplied by B. Braun Medical (Madrid, Spain).

Chromatographic system and software

Chromatography was performed using an Agilent 1100 liquid chromatograph equipped with a quaternary pump, degasser, autosampler, column oven, and photodiode array detector (Agilent Technologies, Madrid, Spain). The instrument was connected to a personal computer fitted with an HPLC ChemStation workstation for LC 3D systems (rev. A.0903) (Agilent Technologies).

Chromatographic analyses were carried out in a 150 mm × 2.1 mm i.d., 5 μm particle size, wide-pore 300 Å C8 analytical column (300SB-C8 Zorbax, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). A 2.1 mm × 12.5 mm i.d., 5 μm particle size, C8 guard column (SBC8 Zorbax, Agilent Technologies) was also used. The eluent flow rate was 1.0 ml/min, and consisted of a gradient of 0.1 % TFA in Milli-Q water (eluent A) and a mixture of isopropanol, acetonitrile, Milli-Q water, and TFA (70+20+9.9+0.1, v+v+v+v) (eluent B). The gradient started at 10 % of eluent B, held for 1 min. It was then

increased to 20 % of B in 0.1 min, and kept constant at this for 3 min. Then eluent B was again raised in 0.1 min to 30 % B, and a linear gradient was applied from 4.1 to 10 min. From 10 to 10.1 min, eluent B was increased to 80 %, and this percentage was maintained until 12 min. A post-time of 3 min was required under the initial conditions of the gradient, i.e., 10 % of B eluent B. The temperature of the column was maintained at 70 °C, and the injection volume was 1 μL. UV spectra were recorded between $\lambda=200$ nm and $\lambda=399$ nm, with a data point every 0.5 nm. Chromatograms were registered at $\lambda=214$ nm, using $\lambda=360\pm 20$ nm as the reference wavelength.

The Statgraphics Plus 6.0 (Statistical Graphics System, 1992, Warrenton, VA, USA) statistical software package was used to treat the chromatographic data.

Analytical method validation

Linearity, LOD, and LOQ.

Linearity was evaluated up to 5 mg/ml. To this end, appropriate RTX standard solutions of 0.2, 0.5, 0.75, 1, 2.5, and 5 mg/ml were prepared in quadruplicate and injected into the chromatograph. A linear calibration function was fitted by least-squares regression, and linearity was accepted if the statistical probability level of the corresponding lack-of-fit test (the P_{LOF} -value) was greater than 5 % according to the Analytical Methods Committee [26].

The detection limit (LOD) and quantification limit (LOQ) were estimated from the calibration function. LOD and LOQ were calculated as $3(SD(a)/b)$ and $10(SD(a)/b)$, respectively, where $SD(a)$ is the standard deviation of the intercept and b is the slope of the calibration function.

Precision.

The precision of the method was determined as the intraday precision (repeatability) and the intermediate precision, and given as relative standard deviations (RSDs).

The former was estimated from the results of the analysis of RTX standard solutions prepared at the same concentration on the same day. Thirty samples with high concentration levels (10 samples of 5.0 mg/ml), medium concentration levels (10 samples of 1 mg/ml), and low concentration levels (10 samples of 0.5 mg/ml) were used for this purpose. The intermediate precision was estimated from the analysis of standard solutions at three concentration levels (i.e., 0.5, 1.0, and 5.0 mg/L) over five consecutive days. Two samples

of each concentration studied were prepared and analyzed daily.

Because ICH Q2(R1) [5] does not establish any precision criteria for acceptance of the method, the US Food and Drug Administration (FDA) criteria for HPLC methods for pharmaceutical analysis were followed [27, 28], i.e., an intraday precision of $\leq 2\%$.

Accuracy. The accuracy of the method was assessed from the average recovery value calculated by analyzing ten standard solution replicates at three concentration levels representing the top end, the middle value, and the bottom end of the calibration, in order to cover the stated linear range. Again, ICH Q2(R1) [5] does not indicate accuracy criteria for acceptance; we therefore decided to follow the FDA accuracy criteria for HPLC methods for pharmaceutical analysis [27, 28], i.e., an average recovery of $100 \pm 2\%$.

Specificity. Forced degradation studies were performed using diluted MabThera[®] sample solutions of 1 mg/ml and 4 mg/ml of RTX in NaCl 0.9%. ICH Q5c [29] recommends that stability testing must be carried out at representative concentrations of the final product, which, in the case of typical hospital conditions for RTX, would be in the range 1–4 mg/ml for injected solutions for infusion [25]. This range was therefore also used for the stress study.

We recorded the chromatograms of sample solutions submitted to degradation for two reasons: firstly to evaluate the specificity of the method, and secondly to detect degradation when the mAb is clinically handled and administered. We therefore studied the stress conditions of high temperature, high ionic strength, UV light exposure, addition of an acid and a base, and addition of an oxidant. The chromatograms of the stressed samples were compared with those of an RTX standard solution that had been freshly prepared and had not undergone degradation treatment. All samples were analyzed in triplicate.

The spectral peak purity was checked using the corresponding ChemStation software tools [30, 31]. This assessment was based on a comparison of all the

spectra recorded during the elution of the peak, one every 0.2 min, and on the calculation of a similarity function based on the regression coefficient (R^2 , in %). All of the spectra in the chromatographic peak were averaged to obtain a pooled spectrum. This was compared with all the spectra in the peak to obtain the similarity function. The similarity factor was set to a value of $\geq 99\%$ for acceptance of the spectral peak purity.

When studying the effects of acid and alkaline media, ionic strength, and oxidation medium, two studies were conducted, applying weak and strong conditions. HCl 1 mol/L, NaOH 0.1 mol/L, NaCl 1.5 mol/L, and H₂O₂ 1% were used. For the weak condition, the stressed agent concentration was 3.3% (v/v) (50 μ L of the stressed agent were added to 1.5 ml of the RTX standard solution), while the stressed agent concentration for the strong condition was 33.3% (v/v) (500 μ L of the stressed agent were added to 1.5 ml of the RTX standard solution). The samples were analyzed 24 h after preparation.

The effect of high temperature was evaluated by placing aliquots of the RTX standard solution in an oven (Heraeus S.A., Madrid, Spain) at a temperature of 50 °C for 24 h. After the specified time, these solutions were chromatographed.

The effect of UV light was investigated by exposing aliquots of the RTX standard solution in a UV chamber (SUNTEST CPS, Heraeus, Hanau, Germany) with mirrored walls and equipped with a xenon lamp. Irradiation at $\lambda = 250$ nm was 765 W/m². Chromatograms were recorded after 24 h of irradiation.

Robustness. Robustness was evaluated by making small changes in the composition of the temperature, mobile phase composition, and flow rate. Several aliquots of RTX standard solution of 1.0 mg/mL were analyzed at each modified condition to assess the impact on the assay results. The robustness of the method was then estimated by means of the retention time, symmetry factor (S), capacity factor (k'), and the number of theoretical plates (N).

System suitability. For system suitability testing, we used standard samples of 1.0 and 4.0 mg/ml prepared in NaCl 0.9 %. ICH Q2(R1) [5] does not indicate system suitability criteria for acceptance either; we therefore decided to follow the FDA criteria for HPLC methods of pharmaceutical analysis [27, 28], although we used the symmetry factor instead of the asymmetry ratio of a peak. The selected system suitability parameters were therefore N (acceptance criterion $N > 2000$), k' (acceptance criterion $k' > 2.0$), S (acceptance criterion $S \leq 2$), and injection repeatability [acceptance criterion RSD (%) ≤ 1 %].

Application of the method in a long-term study of diluted RTX samples

Three diluted RTX samples of 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, and 4 mg/ml in 0.9 % NaCl were prepared. One aliquot of each concentration was stored refrigerated at 4 °C and protected from daylight, and several aliquots were stored frozen at -20 °C. In the long-term study, the concentration of RTX was expressed as the percentage of the initial mAb concentration remaining at each checked time, where the initial concentration was taken as that obtained on the day the samples were prepared (day 0). In all cases, the reported concentration is the average of three replicates. The refrigerated sample was analyzed 1, 3, and 7 days after preparation. The frozen sample was analyzed after a month.

Results and discussion

Analytical method development

Researchers have already tried to develop methods based on (reverse-phase) high-performance liquid chromatography with diode array detection, (RP)HPLC/DAD, to characterize whole antibodies, both IgG1 and IgG2 [22, 23]. The first attempts to analyze intact and reduced antibodies by LC/MS were carried out using Poros columns [32, 33]. However, these columns have a low surface density of Poros material and also need a high flow rate for efficient separation. Nowadays, the use of stationary phases with long alkyl chains (C8 and C18) together with a high column temperature (60–75 °C) and a combination of nontraditional solvent systems with ion pairing agents [22, 23] is gradually becoming the established procedure.

We selected the chromatographic column and the solvent system recommended in the literature [23]. A Zorbax 300SBC8 analytical column was chosen because of its reported excellent

temperature stability at low pH [34]. The mobile phase was a combination of isopropanol (*i*-PrOH), acetonitrile (ACN), water, and trifluoroacetic acid (TFA). A mixture of water/ACN/TFA is commonly used when analyzing proteins by (RP)HPLC. Nevertheless, eluotopically stronger solvents are required for the analysis of antibodies in order to reduce column interactions due to the high hydrophobicity of the mAbs [23].

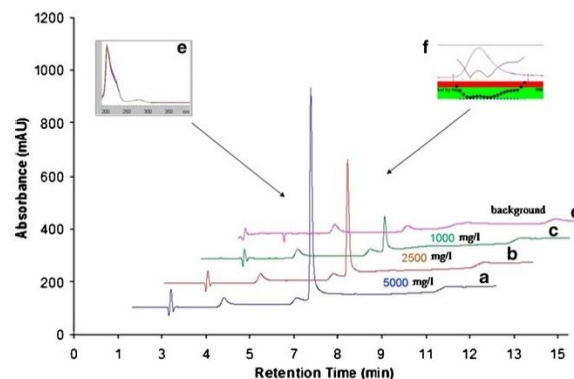
The (RP)HPLC/DAD method was developed as a stability-indicating method for detecting possible degradation products. A gradient to elute the intact mAb at a retention time of between 7 and 8 min was therefore mandatory; this is to allow both a rapid determination, which is important for routine analysis, and separation of the mAbs from the possible degradation products. Mobile phase A was water containing 0.1 % (v/v) TFA. Mobile phase B was a solvent mixture composed of 70 % (v/v) *i*-PrOH, 20 % (v/v) ACN, 9.9 % (v/v) water, and 0.1 % (v/v) TFA. Once the eluting power of this solvent system had been corroborated, gradient optimization focused mainly on obtaining the chromatographic peak of the mAb with high spectral purity, since it overlaps with a small chromatographic peak from the system solvent. Two equilibration steps of the column were necessary to elute the mAb at the selected retention time (between 7–8 min); when these steps were not done, a small chromatographic peak from the system solvent overlapped with the chromatographic peak of the mAb (see Fig. 1, chromatographic peak at approximately 7 min). The peaks at 4 and 7 min were from the solvent system because they were detected when we injected samples of water (blank samples) (Fig. 1d). Despite using a post-time of 3 min with 10 % phase B (the initial gradient conditions) to equilibrate the column, a minute was necessary under these analytical conditions to avoid changes in the retention time of the chromatographic peak of the mAb. As described in the literature, and later confirmed in a robustness study, slight changes in the mobile phase composition are critical in the elution of mAbs [22, 23].

The fact that column temperature was a critical chromatographic parameter was confirmed. The mAb was not eluted at temperatures below 50 °C, and higher temperatures gave narrower chromatographic peaks. We therefore selected 70 °C as the column temperature, the maximum specified for this column.

Chromatograms were recorded at different wavelengths ($\lambda = 214$ nm, $\lambda = 220$ nm, $\lambda = 254$ nm, and $\lambda = 280$ nm), using $\lambda = 360 \pm 20$ nm as the reference wavelength in all cases. $\lambda = 214$ nm was selected to obtain the analytical parameters of the method both because it was the absorption maximum and because the signal was less affected by the inherent heterogeneity of RTX.

Figure 1 shows chromatograms of RTX standard solutions under the selected chromatographic conditions. The UV absorption spectra recorded at the peak are also displayed (Fig. 1e), together with the results from peak purity analysis (Fig. 1f), both of which are discussed in the next section.

Fig. 1 RTX standard solutions: (a) 5 mg/ml, (b) 2.5 mg/ml, (c) 1 mg/ml. (d) Chromatogram of the mobile phase obtained by injecting water. (e) RTX UV absorption spectra recorded at the chromatographic peak. (f) Results from the peak purity analysis using 99.0 % as the similarity factor



Analytical method validation

The ICH Q6B [4] guideline indicates that the quantity of a biotechnological product, measured as a protein content, should be determined using an appropriate assay, usually physico-chemical in nature. The analytical procedures developed for such purposes should be validated in accordance with ICH Q2(R1) [5]. We therefore validated the (RP)HPLC/DAD method for the determination of RTX in terms of linearity, limits of detection and quantification, precision, accuracy, specificity, and robustness. A system suitability test was also performed.

Linearity was studied, bearing in mind the subsequent application of the method, i.e., to RTX under hospital conditions of use. The interval of the concentration to be tested was also adjusted to avoid further dilution of the RTX samples, so that they could be injected into the chromatographic system without the need for any previous manipulation that could bring about slight changes in the mAb. The clinical target concentrations were 1.0 mg/mL and 4.0 mg/mL, and linearity was therefore studied up to 5.0 mg/mL. Higher RTX concentrations gave wider chromatographic peaks. As a result, the injected volume was as small as possible, i.e., 1 μ L. Six concentration levels with four independent replicates for each one were used to determine the calibration function, as described above in the “Materials and methods” section. Once the LOD and the LOQ had been calculated, the working range was established as between 0.06 mg/mL and 5 mg/mL, with the LOQ being the lowest concentration in this range. The results for the intercept (a), the slope (b), the coefficient of determination (R^2), and the probability of a lack-of-fit (P_{LOF} -value, %), which were used to check the linearity, are summarized in Table 1. The R^2 value obtained and the results of the lack-of-fit test both provided evidence of the acceptable fit of the data to the estimated regression line. Considering all of these facts, we concluded that the linearity of the response of the detector under the

selected conditions for determining RTX had successfully been demonstrated.

The retention time of RTX was estimated from 40 chromatograms of RTX standard samples obtained at different concentrations and on different days, in order to investigate all possible sources of variation in the measurement of the retention time. The average retention time calculated in this way was 7.6 min with an SD of 0.08 min, which means that, for a confidence level of 99.5 % ($t=2.704$, $n=40$), the retention time interval of RTX was estimated as 7.6 ± 0.2 min.

The LOD and LOQ values were 0.019 and 0.060 mg/mL, respectively, indicating satisfactory method performance for low concentrations, although this was not a critical aspect for the intended purpose. The y -intercept value of the regression model was 29 % less than the response absorbance obtained for the analyte at the LOQ, and even less for the analyte at the target concentration [27].

In addition, the intercept was not significant, since the corresponding P -values were more than 5 % (see Table 1). Both of these requirements—a null intercept and linearity of

Table 1 Analytical parameters

Parameter	Value
Intercept (a)	107.4
Slope (b)	1.2
Standard deviation of the intercept $s(a)$	7.4
Probability of significance of the intercept P (%) ^b	60.2
Standard deviation of the slope $s(b)$	0.003
Coefficient of determination R^2	0.9998
Probability of a lack-of-fit P (%)	50.2
Linear range (mg/L)	60–5000
Quantification limit (mg/L, estimated from $SD(a)$)	60.2
Detection limit (mg/L, estimated from $SD(a)$)	19.8

Table 2 Precision and accuracy

Concentration tested (mg/mL)	Recovery ^a (%)	Precision RSD (%) ^b	
		Intraday	Interday (5 days)
0.5	99.6	0.4	0.8
1.0	99.9	1.0	0.9
5.0	100.1	0.6	0.8

^a Recovery value based on measurements of ten solutions prepared from the RTX standard

^b Relative standard deviation based on measurements of ten standard solutions

the calibration curve—are crucial to the selection of a proper quantification strategy in routine analysis. Under these conditions, the response factor (RF), defined as the ratio between the measured absorbance of a RTX-based medicine sample and its RTX concentration, can be considered to remain constant throughout the working range. To this end, one representative RTX standard was analyzed with each analytical batch, and quantification was carried out by applying the estimated RF value of the standard [35].

The accuracy and precision of the analytical method were established across its linear range as stated in the ICH Q2(R1) guideline [5]. As shown in Table 2, satisfactory results were obtained for the accuracy and for both the intraday and interday precisions of the method, expressed as recovery and RSD values, respectively. The intraday and interday RSDs were $\leq 1\%$ for all concentrations tested. The recovery values were, in all cases, close to 100% of the concentration checked, and the recovery fulfilled the acceptance criterion by falling within the range $100 \pm 3\%$.

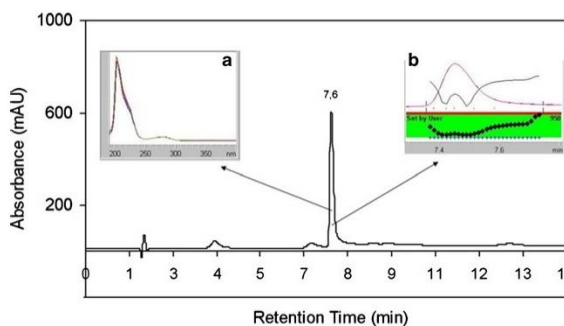
Forced degradation studies were performed (according to the ICH Q2(R1) guideline [4]) on MabThera[®] sample solutions to evaluate the specificity of the proposed method. This stress study was also carried out to gather information about

the degradation of the mAb under hospital conditions, as a means of evaluating the robustness of this RTX formulation against external factors. This is important because these kinds of therapeutic proteins are exposed to various types of stress during final administration, and could undergo more serious changes or degradation than more traditional drugs. The stress factors that were studied were those that could potentially affect stability. Furthermore, whereas stability testing requirements are defined in regulatory guidelines, the particular procedures for forced degradation studies of therapeutic proteins have not yet been standardized [36]. We therefore carried out the forced degradation studies described below.

Taking into account that the HPLC detector was a diode-array spectrophotometer (DAD) for assessing the degradation of the mAb, a spectral peak purity analysis was performed. A DAD is a powerful tool for determining peak purity. By comparing the absorption spectra from chromatographic peaks of fresh standard samples and stressed samples, we were able to identify degradation/modification in the mAb. This analysis therefore offers an attractive alternative to using a mass spectrometric detector to assess peak purity, due to its cost/benefits and simplicity. These numerical methods for calculating similarity based on the correlation coefficient are also considered to be suitable for assessing the degree of similarity between protein absorption spectra [37].

The heterogeneity of mAbs is well known [38]; this fact has been verified for RTX through our ongoing research of this mAb using cation exchange chromatography. This heterogeneity meant that the recorded spectra from the chromatographic peaks of a fresh standard sample of RTX were not identical (Fig. 1e), with the main dissimilarity observed between approximately $\lambda = 220$ and $\lambda = 235$ nm. As a result of these slight spectral variations, peak purity analysis indicated impurities in the chromatographic RTX peak when the conventional value of 99.5%, the default value for the ChemStation software, was used as the reference similarity factor [31]. We then tested a higher value of the similarity

Fig. 2 Chromatogram of an RTX sample submitted to thermal stress. (a) UV absorption spectra recorded at the chromatographic peak. (b) Results from the peak purity analysis, using 95.0% as the similarity factor



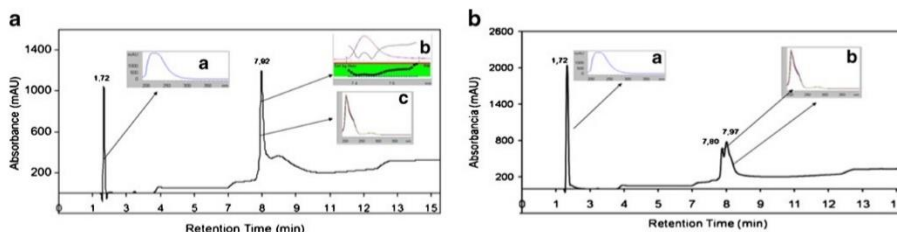


Fig. 3a–b Chromatograms of RTX samples subjected to weak (a) and strong (b) oxidative stress. UV absorption spectra recorded at the chromatographic peaks are also shown (a)a, (a)c, (b)a, (b)b). Peak purity analysis setting similarity factor at 95 % (a)b

factor which indicated that the RTX chromatographic peaks of fresh standard samples were pure. The similarity function was a representation of the determination coefficient between the average spectrum and all of the spectra recorded for the peak at each wavelength. Therefore, the similarity function had to be lowered to 99.0 %. This new similarity factor value was then used to test peak purity in the degradation studies. Spectral peak purity was only assumed, i.e., there was no detected significant modification compared with the RTX standard if the similarity function calculated for the corresponding chromatographic peak was higher than 99.0 %.

The results obtained from the degradation studies when the concentration tested was 1.0 mg/ml were difficult to interpret. Therefore, only the results for the more concentrated RTX solution are discussed below (4.0 mg/ml).

Thermal stress was evaluated for a temperature of 50 °C, which is considered the maximum temperature that samples could be exposed to accidentally in hospital. When medicinal samples were subjected to this temperature for 24 h, only slight modifications were observed; the chromatograms for the stressed samples were similar to those for the reference sample. No unknown chromatographic peaks were found. The recovery values were close to 100 % for all of the samples we analyzed (Fig. 2). Nevertheless, peak purity was not confirmed when we performed the proposed analysis described above, because the similarity function was smaller than the similarity factor of 99.0 %. If the mAb underwent conformational

changes such as unfolding or partial unfolding at this temperature, as described in the literature [38], these were not reflected in the chromatograms. This means that these changes did not affect the physicochemical process associated with the chromatographic column, although slight modifications to the absorbance spectra did occur. The similarity of the spectra recorded for the RTX peak was still high (Fig. 2a), with a similarity function that was higher than the similarity factor of 95.0 % (Fig. 2b)—already considered a good indicator that the same species produced the spectra [31].

We also studied the ionic strength, as the medicinal samples are diluted in NaCl 0.9 % for clinical administration. Similar behavior was obtained when the sample was submitted to ionic stress—there were no changes in the chromatogram as compared with that of a standard RTX sample, and only slight dissimilarities in the UV absorption spectra (the similarity function was higher than the similarity factor of 95.0 %). Again, the recovery of the stressed samples was close to 100 % compared to a reference sample with the same concentration.

Another condition that is typically studied is exposure to light. This is because therapeutic proteins are exposed to light in various situations, including administration of the drug to the patient [39]. The chromatogram indicated no degradation products, as there were no new chromatographic peaks or deformed RTX chromatographic peaks. Even with a recovery of around 100 % compared to the reference sample, modifications must have occurred to the RTX because the purity of the peak was

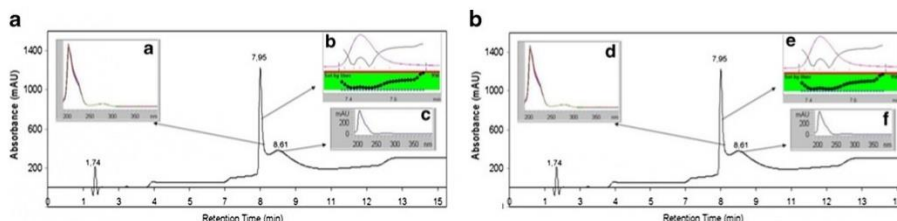


Fig. 4a–b Chromatograms of RTX samples submitted to weak (a) and strong (b) acid stress. UV absorption spectra recorded at the chromatographic peaks are also shown. (a)a, (a)c, (b)d, (b)f). Peak purity analysis setting similarity factor at 95 % (a)b, (b)e

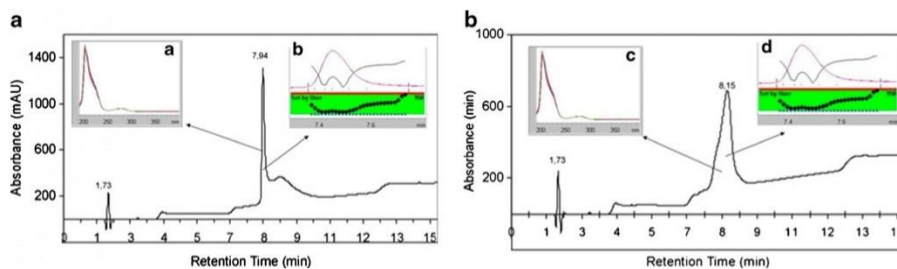


Fig. 5a–b Chromatograms of RTX samples submitted to weak (a) and strong (b) base stress. UV absorption spectra recorded at the chromatographic peaks are also shown. (a)c, (b)c. Peak purity analysis setting similarity factor at 95 % (a)d, (b)d

not confirmed by the analysis. The modifications might be associated with the light-induced oxidation of three aromatic amino acids: Trp, Tyr, and Phe [40], as often described for proteins subjected to light-induced stress. Discoloration of high-concentration formulations due to Trp oxidation has also been described, particularly for IgG [41]. However, the color of the medicinal solution remained unchanged after the application of UV-light stress. Minor modifications such as oxidation and deamidation of specific amino acids produce slight differences in the hydrophobicity relative to that of the intact RTX, and they cannot be determined by (RP)HPLC/DAD. A combination of SEC-HPLC and (RP)HPLC-MS has been proposed as a means to determine tryptophan oxidation, but the intact mAb was not analyzed by (RP)HPLC-MS; deglycosylated and reduced samples were used to obtain mAb light and heavy chains with lower protein molecular masses [16]. Although the formation of aggregates is described as occurring more commonly under thermal stress [36] due to unfolding processes that lead to other degradation reactions such as aggregate formation, preliminary data on RTX exposed to UV-light stress obtained by us using SEC-DAD suggest that aggregate formation occurs when the samples are stressed using UV light. This would indicate that the aggregates cannot be separated on the column, but the changes were detected by the peak purity analyses performed, and so the modification was detected. More research is currently being conducted on this aspect.

Oxidation and acid and base stress studies were mainly performed to create degradation products, since these conditions are not expected to affect RTX samples when they are being handled prior to administration. In fact, all three of these degradation conditions produced significant decreases in the area of the chromatographic peak of RTX. However, the loss was not quantified in any of the cases because the shape and retention time indicated very significant degradation of the intact RTX.

RTX samples submitted to oxidative stress showed modifications under both stressed conditions—when 3.3 % (v/v) or 33.3 % (v/v) of a solution of 1 % (v/v) H₂O₂ was used (Fig. 3). As expected, increasing the percentage of the oxidative medium increased the damage caused to RTX. It is well known that methionine (Met) is one of the amino acids most susceptible to oxidation. The result of the oxidation of Met is a sulfoxide group, which makes the side chain of the Met more polar, meaning that we were able to assign the peak that eluted earlier (at 1.7 min in both chromatograms) to a degraded RTX containing oxidized Met. This peak was not observed when medicinal samples were stressed with light or temperature, although the oxidation of Met was reported for human IgG1 (such as RTX) when it was incubated with *tert*-butyl hydroperoxide and exposed to intense light or a high temperature [42, 43]. The chromatographic peak at 7.9 min could be attributed to oxidative modification of the aromatic amino acids Trp, Tyr, and Phe, similar to what was observed when samples were stressed with light. Changes

Table 3 Results for the robustness of the method

Gradient variation (%)B	T (°C)	Flow	Retention	S ^a	N ^b	K ^c
30–60	70	1	7.481	0.77	44578	3.98
30–60	65	1	7.576	0.63	25754	3.38
30–60	65	0.9	7.543	0.63	26585	3.29
30–60	65	1.1	7.543	0.64	24542	3.37
30–60	70	0.9	7.419	0.70	27659	3.23
30–60	70	1.1	7.432	0.70	29285	3.32
25–55	70	1	8.472	0.63	24784	3.87
35–65	70	1	6.992	0.62	42319	3.03

^a Symmetry factor

^b Theoretical plates

^c Capacity factor

Table 4 Results for the suitability of the system

RTX standard sample	Retention time	Symmetry factor	Theoretical plates	Capacity factor
4 mg/mL	7.5	0.7	33437	3.4
1 mg/mL	7.5	0.7	35365	3.3

affected the UV absorption spectra in a similar way, since the purity function was greater than the similarity factor of 95 %.

One important factor in the deamidation of mAbs is the pH. In fact, the deamidation of Asn and Gln residues by direct hydrolysis catalyzed at a pH of less than 4 has already been described. In neutral to basic solutions (pH 6 and above), the reaction changes to an intramolecular cyclization reaction—more so for Asn than Gln. The deamidation of Asn predominates because a five-membered ring (called succinimide or Asu) is formed in the mechanism, and this ring is more stable than the six-membered ring that is formed during Gln deamidation [39]. This intermediate is readily hydrolyzed in aqueous solution to Asp and isoAsp. Therefore, Asn deamidation produces two degradation products at the site of the original Asn residue, which implies an increase in polarity. Nevertheless, we obtained similar chromatograms for the acid-stressed medicinal samples (Fig. 4), with no increase in polar degradation products observed. The pH values of the medicinal samples stressed by weak and strong acids were 5.9 and 2.7, respectively, so Asn deamidation would have been expected. However, modifications to intact RTX caused the retention time to shift slightly towards greater hydrophobicity (from 7.6 to 7.9 min, the upper limit of the interval for the RTX retention time established above), and there was significant deformation of the base line, with a peak at 8.6 min. For the basic stress study (Fig. 5), the chromatograms obtained when weak conditions were tested (pH 10.9) (Fig. 5a) were similar to those obtained for acid stress (Fig. 4), and they were very similar to those noted for medicinal samples submitted to weak acid stress (Fig. 4a). This could imply similar modification patterns. Medicinal samples submitted to strongly basic conditions (pH 12.4) exhibited significant degradation (Fig. 5b), with a shift in retention time towards increased hydrophobicity (8.1 min).

From the point of view of the specificity of the proposed (RP)HPLC/DAD method, the results from the degradation study indicated that the degraded/modified RTX could not be chromatographically separated from standard RTX, and the different forms of RTX eluted at similar retention times. Efforts were made throughout the stress study to chromatographically separate these different forms by modifying the gradient of the mobile phase, testing both more and less polar phases, but the relatively slight differences in polarity of the degraded/modified forms of RTX prevented us from eluting them separately. Thus, it was not appropriate to quantify the loss of intact RTX. Nevertheless, the peak purity analysis proposed here could be used to detect slight modifications in fresh intact RTX samples. If the peak purity

analysis is performed as explained above, the method is specific, since it was possible to detect slight RTX modifications. In this way, intact RTX quantification can be performed reliably. Based on current research (ongoing manuscripts), we can also say that—even when using analytical cation exchange chromatography, which is the best option for chromatographically detecting isoforms—the different isoforms of the monoclonal antibodies are not completely separated, and the chromatographic peaks are not well resolved; the changes in the isoforms are usually “quantified” by measuring the heights of these unresolved chromatographic peaks. Due to the detection of these isoforms in different but unresolved chromatographic peaks, analytical RP chromatography is highly advantageous from a quantification perspective, since it is possible to quantify the intact mAb in a single and well-defined chromatographic peak. Also, when SEC chromatography (where the isoforms are eluted in a single chromatographic peak because the chromatographic column does not have

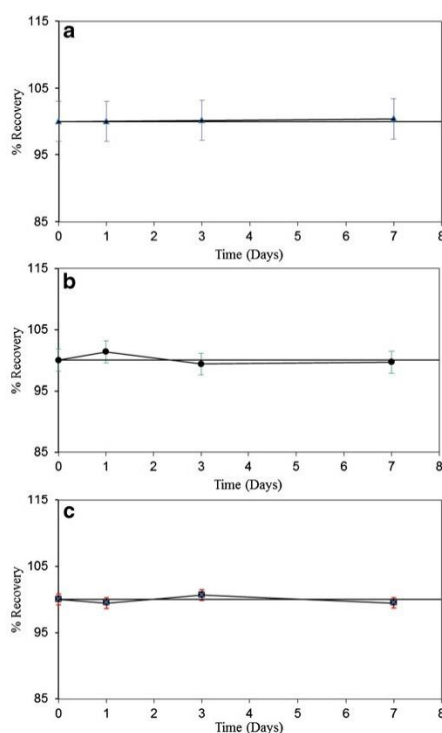


Fig. 6a–c Long-term study of RTX sample solutions with concentrations of 0.5 mg/ml (a), 1 mg/ml (b), and 4 mg/ml (c), as prepared through the dilution of MabThera® in NaCl 0.9 %

the resolution to discriminate the mass differences associated with the small mass changes resulting from deamidation, oxidation, etc.) is used, quantification of the intact mAbs could be performed using a single and well-defined chromatographic peak but with less sensitivity than that achievable using RP chromatography.

Therefore, this can be considered a stability-indicating technique, as structural modifications can be detected (but not quantified). This means that the method partially, but not completely, fulfills the ICH guidelines.

The results of the study performed to evaluate the robustness of the proposed method are summarized in Table 3. As expected, the composition of the mobile phase is the most important influence on the robustness. Indeed, when the polarity of the mobile phase is increased, intact RTX elutes at a shorter retention time and overlaps with a peak 6.8 min from the base line. This is why the number of theoretical plates was highest when the mobile phase contained 35 % phase A (see Table 3). Although a column temperature of <60 °C caused notable deformation of the chromatographic peak of intact RTX and prevented it from being analyzed, the proposed method is robust at column temperatures of >65 °C.

System suitability testing was conducted using RTX standard samples at the targeted concentrations, i.e., 1.0 and 4.0 mg/ml. Table 4 summarizes the results of this study. The suitability of the analytical system (instrument+method+operator) was demonstrated, as the chromatographic parameters agreed with previously established values (see the "Materials and methods" section). In addition, the reproducibility of the injection volume (RSD 0.05 % for 1 μ L) was less than that established in the criteria (RSD \leq 1 %).

Application of the method to determine RTX in samples prepared under hospital conditions in a long-term study

The proposed method was used to quantify and assess RTX samples under hospital conditions in an ongoing long-term stability study. The study was therefore conducted at three concentrations: 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, and 4 mg/ml. Other authors [29] have recommended that stability testing should be carried out at concentrations that are representative of the final product. In the case of RTX, this would be a wide range of concentrations, as stated in the product information form for the medicine (1–4 mg/ml) [6]. This study was performed in the context of a wider project that seeks to implement and validate analytical methods and protocols to characterize mAbs, with an additional objective being to extend, if possible, the shelf lives of these surplus biotechnological products used in hospital pharmacy departments.

Figure 6 shows the evolution of the RTX concentration for the sample stored refrigerated at 4 °C. These results show that the RTX concentrations in diluted samples at the chosen concentrations did not change significantly during the first week.

All of the results were within ± 2 % of the initial concentrations. The peak purity analysis indicated that there was no modification to the intact RTX over this period (1 week).

The frozen RTX sample was analyzed within a month of its preparation, and the results indicated no modification in the intact mAbs (purity function higher than 99.0 %) and a recovery of 100.5 % of its initial concentration. Thus, it could also be inferred that RTX is stable when frozen/thawed at these conditions.

Conclusion

In this paper, a (RP)HPLC/DAD method for the determination of a marketed intact mAb, namely rituximab (RTX), was proposed. The method was developed and validated following the ICH guidelines for biotechnological products, which indicate that validation should be performed in accordance with the ICH guideline *Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. The method developed can be considered stability-indicating, as it fulfilled all of the relevant requirements. In terms of the specificity of the method, although slightly modified intact mAb could not be chromatographically separated from the unmodified intact RTX, the modifications could be detected by applying the proposed peak purity analysis procedure, so the method can be used to test mAb stability in both quality control processes and long-term stability studies. To the best of our knowledge, this is the first study to propose rigorous (RP)HPLC methods for quantifying intact mAbs in accordance with the requirements of the international guidelines for biopharmaceutical products (ICH). Despite the difficulties inherent in the analysis of intact mAbs, this work proves that it is possible to develop and validate (RP)HPLC/DAD methods for quantifying them. In addition, the method was applied to quantify intact RTX in a stability study, thus demonstrating its ability to be used in this field, as well as in mAb quality control processes. This work is part of a wider project that aims to propose rigorous analytical methods and validated protocols for the full characterization of therapeutic mAbs. This method represents one of the analyses needed to characterize mAbs.

Acknowledgements Financial support was provided by the Project FIS:PI10/00201 (National Research Program, Instituto Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Spain). The authors would like to thank the Hospital Pharmacy Unit of the University Hospital San Cecilio for kindly supplying all of the medicinal samples and the Alejandro Otero Biomedical Research Foundation (FIBAO) for the support they provided during the course of this research.

References

1. Strohl WR (2009) In: Zhiqiang A (ed) *Therapeutic monoclonal antibodies: from bench to clinic*. Wiley, Hoboken

2. Crommelin DJA, Stom G, Verrijck R, de Leede I, Jiskot W, Hennik WE (2003) Shifting paradigms; biopharmaceuticals versus low molecular weight drugs. *Int J Pharm* 266:3–16
3. Staub A, Guillaume D, Schappler J, Veuthey JL, Rudaz S (2011) Intact protein analysis in the biopharmaceutical field. *J Pharm Biomed Anal* 55:810–822
4. ICH Secretariat (1999) International Conference on Harmonization (ICH) guideline Q6B: specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products. ICH Secretariat, Geneva
5. ICH Secretariat (2005) International Conference on Harmonization (ICH) guideline Q2(R1): validation of analytical procedures: text and methodology. ICH Secretariat, Geneva
6. European Medicines Agency (2005) Scientific discussion (of rituximab). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000165/WC500025817.pdf. Accessed 26 March 2013
7. Cheung MC, Haynes AE, Meyer RM, Stevens A, Imrie KR (2007) Rituximab in lymphoma: a systematic review and consensus practice guideline from Cancer Care Ontario. *Cancer Treat Rev* 33:161–176
8. Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, Stevens RM, Shaw T (2004) Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 350:2572–2581
9. Paul M, Vieillard V, Jaccoulet E, Astier A (2012) Long-term stability of diluted solutions of the monoclonal antibody rituximab. *Int J Pharm* 436:282–290
10. Hampson G, Ward TH, Cummings J, Bayne M, Tutt A, Cragg MS, Dive C, Ildige TM (2010) Validation of an ELISA for the determination of rituximab pharmacokinetics in clinical trials subjects. *J Immunol Meth* 360:30–38
11. Liu XF, Wang X, Weaver RJ, Calliste L, Xia C, He YJ, Chen LS (2012) Validation of a Gyrolab™ assay for quantification of rituximab in human serum. *J Pharm Toxicol Meth* 65:107–114
12. Grotefend S, Kaminski L, Wroblewitz S, El Deeb S, Kühn N, Reichl S, Limberger M, Watt S, Wätzig H (2012) Protein quantitation using various modes of high performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 71:127–138. doi:10.1016/j.jpba.2012.08.024
13. Maple L, Lathrop R, Bozich S, Hamman W, Tacey R, Kelley M, Danilkovitch-Miagkova A (2004) Development and validation of ELISA for herceptin detection in human serum. *J Immunol Methods* 296:169–182
14. Stemmler HJ, Schmitt M, Willems A, Bernhard H, Harbeck N, Heimann V (2007) Ratio of trastuzumab levels in serum and cerebrospinal fluid is altered in HER2-positive breast cancer patients with brain metastases and impairment of blood-brain barrier. *Anti-cancer Drugs* 18:23–8
15. Chelius D, Rehder DS, Bondarenko PV (2005) Identification and characterization of deamidation sites in the conserved regions of human immunoglobulin gamma antibodies. *Anal Chem* 77:6004–6011
16. Yang J, Wang S, Liu J, Raghani A (2007) Determination of tryptophan oxidation of monoclonal antibody by reversed phase high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1156:174–182
17. Gadgil HS, Pipes GD, Dillon TM, Treuheit MJ, Bondarenko PV (2006) Improving mass accuracy of high performance liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass. *J Am Soc Mass Spectrom* 7:867–72
18. Valeja SG, Kaiser NK, Xian F, Hendrickson CL, Rouse JC, Marshall AG (2011) Unit mass baseline resolution for an intact 148 kDa therapeutic monoclonal antibody by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal Chem* 83:8391–8395
19. Tsybin YO, Fomelli L, Stoermer C, Luebeck M, Parra J, Nallet OS, Wurm FM, Hartner R (2011) Structural analysis of intact monoclonal antibodies by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Anal Chem* 83:8919–8927
20. Fomelli L, Damoc E, Thomas PM, Kelleher NL, Aizikov K, Denisov E, Makarov A, Tsybin YO (2012) Analysis of intact monoclonal antibody IgG1 by electron transfer dissociation Orbitrap FTMS. *Mol Cell Proteomics* 11:1758–1767
21. Damena CW, Rosing H, Schellens JH, Beijnen JH (2008) Quantitative aspects of the analysis of the monoclonal antibody trastuzumab using high-performance liquid chromatography coupled with electrospray mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 46:449–455
22. Dillon TM, Bondarenko DV, Ricci MS (2004) Development of an analytical reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry method for characterization of recombinant antibodies. *J Chromatogr A* 1053:299–305
23. Dillon TM, Bondarenko PV, Rehder DS, Pipes GD, Kleemann GR, Ricci MS (2006) Optimization of a reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry method for characterizing recombinant antibody heterogeneity and stability. *J Chromatogr A* 1120:112–120
24. Beck A, Waagner-Rousset E, Ayoub D, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianferani S (2013) Characterization of therapeutic antibodies and related products. *Anal Chem* 85:715–736
25. European Medicines Agency (2012) Annex I: Summary of product characteristics. (re: MabThera). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000165/WC500025821.pdf. Accessed 25 March 2013
26. Analytical Methods Committee (1994) Is my calibration linear? *Analyst* 9:2363–2366
27. CDER (1994) Reviewer guidance: validation of chromatographic methods. Center for Drug Evaluation and Research (CDER; US FDA), Rockville
28. Shabir GA (2003) Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J Chromatogr A* 987:57–66
29. ICH Secretariat (1996) International Conference on Harmonization (ICH) guideline Q5C: quality of biotechnological products: stability testing of biotechnological/biological products. ICH Secretariat, Geneva
30. Agilent Technologies (2013) Evaluating system suitability: CE, GC, LC and A/D ChemStation. Revisions: A.03.0x–A.08.0x. <http://www.chem.agilent.com/Library/Support/Documents/al0424.pdf>
31. Agilent Technologies (2003) Peak purity analysis in HPLC and CE using diode-array technology (publ. no. 5988-8647EN). Agilent, Waldbronn
32. Battersby JE, Snedecor B, Chen C, Champion KM, Riddle L, Vanderlaan M (2001) Affinity-reversed-phase liquid chromatography assay to quantitate recombinant antibodies and antibody fragments in fermentation broth. *J Chromatogr A* 927: 61–76
33. Beck A, Bussat MC, Zom N, Robillard V, Klinguer-Hamour C, Chenu S, Goetsch L, Corvaia N, Van Dorsselaer A, Haeuw JF (2005) Characterization by liquid chromatography combined with mass spectrometry of monoclonal anti-IGF-1 receptor antibodies produced in CHO and NS0 cells. *J Chromatogr B* 819:203–18
34. Chen Y, Mant CT, Hodges RS (2003) Temperature selectivity effects in reversed-phase liquid chromatography due to conformation differences between helical and non-helical peptides. *J Chromatogr A* 1010:45–61
35. Cuadros-Rodríguez L, Bagur-González MG, Sánchez-Viñas M, González-Casado A, Gomez-Saez AM (2007) Principles of analytical calibration/quantification for the separation sciences. *J Chromatogr A* 1158:33–46
36. Hawe A, Wiggenhom M, Van de Weert M, Garbe JH, Mahler HC, Jiskoot W (2012) Forced degradation of therapeutic proteins. *J Pharm Sci* 101:895–913

37. Teska BM, Li C, Winn BC, Arthur KK, Jiang Y, Gabrielson JP (2013) Comparison of quantitative spectral similarity analysis methods for protein higher-order structure confirmation. *Anal Biochem* 434:153–65
38. Liu H, Gaza-Bulseco G, Faldu D, Chumsae C, Sun J (2008) Heterogeneity of monoclonal antibodies. *J Pharm Sci* 97:2426–47
39. Kerwin BA, Remmele RL Jr (2007) Protect from light: photodegradation and protein biologics. *J Pharm Sci* 96:1468–1479
40. Manning MC, Chou DK, Murphy BM, Payne RW, Katayama DS (2010) Stability of protein pharmaceuticals: an update. *Pharm Res* 27: 544–574
41. Qi P, Volkin DB, Zhao H, Nedved ML, Hughes R, Bass R (2009) Characterization of the photodegradation of a human IgG1 monoclonal antibody formulated as a high-concentration liquid dosage form. *J Pharm Sci* 98:3117–3130
42. Shen JF, Kwong YM, Keck GR, Harris JR (1996) The application of *tert*-butylhydroperoxide oxidization to study sites of potential methionine oxidization in a recombinant antibody. *Tech Protein Chem* 7: 275–284
43. Lam XM, Yang JY, Cleland JL (1997) Antioxidants for prevention of methionine oxidation in recombinant monoclonal antibody H ER2. *J Pharm Sci* 86:1250–1255

