



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**CARACTERIZACIÓN Y COMPARABILIDAD DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**MARIANA PATRICIA MIRANDA HERNÁNDEZ**



**CIUDAD DE MÉXICO**

**2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:           MARÍA DEL SOCORRO ALPIZAR RAMOS**

**VOCAL:                   JUAN MANUEL RODRÍGUEZ**

**SECRETARIO:           LUIS FRANCISCO FLORES ORTIZ**

**1er. SUPLENTE:        ERNESTINA HERNÁNDEZ GARCÍA**

**2º SUPLENTE:           MARÍA ELENA BRAVO GÓMEZ**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**PROBIOMED S.A. DE C.V.**

**ASESOR DEL TEMA:**

**SUSTENTANTE:**

# CARACTERIZACIÓN Y COMPARABILIDAD DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL

## 1. Índice

|  |     |
|--|-----|
| 2. Introducción                          | 3   |
| 2.1 Objetivos secundarios                | 6   |
| 3. Antecedentes                          | 7   |
| 3.1 Medicamentos biocomparables          | 7   |
| 3.2 Caso de estudio                      | 12  |
| 3.3 Metodologías analíticas              | 14  |
| 3.3.1 Identidad y estructura             | 14  |
| 3.3.2 Heterogeneidad                     | 19  |
| 3.3.3 Función biológica                  | 22  |
| 4. Metodología experimental              | 26  |
| 4.1 Identidad y estructura               | 26  |
| 4.2 Heterogeneidad                       | 29  |
| 4.3 Función biológica                    | 31  |
| 5. Resultados y discusión                | 33  |
| 5.1 Identidad y estructura               | 33  |
| 5.1.1 Identidad química                  | 34  |
| 5.1.2 Estructura                         | 43  |
| 5.2 Heterogeneidad                       | 54  |
| 5.2.1 Heterogeneidad de carga            | 55  |
| 5.2.2 Heterogeneidad de glicosilación    | 76  |
| 5.3 Propiedades funcionales              | 82  |
| 5.3.1 Propiedades de unión               | 82  |
| 5.3.2 Propiedades funcionales biológicas | 89  |
| 6. Conclusiones                          | 94  |
| 7. Referencias bibliográficas            | 95  |
| 8. Anexos                                | 101 |

## 2. Introducción

En los últimos años, los avances en el campo de la biotecnología han permitido el desarrollo de nuevas tecnologías para la producción de biomoléculas que pueden utilizarse para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Es así como surgieron los medicamentos bioterapéuticos utilizados para el tratamiento de enfermedades crónico degenerativas y autoinmunes.

El creciente desarrollo de la industria de las proteínas recombinantes, así como las implicaciones que esto tiene, por ejemplo: las mejoras en proceso, aumentos en la escala y establecimiento de nuevos sitios de fabricación; aunado a la heterogeneidad naturalmente presente en este tipo de medicamentos bioterapéuticos, dan origen a una variabilidad en cada uno de sus atributos medibles, observada lote a lote.

Por ello, es de especial interés para las agencias regulatorias establecer lineamientos que garanticen que la variabilidad observada entre un producto antes y después del cambio, no tenga un impacto en la seguridad y eficacia del medicamento. Consecuentemente, surgieron lineamientos que proponen un ejercicio de comparabilidad fisicoquímica y biológica para determinar si el producto post-cambio es suficientemente similar al producto ya aprobado, y si hubo algún impacto sobre su identidad, pureza o potencia<sup>[1, 2]</sup>. De esta manera, dichas guías han sentado las bases para el establecimiento de un marco regulatorio para la demostración de biosimilitud entre un medicamento biosimilar propuesto y su medicamento de referencia. En el caso de México, los estudios y pruebas necesarias para demostrar la biocomparabilidad entre un medicamento biotecnológico de prueba y su medicamento de referencia se encuentran descritas en la Norma Oficial

Mexicana NOM-257-SSA1-2013 “En materia de medicamentos biotecnológicos”<sup>[3]</sup> y la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013 “Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad”<sup>[4]</sup>.

En dichas normas, que se suman al consenso internacional, se establece que si los estudios de comparabilidad fisicoquímica y funcional muestran un alto grado de similitud entre el medicamento biotecnológico de prueba y el medicamento de referencia, mayor será el soporte científico de un diseño selectivo y específico para estudios clínicos y preclínicos subsecuentes.

El objetivo del presente estudio es realizar un ejercicio de comparabilidad entre un anticuerpo monoclonal biosimilar y su medicamento de referencia mediante un ejercicio exhaustivo, centrado en la caracterización de sus propiedades fisicoquímicas: estructura primaria, secundaria, terciaria, cuaternaria y modificaciones postraduccionales<sup>[5, 6, 7]</sup>. Así, en el supuesto de encontrar un alto grado de similitud en el ejercicio de caracterización fisicoquímica, será posible inferir que su respuesta biológica será igualmente comparable, ya que los atributos fisicoquímicos se encuentran íntimamente relacionados a la actividad biológica del medicamento.

## 2.1 Objetivos secundarios:

- Caracterización de la estructura y composición, mediante el análisis de la estructura primaria y estructura de orden superior, de forma comparativa entre un anticuerpo monoclonal biocomparable y su medicamento de referencia.
- Caracterización de la heterogeneidad de carga, polaridad y glúcidos entre el medicamento de referencia y el medicamento biocomparable, mediante el empleo de diferentes metodologías analíticas.
- Caracterización de las propiedades funcionales, que incluyen la afinidad a su blanco terapéutico, afinidad a receptores involucrados en sus funciones efectoras y ensayos de potencia *in vitro* que evalúan los distintos mecanismos de acción descritos para dicho anticuerpo, mismos que serán correlacionados con la información obtenida de la caracterización de los atributos fisicoquímicos.

## 3. Antecedentes

### 3.1 Medicamentos biocomparables

Los medicamentos desarrollados utilizando tecnología del ADN recombinante han dado origen a las proteínas bioterapéuticas, utilizadas desde principios de los 1980s para el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas.

---

Las enfermedades no transmisibles (ENT) se han convertido en las principales causas de muerte a nivel mundial, causando más muertes que todas las otras causas de muerte combinadas (transmisibles, maternas, maternas-perinatales, nutricionales y lesiones), alcanzando proporciones epidémicas. El 63% de las muertes que se produjeron a nivel mundial en 2008, fueron causadas por ENTs, principalmente: enfermedades cardiovasculares (48%), cáncer (21%), enfermedades respiratorias crónicas (11.9 %) y diabetes (3.7%).

A medida que la población envejece, las muertes anuales causadas por ENTs seguirán aumentando en todo el mundo, la OMS prevé que aumenten en un 15% a nivel mundial entre 2010 y 2020. Ello representa un aumento en los costos para los sistemas de salud, un análisis económico sugiere que cada 10% de aumento en la incidencias de ENTs se asocia con una tasa 0.5% más baja de crecimiento económico anual.<sup>[8]</sup>

---

Las proteínas bioterapéuticas, a diferencia de las moléculas pequeñas obtenidas mediante síntesis química, son moléculas que presentan una variabilidad intrínseca. Esta heterogeneidad surge ya que a pesar de tener la misma secuencia de aminoácidos, las proteínas bioterapéuticas están sujetas a sufrir distintas modificaciones post-traduccionales, tales como glicosilación, acetilación, fosforilación, isomerización, etc.; a lo largo de su ciclo de vida, mismas que pueden tener un impacto en su actividad biológica<sup>[9]</sup>.



Aunque las tecnologías desarrolladas para la producción de este tipo de medicamentos son capaces de proporcionar un alto grado de homogeneidad y uniformidad, la fabricación de proteínas bioterapéuticas implica procesos que son difíciles de reproducir, y aunado a la heterogeneidad intrínseca de éstas moléculas, son la causa de la observada variabilidad lote a lote.

Asimismo, cambios en el proceso de fabricación durante el ciclo de vida de un medicamento bioterapéutico son comunes en la industria biofarmacéutica, debido a escalamientos, optimización de procesos y transferencias a nuevas plantas de fabricación. En consecuencia, ciertos atributos de calidad son susceptibles de cambiar, pudiendo tener un efecto en la seguridad y eficacia de un medicamento bioterapéutico<sup>[10]</sup>. Para ello, ejercicios de comparabilidad fueron desarrollados para determinar si el producto post-cambio es suficientemente similar al producto ya aprobado, y si hubo algún impacto sobre su identidad, pureza o potencia<sup>[1]</sup>. Así, desde 1996, la FDA (Food and Drug Administration) ha aprobado cambios en procesos de fabricación de productos bioterapéuticos con base en la demostración de la comparabilidad del producto antes y después del cambio, tomando en consideración criterios de calidad y pruebas analíticas, sin la necesidad de estudios pre-clínicos o clínicos adicionales.

El vencimiento de las patentes de la primera generación de productos bioterapéuticos dio origen al desarrollo de los medicamentos biosimilares, cuyos beneficios residen en la disminución de costos de los tratamientos, mayor abastecimiento a la demanda de estos productos, mayor competencia en el mercado e incentivación a la innovación. La EMA (European Medicine Agency) define estos productos como aquellos medicamentos bioterapéuticos que han demostrado ser similares en

términos de calidad, seguridad y eficacia a un medicamento de referencia, al cual se le hubo concedido licencia de comercialización<sup>[11]</sup>.

Diversas agencias regulatorias han utilizado los principios científicos para la demostración de comparabilidad entre un producto antes y después de cambios en su proceso de fabricación, como base para establecer los lineamientos para la demostración de biosimilitud entre un medicamento biosimilar propuesto y su medicamento de referencia<sup>[1, 5, 6, 7, 12, 13, 14, 15]</sup>.

El objetivo de realizar un estudio de comparabilidad entre un producto biosimilar y su medicamento de referencia es generar información que de soporte para la demostración de biosimilitud, incluyendo una evaluación de los posibles efectos de las diferencias observadas entre los atributos de los productos. Ello, con la finalidad de demostrar que éstas no tienen un impacto en el perfil farmacocinético y farmacodinámico, así como en la seguridad del medicamento biosimilar propuesto. Finalmente, si los estudios de comparabilidad estructural y funcional muestran diferencias menores entre el medicamento biosimilar propuesto y el medicamento de referencia, mayor será el soporte científico de un diseño selectivo y específico para estudios posteriores en animales y/o ensayos clínicos para la demostración de biosimilitud.

Para una proteína bioterapéutica, el ejercicio de comparabilidad, que proporciona una comprensión global de la molécula, inicia generalmente con una caracterización fisicoquímica exhaustiva para evaluar aquellos atributos de calidad que tienen un impacto en la seguridad y eficacia del medicamento, reconocidos por el fabricante del medicamento de referencia o por la comunidad científica en general. Las técnicas analíticas en el estado del arte utilizadas para la evaluación de la

spropiedades fisicoquímicas de una proteína bioterapéutica se encuentran ampliamente descritas en la literatura, incluyendo publicaciones científicas, guías regulatorias y farmacopeas<sup>[16-18]</sup>.

---

La espectrometría de masas es una técnica analítica que genera información cualitativa y cuantitativa acerca de la composición atómica y molecular, así como de la estructura de compuestos orgánicos e inorgánicos. El científico Inglés J.J. Thomson fue el primero en desarrollar el primer espectrómetro de masas en 1912. Los espectros de masa se obtienen por conversión de los componentes de una muestra en iones gaseosos que se separan en función de su relación carga/masa ( $z$ ).

El análisis por espectrometría de masas fue restringido por un largo tiempo a moléculas pequeñas dado que, las biomoléculas, al ser compuestos polares de gran tamaño, no contaban con técnicas eficaces para su ionización y transferencia de la fase condensada a la fase gaseosa sin excesiva fragmentación. Sin embargo, en 2002, John Bennett y Koichi Tanaka recibieron el Premio Nobel de Química por el desarrollo de un método para el análisis por espectrometría de masas para biomoléculas. El electrospray (ES) y la ionización de desorción láser asistida por matriz (MALDI) son las técnicas de ionización responsables del análisis de las biomoléculas por espectrometría de masas. Gracias a ello, actualmente es posible utilizar la espectrometría de masas para la determinación de la masa molecular de un polipéptido o bien, sus características estructurales, incluyendo su secuencia de aminoácidos, sitios de unión y tipo de modificaciones postraduccionales.

---

Las técnicas analíticas deben ser seleccionadas con base en la naturaleza de la proteína que se pretende caracterizar, es decir, conocimientos sobre su estructura y heterogeneidad, así como aquellos atributos críticos para su actividad biológica. Adicionalmente, con la finalidad de entender la variabilidad lote a lote del medicamento biosimilar propuesto y el medicamento de referencia, es necesario que el ejercicio de comparabilidad se lleva a cabo utilizando varios lotes de ambos medicamentos. Si los atributos de calidad de un medicamento

biosimilar propuesto se encuentran dentro de los límites de variabilidad aceptados para el medicamento de referencia, entonces el medicamento biosimilar propuesto puede considerarse "con un alto grado de similitud" al medicamento de referencia.

Las proteínas exhiben generalmente conformaciones complejas tridimensionales absolutamente necesarias para su actividad funcional<sup>[19]</sup> (estructura terciaria y, en algunos casos, estructura cuaternaria), que dependen principalmente de su secuencia de aminoácidos, así como de las interacciones débiles que se forman entre ellos, como puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals, mismas que son sensibles a las condiciones del medio en el que se encuentre.

Por otro lado, las proteínas bioterapéuticas están sujetas a sufrir distintos tipos de modificaciones postraduccionales, desde su biosíntesis (glicosilación, proteólisis, cambios en la naturaleza química de un aminoácido), proceso de fabricación (glicación) y las condiciones de almacenamiento, que pueden conducir a ciertas vías de degradación tales como la oxidación, deamidación, o agregación<sup>[9]</sup>. Como todas estas variantes relacionadas con la proteína bioterapéutica (isoformas) pueden alterar sus propiedades funcionales, la identificación y determinación de los niveles relativos de estas variantes deben ser evaluados en los estudios de comparabilidad.

Finalmente, la actividad biológica y potencia de las proteínas bioterapéuticas puede ser evaluada *in vitro* mediante el uso de bioensayos y ensayos de unión. Si el mecanismo de acción es conocido para dicho biofármaco, en la medida de lo posible, uno o más de los ensayos funcionales que formen parte del ejercicio de comparabilidad deben reflejar estos mecanismos de acción. Adicionalmente, los ensayos

funcionales pueden ser utilizados como soporte para los resultados del análisis fisicoquímico, al mismo tiempo que investigar las consecuencias de las posibles diferencias observadas. Ello, dado que de una adecuada actividad biológica del producto, se puede inferir la integridad estructural de la proteína. De la misma manera, estos bioensayos normalmente son más sensibles que cualquier estudio clínico, por lo que es más fácil evidenciar las diferencias en la función biológica entre un medicamento biosimilar propuesto y el medicamento de referencia.

### **3.2 Caso de estudio**

Rituximab es una proteína bioterapéutica utilizada para el tratamiento de linfomas de células B que se une específicamente con el antígeno de membrana CD20, una fosfoproteína transmembranal no-glicosilada localizada en los linfocitos pre-B y B maduros, tanto en células normales como malignas, pero no en células progenitoras hematopoyéticas, pro-células B, células plasmáticas u otros tejidos normales. El antígeno CD20 es expresado en más del 95 % de todos los Linfomas No-Hodgkin (LNH) de células B. Aunque aún no se ha identificado su ligando natural, hay evidencia de que actúa como un canal de calcio y es un regulador de la proliferación y diferenciación de células B<sup>[20]</sup>. Este antígeno no se internaliza tras la unión del anticuerpo y no se desprende de la superficie celular; tampoco se encuentra libre en el plasma por lo que no hay riesgo de neutralización del anticuerpo. Todas estas características hacen de CD20 un excelente blanco para anticuerpos monoclonales como rituximab<sup>[20-22]</sup>.

Este anticuerpo monoclonal glicosilado obtenido mediante ingeniería genética, contiene regiones constantes que corresponden al isotipo G1

(IgG1) humano y secuencias de la región variable de las cadenas ligeras y cadenas pesadas murinas. Está compuesto de dos cadenas pesadas de 451 aminoácidos y dos cadenas ligeras de 213 aminoácidos, con un peso molecular de ~145 kDa<sup>[22]</sup>. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante dos puentes disulfuro y a su vez dos puentes disulfuro intercatenarios unen las dos cadenas pesadas. Adicionalmente, seis puentes disulfuro intracatenarios están formando los dominios de la inmunoglobulina de cada cadena pesada.

Esta proteína bioterapéutica se produce a partir de un cultivo en suspensión de células CHO (células de ovario de hámster chino, por sus siglas en inglés) y se purifica mediante diversas etapas cromatográficas y de filtración, incluyendo procedimientos específicos de inactivación y de eliminación viral. Durante su paso por el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, glúcidos complejos biantenarios son añadidos a un sitio conservado de glicosilación localizado en la región constante de la cadena pesada. También se han observado variantes no glicosiladas y monoglicosiladas en porcentajes menores. Por ello, este medicamento biotecnológico está compuesto por un grupo de isoformas que pueden distinguirse por sus diferencias en carga, masa, tamaño, forma, momento del dipolo molecular y punto isoeléctrico. Cada una de estas isoformas presenta una abundancia relativa que oscila, naturalmente, lote a lote de producción<sup>[10]</sup>.

A continuación se presentan los resultados obtenidos de un ejercicio de comparabilidad del biofármaco rituximab, incluyendo la verificación de la identidad química, caracterización de la estructura física, heterogeneidad y propiedades funcionales. El conjunto de técnicas analíticas utilizadas en el ejercicio de comparabilidad permiten determinar atributos inherentes a la calidad del producto, que son

corroborados mediante el uso de técnicas de naturaleza ortogonal. Asimismo se presentan los gráficos en los que será posible observar los resultados obtenidos para los diferentes atributos de calidad del medicamento biocomparable y el medicamento de referencia. Con estos gráficos será posible conocer la distribución y oscilación para los valores de cada uno de los atributos evaluados y determinar su convergencia o superposición con respecto del medicamento de referencia.

### **3.3 Metodologías Analíticas**

A fin de mostrar comparabilidad entre un medicamento biocomparable con respecto de un medicamento innovador, que se toma como referencia, debe evidenciarse similitud entre cada uno de sus atributos, a saber: químicos, fisicoquímicos y funcionales.

Por ello cobra relevancia el uso de una plataforma analítica que incluya el uso de técnicas en el estado del arte, ampliamente descritas en la literatura, incluyendo publicaciones científicas, guías regulatorias, y farmacopeas<sup>[16-18]</sup>. Asimismo, el uso de técnicas analíticas que utilicen diferentes principios fisicoquímicos o biológicos para evaluar un mismo atributo (ortogonales), permiten reducir la posibilidad de obviar diferencias, por lo que dan una mayor certeza a los resultados obtenidos.

---

#### **3.3.1 Identidad y estructura**

Los análisis de identidad de un anticuerpo monoclonal, como rituximab, están dirigidos al estudio de su estructura primaria, es decir, la composición y secuencia de aminoácidos. Esto se logra mediante la evaluación de distintos atributos, como la determinación de la masa exacta, con y sin glúcidos, por espectrometría de masas, así como el

análisis de los péptidos obtenidos por digestión enzimática por mapeo peptídico.

Por otro lado, la identidad física se evalúa mediante el análisis de aquellos atributos que nos proporcionan información acerca de la estructura tridimensional de rituximab, como su estructura secundaria y terciaria por dicroísmo circular, conformación física por espectroscopia de fluorescencia, contenido de tioles libres por colorimetría, estabilidad térmodinámica por calorimetría diferencial de barrido, así como tamaño y masa molecular por dispersión de luz multiángulo.

### **3.3.1.1 Caracterización por espectrometría de masas**

La determinación de la masa molecular de las proteínas es una prueba de identidad, que se realiza mediante la inyección de la muestra desde un cromatógrafo de líquidos de ultra desempeño (UPLC, por sus siglas en inglés), donde se desala y concentra, a un espectrómetro de masas, en el cual la muestra es ionizada. Los iones generados viajan por la acción de un campo eléctrico, que los separa con base en las diferencias en su relación masa/carga ( $m/z$ ). Estos datos son utilizados para obtener la masa exacta y establecer de forma inequívoca la identidad de una proteína<sup>[23]</sup>.

### **3.3.1.2 Determinación de identidad por mapeo peptídico y cromatografía de líquidos de ultra desempeño por fase reversa (RP-UPLC)**

El mapeo peptídico es otra metodología analítica utilizada para la determinación de la identidad de proteínas. En este método, la muestra de interés es sometida a una hidrólisis con una enzima proteolítica (tripsina, Lys-C, Glu-C). El producto de la digestión es analizado por



cromatografía de líquidos de ultra desempeño (UPLC, por sus siglas en inglés) en la que los péptidos son separados con base en su polaridad por fase reversa, en una columna C<sub>18</sub>, usando un gradiente de agua y acetonitrilo.

El cromatograma obtenido es comparado con el de una sustancia de referencia tratada de la misma forma que la muestra. Si la muestra problema corresponde de manera cualitativa, el perfil de picos debe ser semejante en ambos cromatogramas.

### **3.3.1.3 Cromatografía de exclusión molecular con detección de dispersión de luz de ángulo múltiple (SEC-MALS)**

La técnica de cromatografía de líquidos de ultra desempeño por exclusión de tamaño molecular (SE-UPLC, por sus siglas en inglés) separa moléculas según su volumen hidrodinámico. En ésta, conforme una solución de proteína atraviesa el lecho cromatográfico poroso, las especies de mayor tamaño relativo son excluidas al espacio interpartícula, por lo que eluyen en un tiempo menor de retención con respecto de las especies con un menor tamaño relativo.

De forma simultánea, se determina el valor de absorbancia a 280 nm, dispersión de luz a 658 nm con detección en ángulo múltiple (MALS, por sus siglas en inglés), dispersión cuasi-elástica de la luz dependiente del tiempo o dinámica (QELS, por sus siglas en inglés) e índice de refracción a 658 nm (RI, por sus siglas en inglés). Ello, con objeto de calcular la masa absoluta y el tamaño (radio hidrodinámico) de dichas moléculas según su interacción con la luz.

Así, esta determinación intrínseca o absoluta, constituye una prueba de identidad e integridad de una proteína, lo mismo que el análisis del tipo

y abundancia relativa de las variantes de radio hidrodinámico presentes<sup>[24]</sup>.

#### **3.3.1.4 Caracterización de la conformación física por espectroscopia de fluorescencia, tiempo de vida de la fluorescencia (TSCP)**

La espectroscopía de fluorescencia toma como base la capacidad que tienen las moléculas de absorber luz (fotones) a una determinada longitud de onda dentro del intervalo espectral UV-Vis, denominada longitud de excitación ( $\lambda_{ex}$ ) y emitirla a una mayor longitud de onda, denominada longitud de emisión ( $\lambda_{em}$ ). Este proceso de absorción-emisión de luz conlleva a la promoción de un electrón desde su estado basal, previo a la absorción de la luz, hasta un estado excitado. Esto, cuando aquel es incidido por un fotón (excitación), para después emitir un fotón de menor energía al regresar a su estado basal (emisión).

Todo el proceso de fluorescencia se lleva a cabo en un tiempo definido ( $\tau$ ) que depende de la estructura tridimensional de una proteína, es decir, de la disposición de los aminoácidos susceptibles a fluorescer a una determinada longitud de onda. De manera tal que mientras mayor exposición y flexible la región en que se encuentran los aminoácidos fluorescentes, mayor el tiempo del proceso fluorescente, tiempo de la fluorescencia o tiempo de vida de la fluorescencia y viceversa<sup>[25]</sup>.

Así, el principio de tiempo de vida constituye un método para identificar la conformación física de péptidos y proteínas de forma comparativa a otra o a un estado anterior.

#### **3.3.1.5 Caracterización de la conformación física por dicroísmo circular (CD)**

Debido a que las proteínas presentan asimetría estructural, es posible utilizar la técnica espectroscópica por dicroísmo circular, para medir la

diferencia en la absorción de la luz polarizada circular con giro hacia la izquierda respecto de la absorción de la luz polarizada circular con giro hacia la derecha. Así, la técnica se emplea para establecer identidad estructural.

La estructura secundaria de una proteína puede determinarse en la región ultravioleta lejana (190-250 nm), región en la que los enlaces peptídicos actúan como cromóforos, observándose un espectro que revela la abundancia y disposición de estructuras alfa hélice, giros, hojas plegadas beta o plegamiento aleatorio. Por otro lado, la estructura terciaria de una proteína puede determinarse en la región ultravioleta cercana (260-320 nm), en la que aminoácidos aromáticos, puentes disulfuro y algunos otros residuos generan un espectro de absorción<sup>[26]</sup>.

#### **3.3.1.6 Cuantificación de cisteínas libres (Tioles libres)**

La importancia de medir cisteínas libres radica en que son marcadores específicos de identidad, estructura terciaria, estado de oxidación y por lo tanto de calidad fisicoquímica de las proteínas.

Las proteínas son susceptibles de ser oxidadas, por lo que vigilar su estado de oxidación cobra vital importancia. No todas las cisteínas son reactivas debido a que su disposición espacial dentro de la proteína determinará si se encuentran disponibles para reaccionar o no. Se han desarrollado diferentes métodos para la cuantificación de cisteínas mediante derivatizantes específicos, como lo es el reactivo de Ellman o ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) que reacciona con el grupo tiol para formar ácido tionitrobenzoico, un producto que absorbe a 412 nm, y por lo tanto puede ser cuantificado espectroscópicamente<sup>[27]</sup>.

#### **3.3.1.7 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

La calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) es una técnica termoanalítica utilizada para estudiar las transiciones que sufre una proteína cuando se somete a cambios de temperatura a cierta velocidad, determinando así su estabilidad térmica y los efectos de la interacción proteína/solvente.

La técnica se basa en el calentamiento y/o enfriamiento lento de la proteína y de un blanco; de modo tal que cuando se excede un valor crítico de temperatura, la proteína se desnaturaliza presentando diferencias en energía entre el estado nativo y el desnaturalizado, que es posible medir y reportar en la forma de entalpías y temperaturas de transición<sup>[26]</sup>.

### **3.3.2 Heterogeneidad**

En esta sección se describen las técnicas analíticas utilizadas para el estudio del perfil de heterogeneidad de un anticuerpo monoclonal, como rituximab. Dicha heterogeneidad, consecuencia de modificaciones postraduccionales y fisicoquímicas, se refleja en un conjunto de isoformas que pueden distinguirse por sus diferencias en carga, masa, tamaño, forma y punto isoeléctrico. Estas variantes pueden ser evaluadas mediante técnicas como: cromatografía de intercambio catiónico débil (CEX, por sus siglas en inglés), isoelectroenfoque capilar (cIEF, por sus siglas en inglés), electroforesis capilar de zona (CZE, por sus siglas en inglés), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, por sus siglas en inglés). Por otro lado, la microheterogeneidad de glúcidos puede ser evaluada por cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC, por sus siglas en inglés).

#### **3.3.2.1 Heterogeneidad de carga por cromatografía líquida de ultra desempeño por intercambio catiónico débil (CEX-UPLC)**

La cromatografía líquida de ultra desempeño por intercambio catiónico débil (CEX-UPLC, por sus siglas en inglés) separa isoformas según la atracción electrostática diferencial que éstas mantienen con una fase estacionaria, de densidad de carga negativa. Su principio permite que, bajo la influencia de una solución de alta conductividad y fuerza iónica que fluye de forma gradual, se desorban primero las isoformas de cargas negativa, ya que interaccionan débilmente con la fase estacionaria, para después desorber las isoformas de carga positiva <sup>[26]</sup>.

### **3.3.2.2 Identidad y heterogeneidad de carga por isoelectroenfoque capilar (cIEF)**

En esta técnica analítica, las isoformas presentes en una proteína son separadas a través de un gradiente de pH generado al interior de un capilar y la influencia de un campo eléctrico. Bajo tales condiciones, las isoformas de carga se situarán en el sitio en donde su carga neta sea cero, es decir su punto isoeléctrico (pI). La detección se realiza en un detector UV a 280 nm y se determinan los puntos isoeléctricos de las isoformas de la muestra utilizando una curva generada con estándares de pI (4.1, 5.5, 7.0, 9.5 y 10.0 según se requiera)<sup>[28]</sup>.

### **3.3.2.3 Determinación de variantes de carga por electroforesis capilar de zona (CZE)**

La técnica de electroforesis capilar de zona (CZE, por sus siglas en inglés) separa variantes de carga de anticuerpos monoclonales por su diferente movilidad electroforética cuando están sometidas bajo la influencia de un campo eléctrico. Dicha movilidad, está influenciada por la carga, masa, tamaño o forma (radio hidrodinámico). Las variantes de carga son detectadas mediante un detector UV con un filtro a 214 nm. La proporción de las variantes de carga se determina por el área de los picos electroforéticos correspondientes <sup>[28]</sup>.

#### **3.3.2.4 Heterogeneidad por cromatografía líquida de ultra desempeño por interacción hidrófoba (HI-UPLC)**

La técnica cromatográfica líquida de ultra desempeño por interacción hidrófoba (HI-UPLC, por sus siglas en inglés) separa isoformas mediante la interacción diferencial que éstas mantienen con una fase estacionaria, de naturaleza hidrófoba. Su principio permite que, bajo la influencia de una solución con alta concentración de sulfato de amonio, un agente cosmótopo que se diluye de forma gradual, se desorban primero las isoformas polares, ya que interaccionan débilmente con la fase estacionaria en relación con la fase móvil, para después desorber las isoformas no polares<sup>[26]</sup>.

#### **3.3.2.5 Heterogeneidad de carga por cromatografía líquida de ultra desempeño por intercambio catiónico débil (CEX-UPLC) y cromatografía líquida de ultra desempeño por interacción hidrófoba (HI-UPLC) después de su digestión con papaína**

La papaína es una proteasa inespecífica que puede catalizar la hidrólisis de la región bisagra en las inmunoglobulinas. De dicha proteólisis, resultan tres fragmentos característicos: uno denominado fracción cristizable (Fc); y dos fragmentos de unión al antígeno (Fab). En dichos fragmentos es posible distinguir distintas variantes de carga eléctrica y polaridad cuando se analizan por la técnica de cromatografía líquida de ultra desempeño por intercambio catiónico débil (CEX-UPLC) y cromatografía líquida de ultra desempeño por interacción hidrófoba (HI-UPLC).

#### **3.3.2.6 Caracterización de N-glúcidos por cromatografía líquida de ultra desempeño por interacción hidrófila (HILI-UPLC)**

La PNGasa F es una enzima específica que puede catalizar la hidrólisis del enlace entre asparagina y N-Acetilglucosamina (ASP-GlcNac), mismo

que constituye el núcleo de todas las variantes de N-glúcidos que se encuentran en una glicoproteína como Rituximab.

Los N-glúcidos obtenidos de dicha hidrólisis presentan diferentes estructuras que se analizan con la técnica de cromatografía líquida de ultra desempeño por interacción hidrófila (HILI-UPLC, por sus siglas en inglés) cuyo principio permite que, los glúcidos mantengan una interacción diferencial con una fase estacionaria de sílice modificada, y bajo la influencia de una solución acuosa que reemplaza una solución orgánica de forma gradual, se desorban primero las especies con menor densidad de carga, momento del dipolo eléctrico y volumen hidrodinámico, ya que interaccionan débilmente con la fase estacionaria para después desorber las especies con mayor densidad de carga, momento del dipolo eléctrico y volumen hidrodinámico<sup>[29]</sup>.

Debido a que los glúcidos tienen poca o nula absorción de luz UV-Vis, estos son conjugados, con un fluoróforo, a fin puedan ser detectados por su emisión de fluorescencia; de manera tal que este tratamiento constituye un método para detectar el tipo y abundancia relativa de N-glúcidos presentes en una glicoproteína.

### **3.3.3 Función biológica**

La evaluación de la función biológica de un anticuerpo monoclonal como rituximab, debe estar relacionada con sus mecanismos de acción, que han sido clasificados en: funciones de unión y en funciones biológicas, tanto de la región Fab como de la región Fc.

Las pruebas de unión abarcan la evaluación de las interacciones descritas para los dominios Fab y Fc de rituximab como: afinidad a

CD20 por un inmunoensayo con anticuerpos secundarios anti-IgG humano acoplado a peroxidasa en células que expresan CD20; y la afinidad a receptores Fc $\gamma$ RIa, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIIa y FcRn por calorimetría de titulación isotérmica (ITC).

En cuanto a las pruebas funcionales biológicas, se realiza la evaluación de citotoxicidad mediada por complemento (CDC, por sus siglas en inglés) por colorimetría y de citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) por luminiscencia.

### **3.3.3.1 Determinación de constantes de afinidad a receptores**

La interacción entre proteínas-proteínas, enzima-sustrato, anticuerpo-antígeno o anticuerpo-receptor involucra la liberación o absorción de calor al sufrir cambios estructurales que forman un complejo estable.

Una técnica que puede medir y cuantificar los parámetros termodinámicos, como la constante de afinidad ( $K_a$ ), la estequiometría ( $n$ ) y la entalpía ( $\Delta H$ ) generados debido a la interacción entre moléculas, es la calorimetría por titulación isotérmica (ITC, por sus siglas en inglés).

La técnica ITC se basa en adiciones constantes y seriadas realizadas en un calorímetro a temperatura constante, entre dos celdas, una de referencia y otra de muestra rodeadas por una pared adiabática, la cual tiene como función eliminar la diferencia de temperatura que se presenta entre las dos celdas cuando en las titulaciones existe la liberación o absorción de calor. Debido a que existen diferentes tipos de receptores que tienen la capacidad de interactuar con la fracción Fc de las inmunoglobulinas y no todos presentan la misma afinidad por el



anticuerpo, es importante determinar y conocer la constante de afinidad a cada uno de ellos<sup>[30]</sup>.

### **3.3.3.2 Afinidad a CD20**

Para evaluar la afinidad a CD20, blanco terapéutico de rituximab, se realiza una ELISA en células WIL2-S, una línea celular linfocítica B humana que sobreexpresa CD20. En este ensayo evalúa de forma comparativa el porcentaje de anticuerpo unido a CD20 expresado en la superficie celular, por medio de un anticuerpo secundario contra el dominio Fc IgG humano acoplado a peroxidasa. Posteriormente se adiciona al ensayo un sustrato, el cual al ser transformado por la peroxidasa emite una señal luminosa que puede detectarse en un espectrofotómetro con detector de luminiscencia. La afinidad de Rituximab a CD20 es directamente proporcional a la intensidad de luminiscencia generada. Así, se determina la concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) y el porcentaje de unión relativa entre la sustancia de referencia y la Rituximab-biocomparable<sup>[30]</sup>.

### **3.3.3.3 Potencia biológica por CDC**

Este método evalúa la capacidad de un anticuerpo para inducir citotoxicidad dependiente de complemento. Una vez que el anticuerpo monoclonal se une a su antígeno, se acompleja con las proteínas de complemento en el dominio CH2 de su región Fc, provocando un cambio conformacional de las proteínas de complemento que resulta en la formación del complejo de ataque a membrana (MAC, por sus siglas en inglés) provocando lisis celular. Posteriormente a cada microensayo se adiciona MTS, una sal de tetrazolio que al ser reducido por las enzimas mitocondriales de células vivas produce un compuesto colorido que absorbe a 490 nm. El incremento de la absorbancia es inversamente

proporcional a la citotoxicidad y la potencia se determina comparando la concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) entre la sustancia de referencia y la muestra problema<sup>[30]</sup>.

#### **3.3.3.4 Potencia biológica por ADCC**

*In vivo*, la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC, por sus siglas en inglés) tiene como principio la activación de células del sistema inmunológico, generalmente células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés) a través de la unión de su receptor CD16 o FcγRIII con la región Fc de un anticuerpo unido previamente a su antígeno. Este proceso induce a la célula CD16<sup>+</sup> a liberar perforina, granzima y otras serin proteasas contenidas en gránulos citotóxicos, que provocan muerte celular. En el análisis *in vitro* con bioluminiscencia la célula blanco CD20<sup>+</sup> se incuba en presencia de Rituximab-biocomparable y una línea celular transformada, que expresa el receptor FcγRIII de alta afinidad y un gen reportero de la enzima luciferasa, una vez que se forma el complejo Célula blanco- anticuerpo - Célula transformada, el factor nuclear de células T activadas (NFAT, por sus siglas en inglés) de la célula transformada se trasloca al núcleo donde induce la expresión de genes relacionados con el mecanismo de ADCC así como el gen de luciferasa. Posteriormente se adiciona al ensayo un sustrato, el cual al ser transformado por la luciferasa emite una señal luminosa que puede detectarse en un espectrofotómetro con detector de luminiscencia. La citotoxicidad es directamente proporcional a la intensidad de luminiscencia generada y la potencia se determina comparando la concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) entre la sustancia de referencia y la muestra problema<sup>[30]</sup>.

## **4. Metodología experimental**

El ejercicio de comparabilidad fue realizado entre el anticuerpo monoclonal Rituximab-biocomparable y su medicamento de referencia, haciendo uso de una extensa plataforma analítica, que incluye: métodos y técnicas con principios de análisis cromatográficos, electroforéticos y de espectrometría de masas con objeto de estudiar sus propiedades fisicoquímicas; lo mismo estudios calorimétricos y espectroscópicos para elucidar sus propiedades físicas o estructurales. Estos atributos son así mismo relacionados con un conjunto de ensayos biológicos, de afinidad y potencia, que evalúan de manera *in vitro* los diferentes mecanismos de acción descritos para rituximab.

El conjunto de técnicas analíticas utilizadas en el ejercicio de comparabilidad permiten determinar atributos inherentes a la calidad del producto, que son corroborados mediante el uso de técnicas de naturaleza ortogonal, a partir de las cuales es posible conocer la distribución y oscilación para los valores de cada uno de ellos.

### **4.1 Identidad y estructura**

#### **4.1.1 Espectrometría de masas**

Los análisis por espectrometría de masas se realizaron en un SYNAPT G2 HDMS acoplado a un cromatógrafo de líquidos de ultra desempeño Acquity UPLC H-Class Bio System utilizando una fuente de ionización de tipo ESI. El rango de adquisición de datos fue de 500 a 400 *m/z*. Los datos obtenidos fueron analizados en el software BiopharmaLynx<sup>®</sup>.

Los análisis de masa intacta y masa intacta deglicosilada se realizaron a una concentración de 1 mg/mL. La separación se llevó a cabo utilizando

un gradiente lineal de 1 % a 99 % de acetonitrilo, 0.1 % de ácido fórmico en una columna de fase reversa C<sub>18</sub> BEH 300, 2.1 x 150 mm<sup>[19]</sup>.

#### **4.1.2 Determinación de identidad por mapeo peptídico por cromatografía líquida de ultra desempeño por fase reversa (RP-UPLC)**

Las muestras de rituximab fueron digeridas con papaína en una solución amortiguadora de Tris-Base 0.1 M, pH 7.5 a 37 °C por 15 h. Los péptidos resultantes de dicha digestión fueron separados por fase reversa en una columna Jupiter de 5 µm, 300 Å, C<sub>18</sub> 250 x 4.60 mm acoplada a un cromatógrafo de líquidos de alto desempeño Alliance HPLC System y utilizando un gradiente de 0 a 50 % de acetonitrilo, 0.1 % TFA. La detección se llevó a cabo con una lámpara UV a 220 nm.

#### **4.1.3 Cromatografía de exclusión molecular con detección de dispersión de luz de ángulo múltiple (SEC-MALS)**

Las muestras fueron separadas por cromatografía de exclusión por tamaño molecular utilizando una columna BEH200 SEC, 1.7 µm, 200 Å 4.6 x 300 mm acoplada a un cromatógrafo de líquidos de ultra desempeño utilizando una elución isocrática con una fase móvil de fosfatos 20 mM, 150 mM NaCl y pH 6.8. La detección de las muestras se llevó a cabo utilizando cuatro detectores en serie: un detector UV a 280 nm, un detector de dispersión de luz en multiángulo y dispersión de luz cuasi elástica a 658 nm y un detector de índice de refracción a 658 nm. El análisis de los datos obtenidos se realizó utilizando el software Astra 6.0<sup>[24]</sup>.

#### **4.1.4 Caracterización de la conformación física por espectroscopia de fluorescencia, tiempo de vida de la fluorescencia (TCSPC)**

El tiempo de vida de la fluorescencia intrínseca de las muestras de rituximab fue medido en un espectrofluorómetro Fluorolog 3 de Horiba

Jobin Yvon equipado con una lámpara de xenón a 288 nm por arreglo de diodos pulsante (<1.2 ns). El análisis de los datos obtenidos fue realizado con el software DAS6.

#### **4.1.5 Caracterización de la conformación física por dicroísmo circular (CD)**

Los análisis estructurales se llevaron a cabo en un espectropolarímetro Jasco-815. Las muestras fueron diluídas a 0.1 mg/mL para el análisis en UV lejano (190–300 nm) utilizando una celda de cuarzo de 0.01 cm. Para los análisis en UV cercano (240–350 nm), las muestras fueron diluídas a 3.3 mg/ mL y analizadas en una celda de cuarzo de 0.1 cm. Los parámetros de detección fueron: velocidad de escaneo a 50 nm/min, 1 nm de amplitud de banda y colecta de un punto de dato por nm.

#### **4.1.6 Cuantificación de cisteínas libres (Tioles libres)**

La concentración de tioels libres fue determinada a través de una curva de calibración, para cada una de las condiciones del ensayo (nativa, desnaturizante y desnaturizante-reductora). Se midió la absorbancia a 412 nm. Para condiciones nativas y desnaturizantes se utilizó una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M y pH 8.0; para condiciones denaturalizantes-reductoras se utilizó una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, 5 M de GdnHCl y pH 8. El contenido de cisteínas y proteína fue ajustado a nanomoles por muestra. El contenido de cisteína (nm) fue dividido entre el contenido de proteína (nm) para obtener la proporción de cisteínas/proteína<sup>[27]</sup>.

#### **4.1.7 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

Las temperaturas de transición y entalpías fueron obtenidas utilizando un calorímetro NanoDSC. Las muestras fueron diluídas a 1 mg/mL y

degasificadas. El análisis se llevó a cabo de 25 °C a 110 °C a 1°C/min.<sup>[26]</sup>.

## **4.2 Heterogeneidad**

### **4.2.1 Heterogeneidad de carga por cromatografía líquida de ultra desempeño por intercambio catiónico débil (CEX-UPLC)**

Las muestras fueron separadas en una columna de intercambio catiónico débil Protein-Pak Hi Res CM 4.6 x 100 mm en un cromatógrafo líquido de ultra desempeño Acquity UPLC System con detección UV a 280 nm. Se utilizó un gradiente lineal con una solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, NaCl 500 mM y pH 6.5<sup>[26]</sup>.

### **4.2.2 Identidad y heterogeneidad de carga por isoelectroenfoque capilar (cIEF)**

El punto isoelectrico de las muestras fue determinado utilizando un equipo de electroforesis capilar Beckman Coulter PA800 plus utilizando capilares neutros recubiertos de poliacridamida (50 mm x 60 cm). Se utilizó un detector UV a 280 nm y se determinaron los puntos isoelectricos de las isoformas de la muestra utilizando una curva generada con estándares de pI (4.1, 5.5, 7.0, 9.5 y 10.0)<sup>[28]</sup>.

### **4.2.3 Determinación de variantes de carga por electroforesis capilar de zona (CZE)**

El análisis fue realizado utilizando un equipo de electroforesis capilar PA800 de ProteomeLab equipado con un detector ultravioleta.

La separación se llevó a cabo en capilar recubierto con una superficie hidrofílica con una longitud efectiva de 30.2 cm y un diámetro interno de 50 µm a 20 °C. La solución BGE contenía ácido 6-aminocaproico-ácido acético 200 mM acetato de litio 30 mM y hidroxipropilmetil celulosa al

0.05 % p/v a pH 4.8. Las muestras fueron diluídas a una concentración de 1 mg/mL con solución amortiguadora de Tris 50 mM y fueron inyectadas por 20 s a 0.5 psi, la separación se llevó a cabo por 30 min a 15 kV y la detección se realizó a 214 nm. La adquisición y el procesamiento de datos fueron realizadas utilizando el software 32 Karat y Waters Empower, respectivamente<sup>[28]</sup>.

#### **4.2.4 Heterogeneidad por cromatografía líquida de alto desempeño por interacción hidrófoba (HI-HPLC)**

Las muestras fueron separadas en una columna Butyl-NPR 4.6 x 35 mm en un cromatógrafo de líquidos de alto desempeño con detección UV a 214 nm. Se utilizó un gradiente lineal con una solución de Tris-HCl 20 mM, sulfato de amonio 1 M, pH 7.0 a una solución de Tris HCl 20mM pH 7.0 <sup>[26]</sup>.

#### **4.2.5 Heterogeneidad de carga por cromatografía líquida de ultra desempeño por intercambio catiónico débil (CEX-UPLC) y cromatografía líquida de ultra desempeño por interacción hidrófoba (HI-UPLC) después de su digestión con papaína**

Las muestras fueron incubadas a 37 °C por 5 h con papaína en un proporción 1:100 en una solución amortiguadora de Tris-HCl a pH 7.2. La separación de los fragmentos resultantes se llevó a cabo en una columna de intercambio catiónico fuerte Protein-Pak Hi Res SP 4.6 X 100 mm en un cromatógrafo de líquidos de ultra desempeño Acquity UPLC System con detección UV a 280 nm y utilizando un gradiente lineal de 0 a 500 mM de NaCl en una solución amortiguadora MES a pH 6.5.

#### **4.2.6 Caracterización de N-glúcidos por cromatografía líquida de ultra desempeño por interacción hidrófila (HILI-UPLC)**

Los glúcidos fueron digestados, separados y marcados con el fluoróforo 2-AB. La separación se llevó a cabo utilizando una pre columna

VanGuard BEH para glúcidos de 1.7  $\mu\text{m}$  y una columna Acquity UPLC BEH para glúcidos de 150 x 2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$  acopladas a un cromatógrafo de líquidos Acquity UPLC H-Class Bio System. La separación se realizó utilizando un gradiente lineal con de 22% a 50 % de acetonitrilo en una fase 100 mM de formato de amonio a pH 4.5. La detección se llevó a cabo por fluorescencia utilizando una longitud de onda de excitación de 250 nm y 420 nm de emisión.

### **4.3 Función biológica**

#### **4.3.1 Determinación de constantes de afinidad a receptores**

Las constantes de afinidad se obtuvieron utilizando un calorímetro Nano ITC de TA Instruments Inc. 300  $\mu\text{L}$  de una solución de PBS a pH 7.0 que contenía a los distintos receptores (Fc $\gamma$ RIa, Fc $\gamma$ RIIa y Fc $\gamma$ RIIIa) a una concentración de 5.0  $\mu\text{M}$  fueron tituladas con soluciones de rituximab a 50  $\mu\text{M}$  en PBS a pH 7.0 a 25 °C. El análisis de los datos obtenidos se llevó a cabo en el software NanoAnalyze v2.4.1<sup>[30]</sup>.

#### **4.3.2 Afinidad a CD20**

La línea celular que expresa el antígeno CD20 (WIL2-S ATCC: CRL-8885<sup>TM</sup>) fue incubada en la presencia de soluciones que contenían rituximab a distintas concentraciones en medio RPMI-1640 con 10% de SFB por 2 h a 37 °C. La detección de rituximab unido se llevó a cabo utilizando un anticuerpo secundario (anti-Fc humano) acoplado a peroxidasa de rábano, utilizando TMB como sustrato. La absorción fue leída a 450 nm. Los resultados fueron expresados como el porcentaje relativo de la CE<sub>50</sub> de la curva concentración-respuesta de Rituximab-biocomparable con respecto de su medicamento de referencia<sup>[30]</sup>.



### **4.3.3 Potencia biológica por CDC**

La línea celular que expresa el antígeno CD20 (WIL2-S ATCC: CRL-8885™) fue incubada en la presencia de soluciones que contenían complemento de suero humano y rituximab (a distintas concentraciones) en medio RPMI-1640 con 10% de SFB por 4 h a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se adición el sustrato MTS y se incubaron por dos horas adicionales en las mismas condiciones. Los resultados fueron expresados como el porcentaje relativo de la potencia obtenida de la comparación de las CE<sub>50</sub> de las curvas dosis-respuesta de Rituximab-biocomparable con respecto de su medicamento de referencia<sup>[30]</sup>.

### **4.3.4 Potencia biológica por ADCC**

Se utilizó el kit comercial "ADCC Reporter bioassay Kit" de Promega. La línea celular que expresa el antígeno CD20 (WIL2-S ATCC: CRL-8885™) fue incubada en la presencia de soluciones que contenían rituximab a distintas concentraciones y una concentración especificad e células Jurkat transformadas CD16<sup>+</sup>. Posteriormente se adicionó un sustrato luminiscente y las células fueron incubadas 20 min. Los resultados fueron expresados como el porcentaje relativo de la potencia obtenida de la comparación de las CE<sub>50</sub> de las curvas dosis-respuesta de Rituximab-biocomparable con respecto de su medicamento de referencia<sup>[30]</sup>.

## **5. Resultados y discusión**

A continuación se presentan los resultados del ejercicio de comparabilidad realizado entre Rituximab-Biocomparable y su medicamento de referencia.

La estrategia de caracterización comprendió del uso de un conjunto de técnicas analíticas con fundamentos espectroscópicos, cromatográficos, calorimétricos y electroforéticos que evalúan las distintas propiedades de los anticuerpos monoclonales en estudio, con un enfoque ortogonal, a fin de obtener una visión global y una alta fiabilidad de los resultados obtenidos.

Los resultados de la evaluación de los atributos de calidad, relevantes para la seguridad y eficacia, se presentan gráficamente para observar la variabilidad lote a lote, consecuencia de la heterogeneidad que se presenta naturalmente en medicamentos de origen biotecnológico, como rituximab.

Asimismo, los resultados gráficos son útiles en la demostración de comparabilidad, en el supuesto de que el producto biosimilar a evaluar presente oscilaciones o variaciones con una magnitud análoga, para cada uno de los atributos de calidad mesurables, con respecto de su medicamento de referencia.

### **5.1 Identidad y Estructura**

En esta sección se presenta la información del análisis de la composición y conformación proteica, que permite confirmar la identidad de Rituximab-Biocomparable con respecto de su medicamento de referencia. Esta comparación está dividida en dos secciones, identidad química e identidad física. Los resultados para Rituximab-Biocomparable y su medicamento de referencia se presentan de modo comparativo y

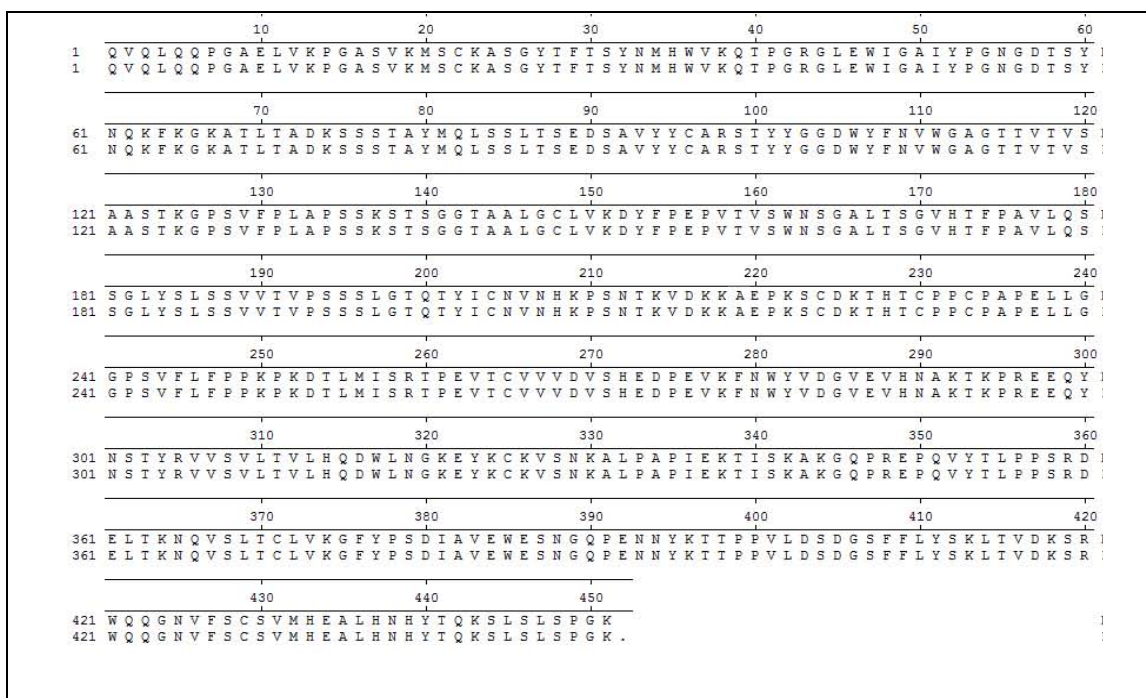
de manera gráfica, de manera que la oscilación lote a lote sea apreciable.

### **5.1.1 Identidad química**

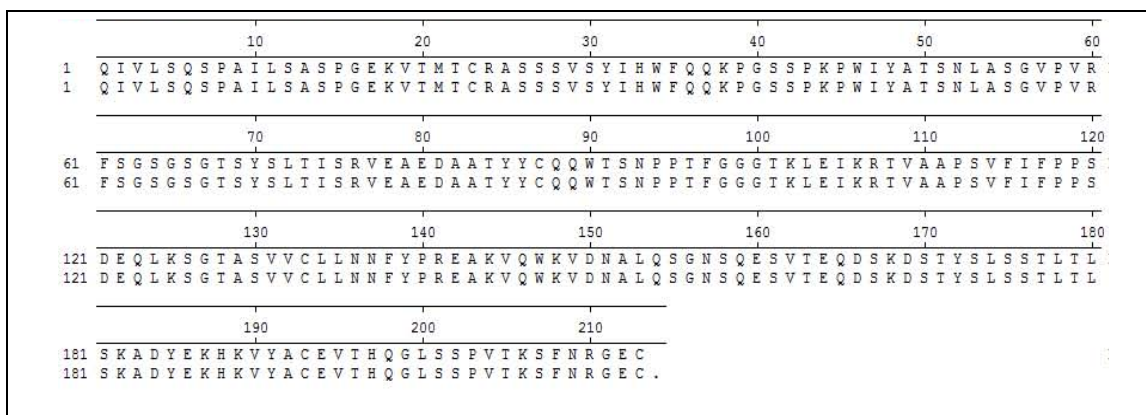
Como parte de los estudios requeridos para establecer la identidad de una proteína terapéutica, se encuentra la verificación de su estructura primaria –composición química y secuencia– con respecto de la secuencia teórica de aminoácidos a partir de la cual se construyó el gen para su biosíntesis. En este sentido, Rituximab-Biocomparable fue diseñado con base en el análisis de la secuencia proteica del medicamento comercial de referencia en un proceso conocido como ingeniería genética reversa, corroborado con las secuencias publicadas en patentes de innovación.

La identidad primaria o secuencia de aminoácidos de Rituximab-Biocomparable fue verificada, en modo comparativo con el medicamento de referencia, tanto por el análisis en espectrometría de masas, RP-UPLC-MSE-TOF, para los péptidos generados por tratamiento enzimático, como por el análisis electroforético para la secuencia del gen construido para su biosíntesis (ADN) y para el transcrito que resulta de la expresión del gen (ARN mensajero) en células de ovario de hámster chino (CHO cells, por sus siglas en inglés).

A continuación, se muestra el alineamiento de la secuencia proteica obtenida *in silico* por traducción de las secuencias de nucleótidos de Rituximab-Biocomparable para la cadena pesada tipo *gamma* (Figura 1) y la cadena ligera tipo *kappa* (Figura 2), con respecto de la secuencia proteica del medicamento de referencia. Estas secuencias, fueron obtenidas para el gen responsable de la biosíntesis (ADN) y para el transcrito purificado durante la expresión de dicho gen (ARN mensajero).



**Figura 1** Alineamiento de la secuencia proteica teórica para la cadena pesada de Rituximab-Biocomparable (inferior) contra medicamento de referencia (superior).



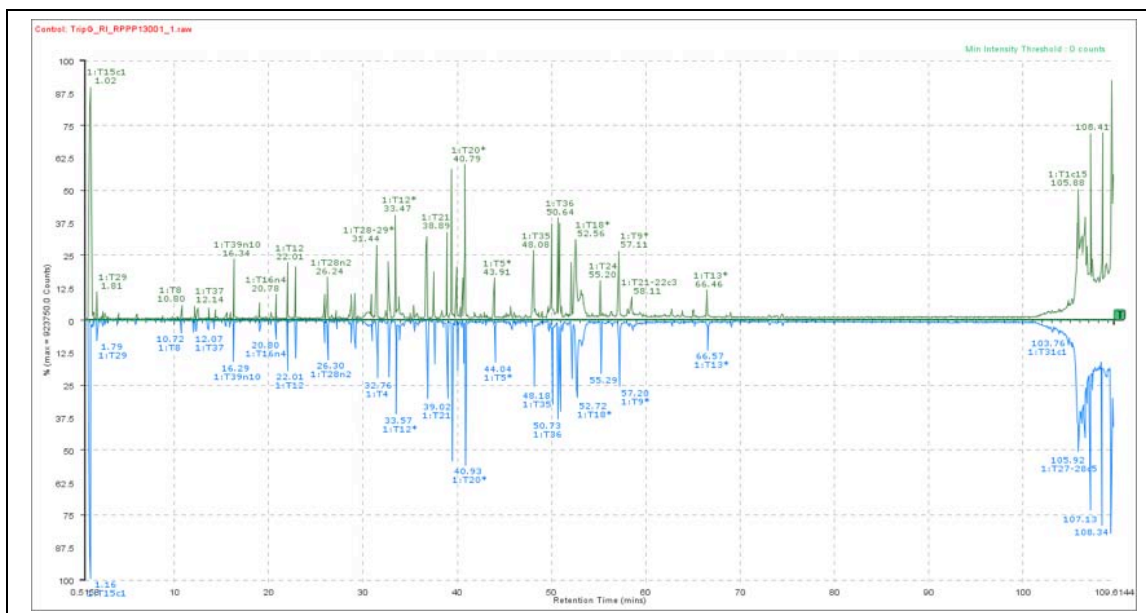
**Figura 2** Alineamiento de la secuencia proteica teórica para la cadena ligera de Rituximab-Biocomparable (inferior) contra medicamento de referencia (superior).

Esta verificación de secuencia para el gen y los transcritos generados durante la biosíntesis de Rituximab-Biocomparable demuestran identidad respecto al medicamento de referencia, cuando se traducen a su secuencia proteica, con un 100% de correspondencia. De esta

manera se concluye que la línea celular seleccionada para la biosíntesis de Rituximab-Biocomparable, aún cuando de la misma clase, género y especie (derivada de células CHO), pero presumiblemente distinta a la empleada por el medicamento de referencia, es capaz de producir la misma proteína terapéutica.

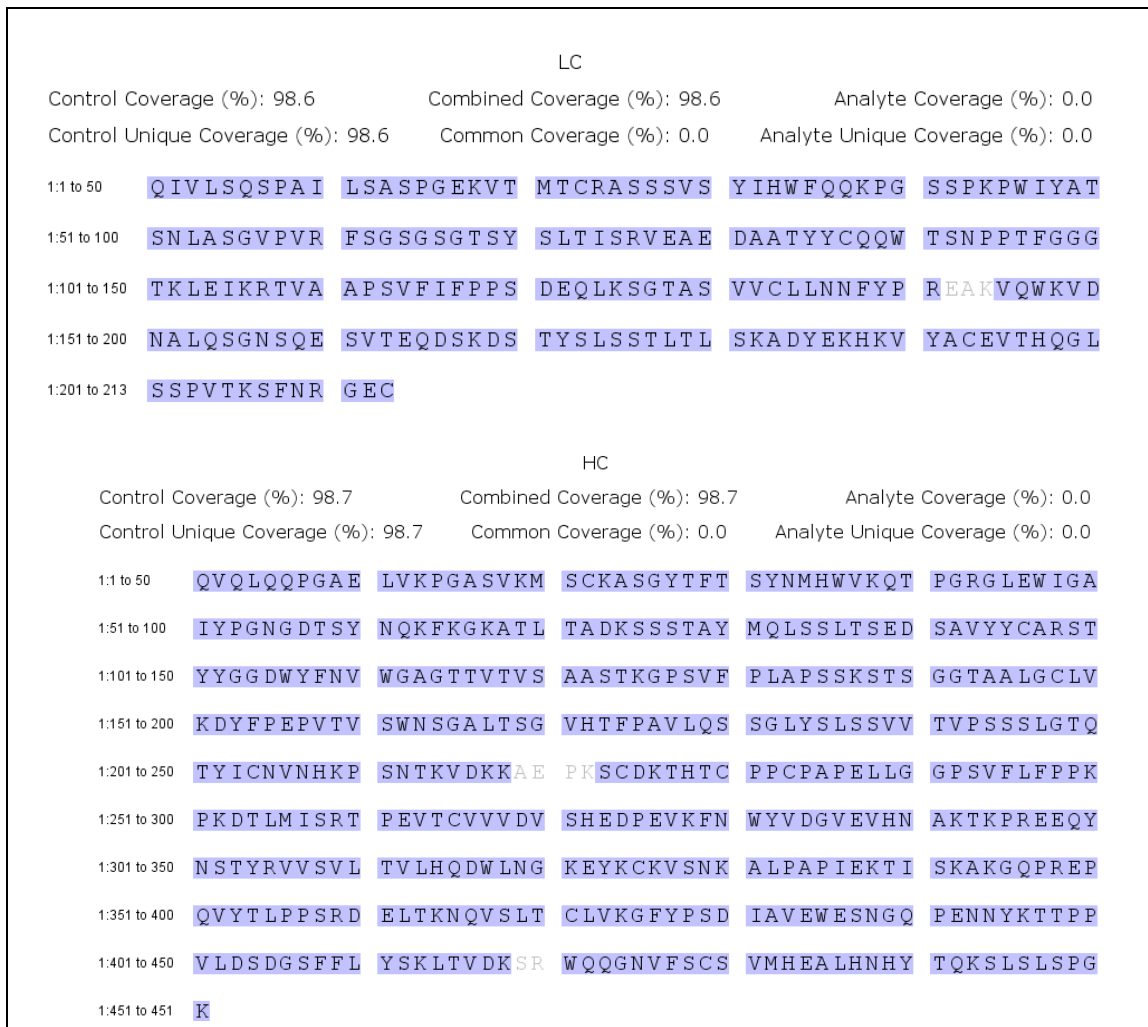
Lo anterior, fue confirmado al verificar la secuencia proteica por espectrometría de masas, que resulta del análisis de la masa exacta y monoisotópica, así como del patrón de fragmentación, de los péptidos generados por tratamiento enzimático de Rituximab-Biocomparable y del medicamento de referencia. En dicho análisis, se obtuvo una cobertura de secuencia del 99.2% para Rituximab-Biocomparable y del 98.9% para el medicamento de referencia. Esto, al comparar los péptidos obtenidos con respecto de los teóricos, generados in silico, a partir de la secuencia de aminoácidos obtenida de novo del medicamento de referencia.

En la figura 3 puede observarse el perfil de péptidos generados por tratamiento enzimático con tripsina, para Rituximab-Biocomparable y para el medicamento de referencia. Se evidencia la coincidencia en abundancia y número de péptidos entre ambos productos.

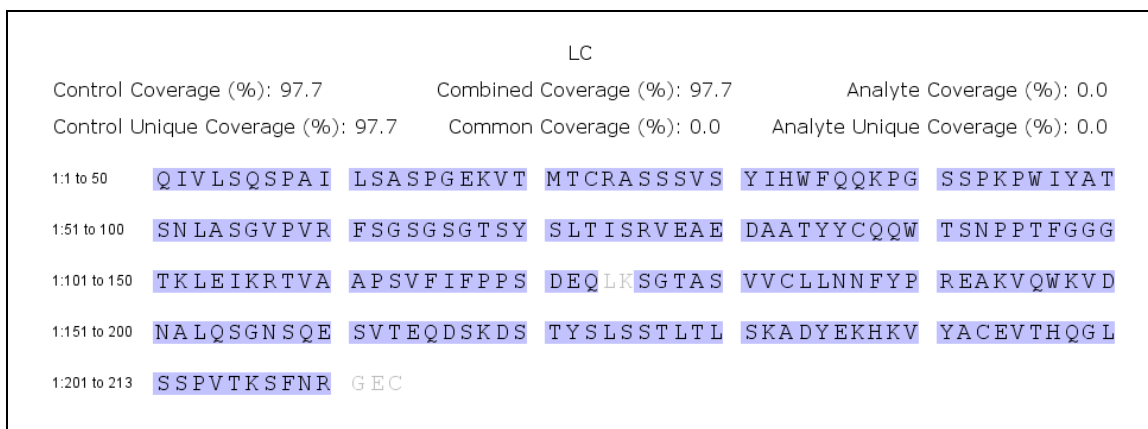


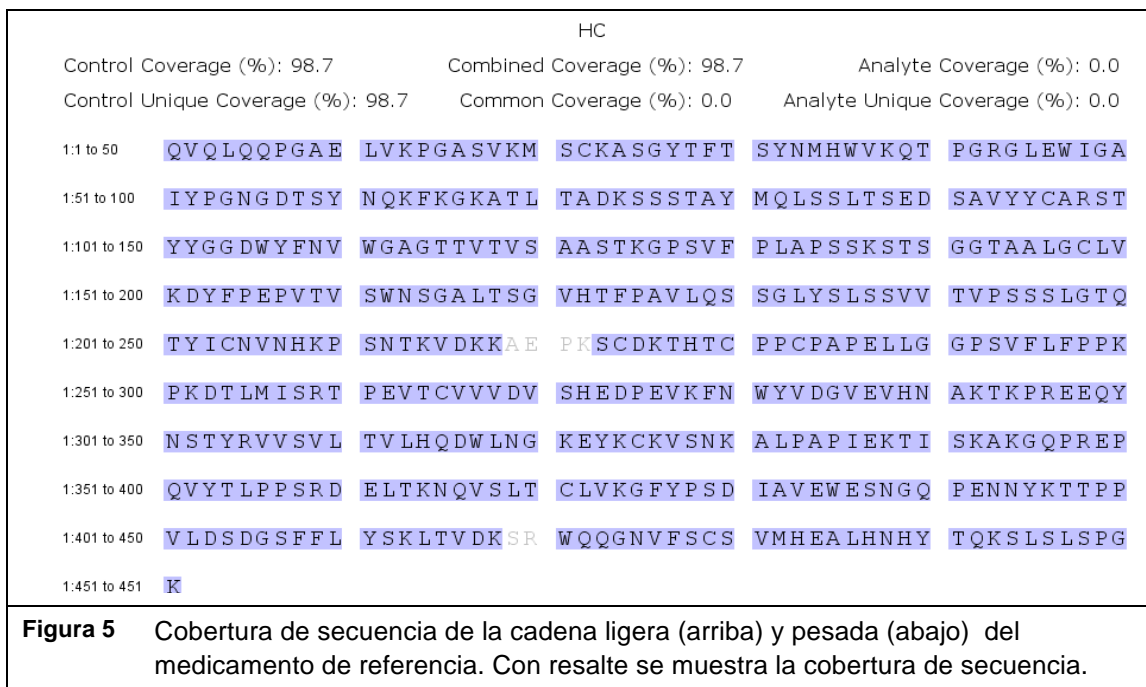
**Figura 3** Mapeos peptídicos (digestión con tripsina) por espectrofotometría de masas (cuenta total de iones) con vista en espejo de Rituximab-Biocomparable (arriba) y medicamento de referencia (abajo), de 0 a 110 min.

Tales péptidos, analizados con respecto de la secuencia de aminoácidos teórica, permitieron confirmar la identidad absoluta de Rituximab-Biocomparable, como puede observarse en la figura 4 para Rituximab-Biocomparable y figura 5 para el medicamento de referencia. La cobertura de secuencia y su confirmación se observa resaltada como zonas moradas sobre la secuencia teórica de la cadena pesada y ligera. Con ello, puede concluirse que ambos productos contienen los mismos péptidos a partir de los cuales puede reconstruirse la secuencia proteica de Rituximab-Biocomparable con un mínimo del 95 % de cobertura, que cumple con los valores consenso aceptados por farmacopeas del 90 % como mínimo<sup>[18]</sup>.



**Figura 4** Cobertura de secuencia de la cadena ligera (arriba) y pesada (abajo) de Rituximab-Biocomparable. Con resalte se muestra la cobertura de secuencia.



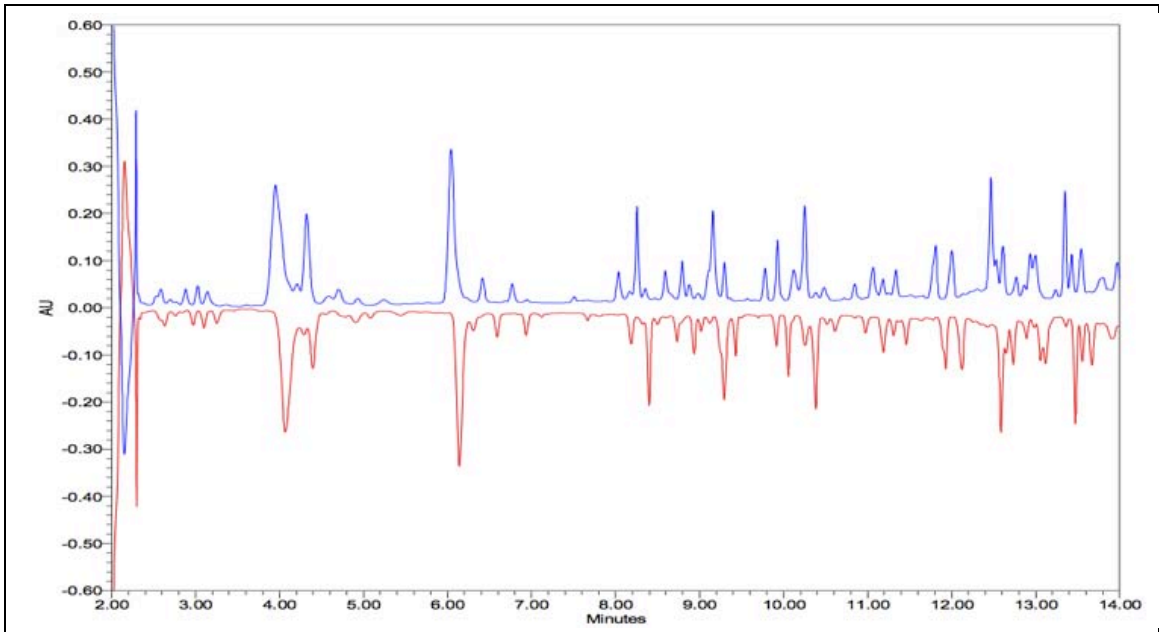


Por otro lado, se realizó el análisis de la masa exacta para cada uno de los productos, luego de ser tratados enzimáticamente con N-Glicosidasa F (PNGasaF), a fin de escindir los glúcidos que forman parte de las modificaciones postraduccionales esperadas en un anticuerpo monoclonal, y comparar, en la forma de molécula completa, la masa que proviene exclusivamente de su secuencia de aminoácidos (Tabla 1). Con ello se confirma su identidad química, asimismo por el análisis de mapeo peptídico en la forma de molécula deglicosilada (Figura 6 y Figura 7).

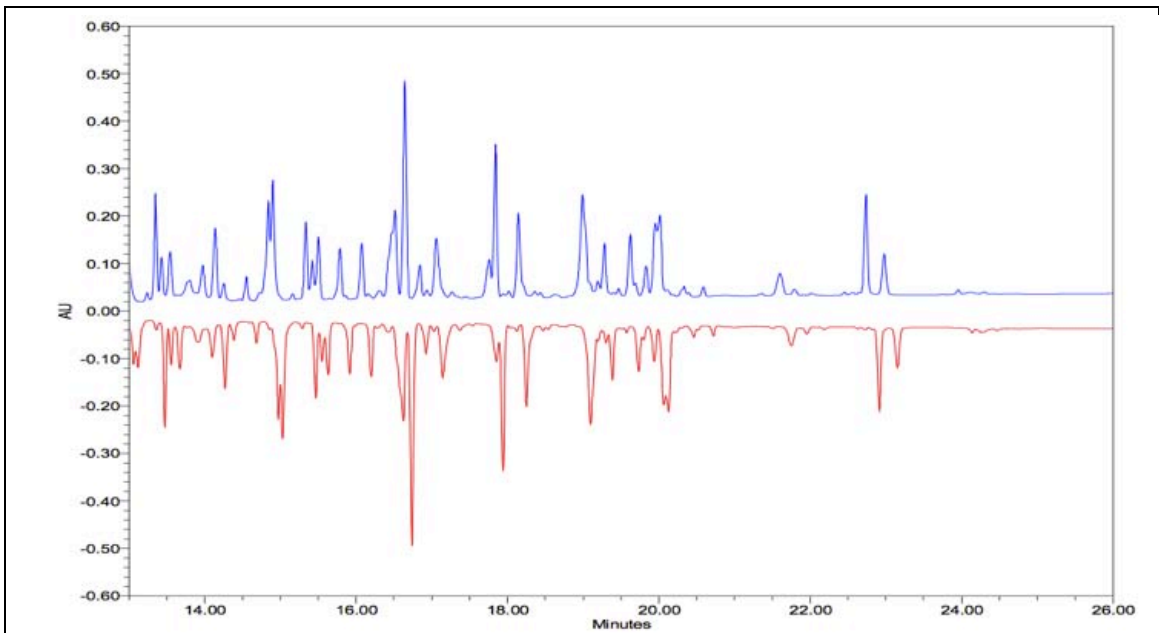
**Tabla 1. Masa exacta para proteína deglicosilada en Rituximab-Biocomparable y medicamento de referencia**

| Producto                  | Lote | Masa experimental (Da) | Masa teórica deglicosilada (Da) |
|---------------------------|------|------------------------|---------------------------------|
| Rituximab-Biocomparable   | 1    | 144191.29              | 144187                          |
|                           | 2    | 144191.40              |                                 |
|                           | 3    | 144191.93              |                                 |
| Medicamento de referencia | 1    | 144190.99              |                                 |
|                           | 2    | 144190.04              |                                 |
|                           | 3    | 144190.96              |                                 |



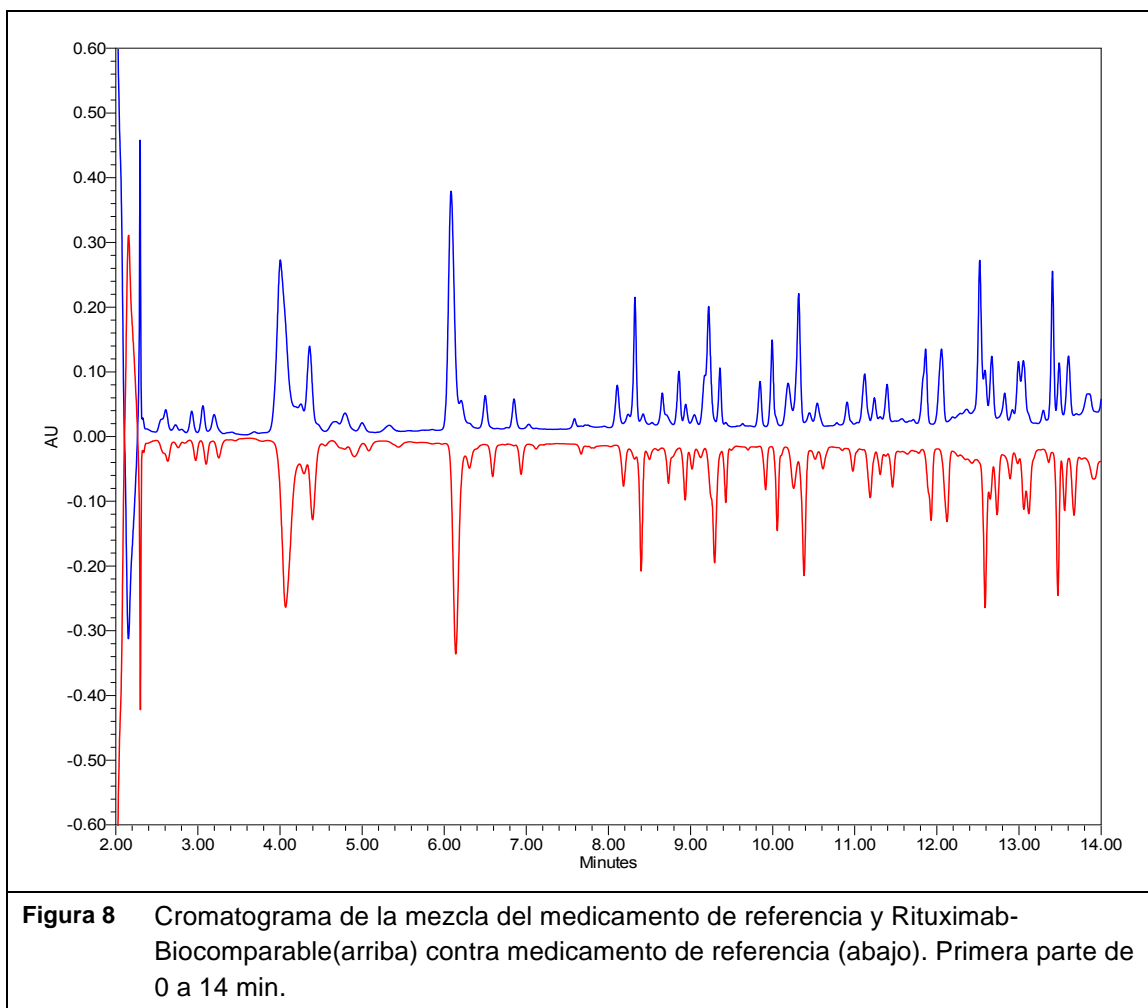


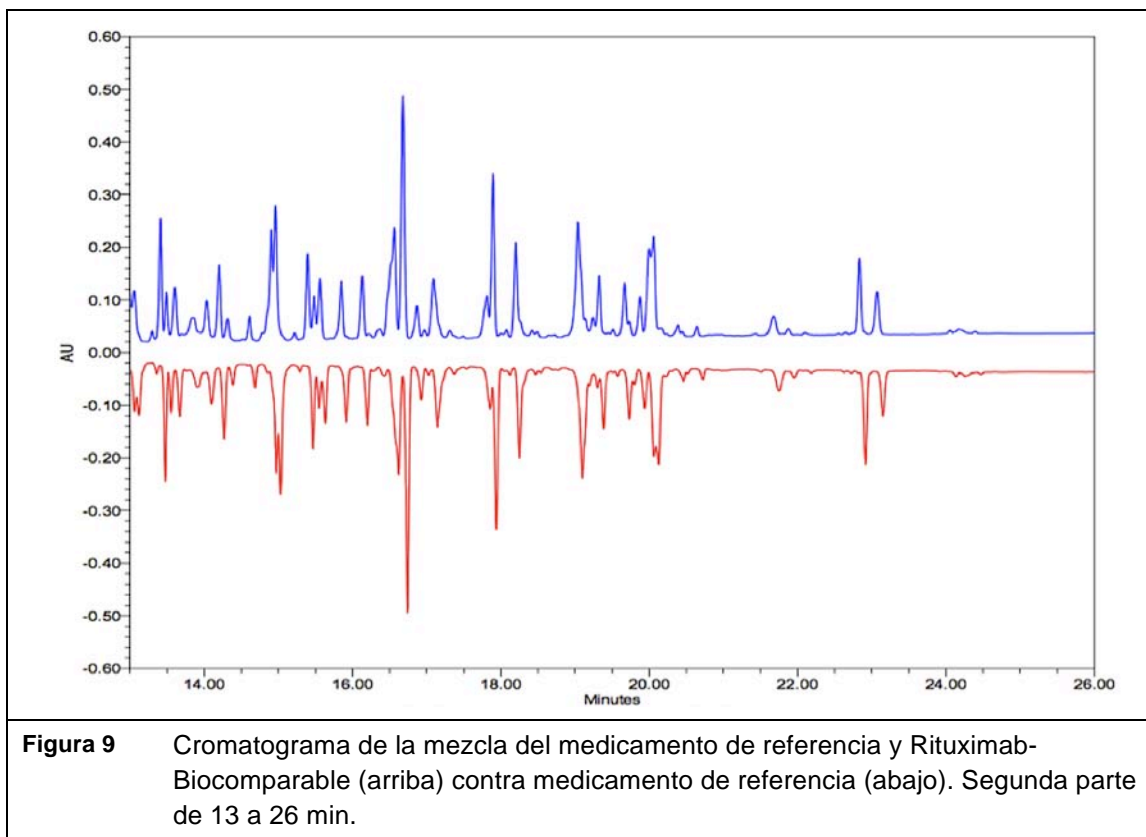
**Figura 6** Cromatograma en espejo de mapeo peptídico de molécula deglicosilada de Rituximab-Bioequivalente (arriba) contra el medicamento de referencia (abajo). Primera parte 2 a 14 min.



**Figura 7** Cromatograma en espejo de mapeo peptídico de molécula deglicosilada de Rituximab-Bioequivalente(arriba) contra el medicamento de referencia (abajo). Segunda parte 13 a 26 min.

Durante el mapeo peptídico, ciertas condiciones inherentes al análisis pueden producir diferencias mínimas en los cromatogramas. Para descartar una diferencia real se obtuvo un cromatograma de la mezcla en proporciones iguales (1:1), de medicamento de referencia y Rituximab-Biocomparable, y medicamento de referencia, previamente sometidos a tratamiento enzimático de forma independiente (Figura 8 y Figura 9).





Al comparar el número de picos en el cromatograma obtenido con el medicamento de referencia y con el de la mezcla, se concluye que ambos productos están compuestos por igual número y tipo de péptidos, confirmando que los medicamentos cuentan con la misma secuencia de aminoácidos.

Asimismo, la identidad química de Rituximab-Biocomparable fue verificada por el análisis de su masa exacta como proteína intacta incluyendo las modificaciones postraduccionales que ocurren, naturalmente, durante la biosíntesis de un anticuerpo monoclonal y que podrían llegar a tener un impacto en la farmacodinamia, farmacocinética, e inmunogenicidad del producto. Para este fin se realizó un análisis comparativo con el medicamento de referencia y Rituximab-Biocomparable (Tabla 2).

**Tabla 2. Masa exacta para las glicofomas de Rituximab-Biocomparable y medicamento de referencia.**

| Producto                  | Lote | G0F/G0F   | G0F/G1F   | G1F/G1F   | G1F/G2F   | G2F/G2F   |
|---------------------------|------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Masa teórica              |      | 147077.40 | 147238.30 | 147400.30 | 147562.30 | 147724.30 |
| Rituximab-Biocomparable   | 1    | 147079.06 | 147241.38 | 147403.52 | 147564.90 | 147719.03 |
|                           | 2    | 147079.28 | 147241.06 | 147403.34 | 147564.77 | 147722.19 |
|                           | 3    | 147079.45 | 147241.35 | 147403.16 | 147564.33 | 147719.93 |
| Medicamento de referencia | 1    | 147078.88 | 147239.94 | 147401.20 | 147561.50 | 147703.50 |
|                           | 2    | 147079.84 | 147241.70 | 147403.41 | 147564.44 | 147714.27 |
|                           | 3    | 147079.24 | 147240.30 | 147401.73 | 147562.33 | 147703.71 |

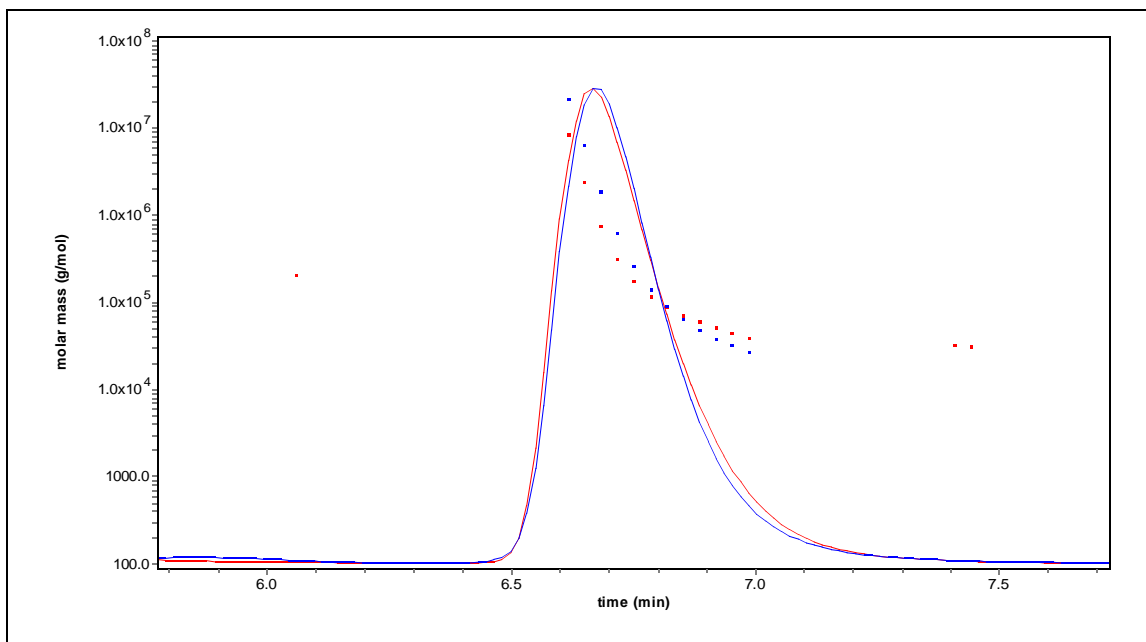
Puede observarse que las masas obtenidas para Rituximab-Biocomparable y el medicamento de referencia coinciden con diferencias menores al 0.02 %, con respecto de sí mismas y con respecto de la masa teórica esperada. Tal valor es la diferencia estándar a obtener en el análisis de una proteína como Rituximab-Biocomparable, toda vez que la suma de las distintas masas de los isótopos atómicos que la componen reside dentro de este valor<sup>[31]</sup>.

## Estructura

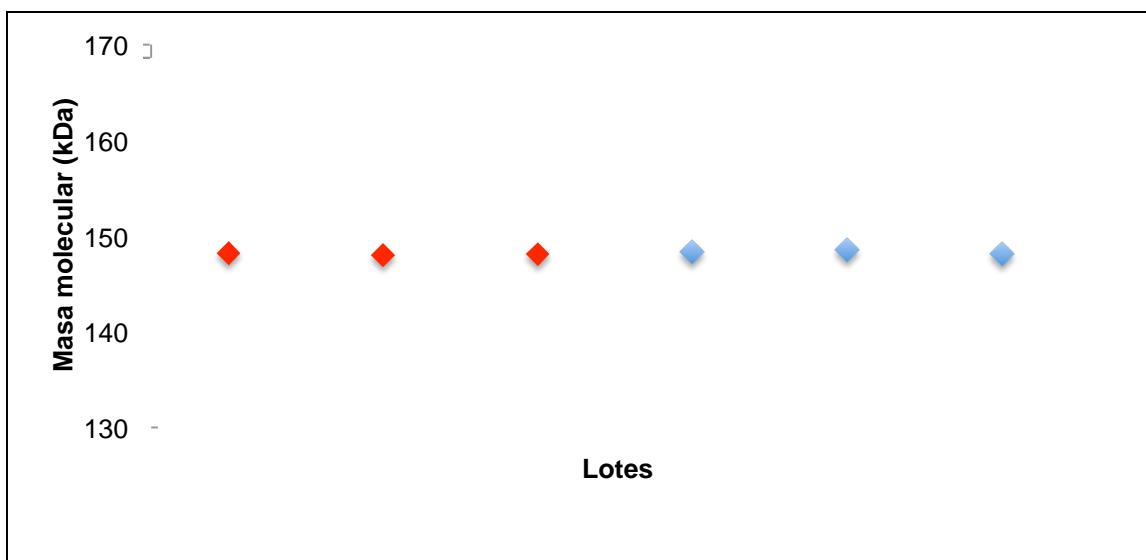
Para un producto biotecnológico como Rituximab-Biocomparable, es necesario establecer su identidad, tanto como especie química (secuencia de aminoácidos), como por su estructura tridimensional. Esta última, responsable de las funciones biológicas en el reconocimiento de su blanco: CD20 (proteína transmembranal de linfocitos B maduros), cuando se considera su fragmento de unión al antígeno (Fab por sus siglas en inglés); así como a los diferentes receptores y proteínas (FcγRI, RII y RIII) involucrados en sus mecanismos de acción (CDC y ADCC) por medio de su fracción cristalizable (Fc, por sus siglas en inglés).

Las técnicas y metodologías para determinar la estructura tridimensional de una proteína, ampliamente utilizadas en la industria biofarmacéutica, aceptadas en guías regulatorias y empleadas por la comunidad científica, incluyen: análisis de dispersión de luz para conocer el tamaño y la masa promedio (QELS y MALS, por sus siglas en inglés); espectroscopía de fluorescencia por conteo individual de fotones correlacionados en el tiempo para determinar cambios relativos en el plegamiento (TCSPC, por sus siglas en inglés); espectroscopia de dicroísmo circular para confirmar su estructura secundaria y terciaria (CD, por sus siglas en inglés); cuantificación de tioles libres para establecer cambios de conformación debidos a la ruptura de puentes disulfuro y oxidación de residuos de cisteína y calorimetría diferencial de barrido para conocer la estabilidad térmica de la estructura debida a fuerzas de Van der Waals, fuerzas dispersivas de London y puentes de hidrógeno (DSC, por sus siglas en inglés).

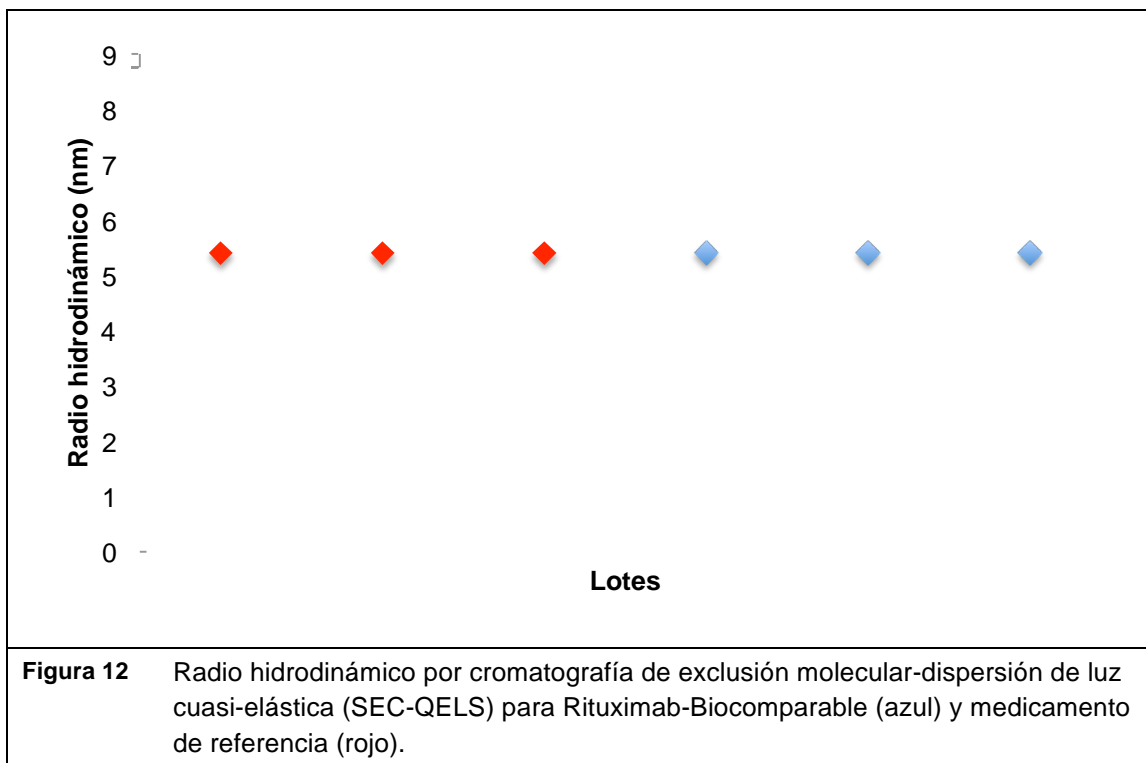
La masa molar absoluta de Rituximab-Biocomparable obtenida por el análisis por SE-UPLC-UV-MALS-RI fue similar con respecto de su medicamento de referencia (Figura 10); en correspondencia con los resultados obtenidos por espectrometría de masas y con la literatura<sup>[32]</sup> (Figura 11). De igual manera, los valores de radio hidrodinámico corresponden con los valores reportados para una inmunoglobulina del isotipo IgG, tanto para Rituximab-Biocomparable, como para su medicamento de referencia<sup>[33]</sup> (Figura 12). Lo anterior, indicativo de una misma conformación estructural.



**Figura 10** Cromatografía de exclusión molecular-dispersión de luz multi-ángulo (SEC-MALS) para Rituximab-Biocomparable(azul) y medicamento de referencia (rojo).

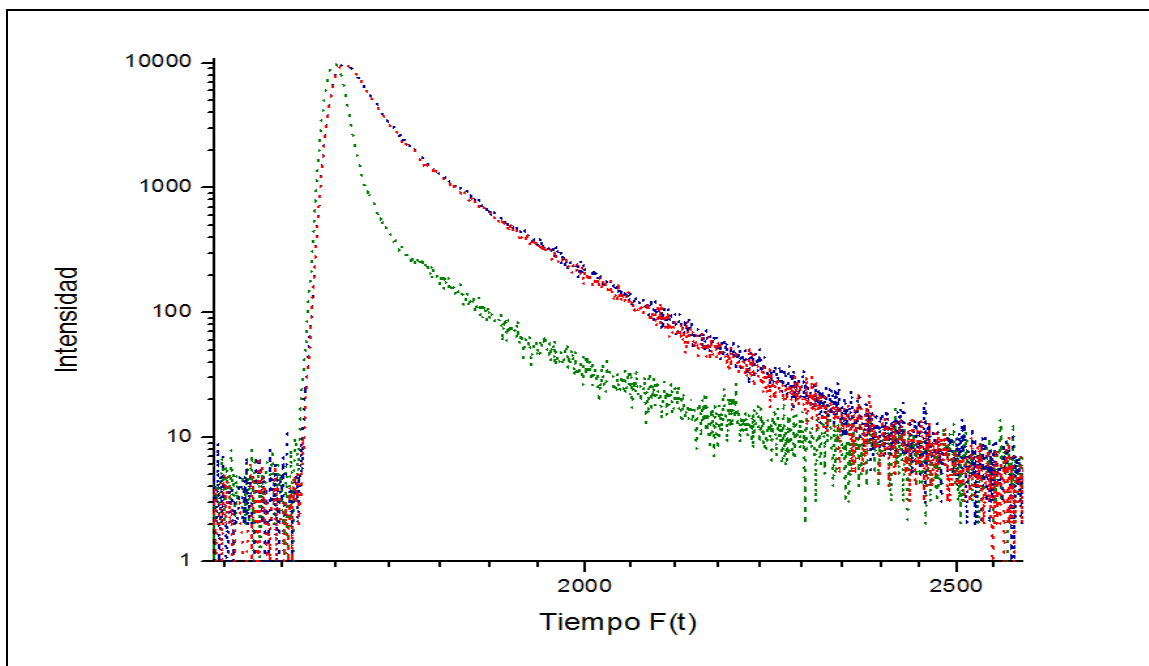


**Figura 11** Masa molecular (Da) determinada por cromatografía de exclusión molecular-dispersión de luz multi-ángulo (SEC-MALS) para distintos lotes de Rituximab-Biocomparable (azul) y medicamento de referencia (rojo).

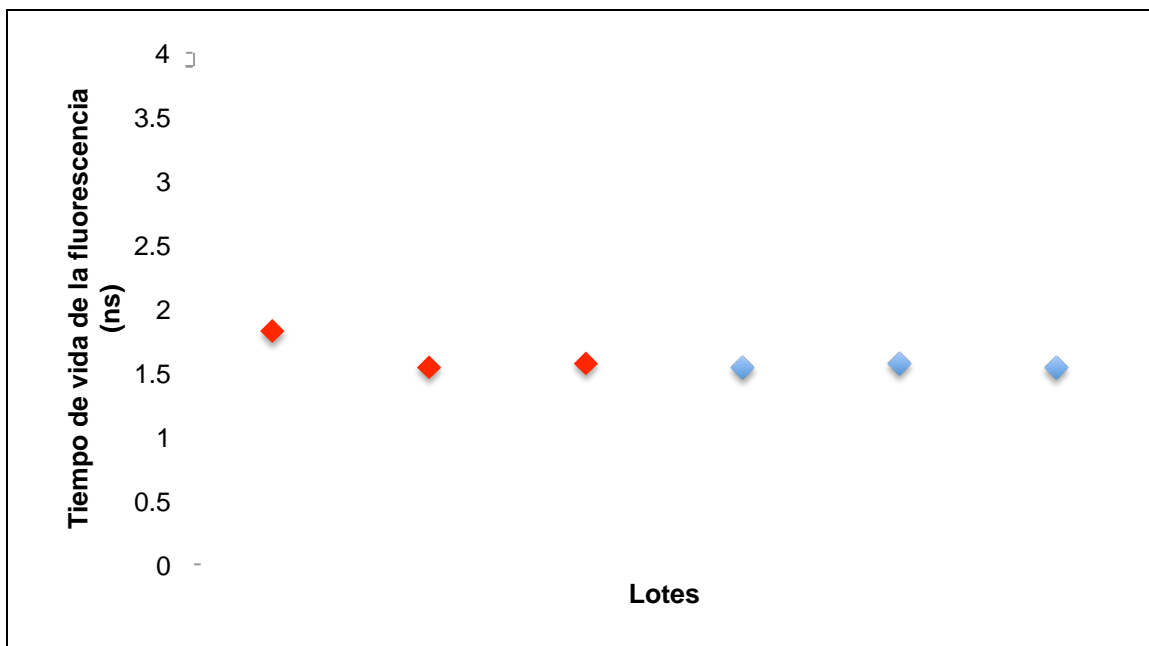


Lo anterior es confirmado mediante el estudio de la cinética del decaimiento en la fluorescencia intrínseca de la proteína (TCSPC, por sus siglas en inglés).

En la figura 13 se muestra un espectro típico de decaimiento de la fluorescencia para Rituximab-Biocomparable y su medicamento de referencia, en el cual puede observarse un comportamiento semejante entre ambas moléculas, indicativo de una misma disposición espacial de los residuos aromáticos que las conforman<sup>[25]</sup>. Asimismo se muestra el cálculo del tiempo de vida de la fluorescencia para ambos medicamentos (Figura 14).



**Figura 13** Espectros de decaimiento de fluorescencia para Rituximab-Biocomparable(azul) y medicamento de referencia (rojo); blanco (verde).

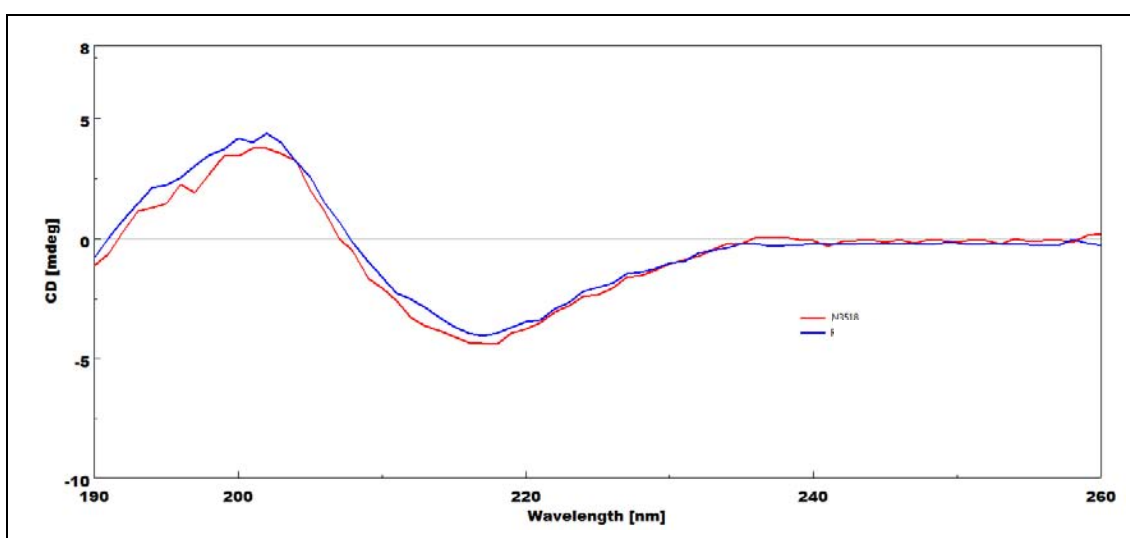


**Figura 14** Tiempo de vida de fluorescencia en nanosegundos por conteo individual de fotones correlacionados en el tiempo (TCSPC) para Rituximab-Biocomparable (azul), medicamento de referencia (rojo).

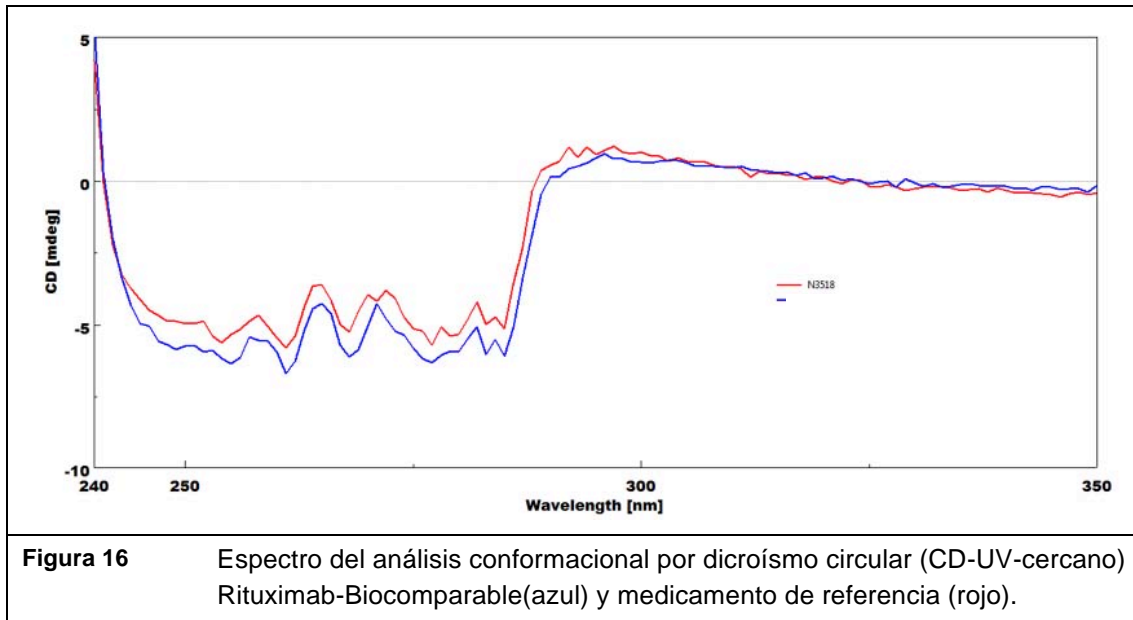
Por otro lado, el análisis por espectroscopía de dicroísmo circular reveló una abundancia y disposición semejante entre las diferentes estructuras



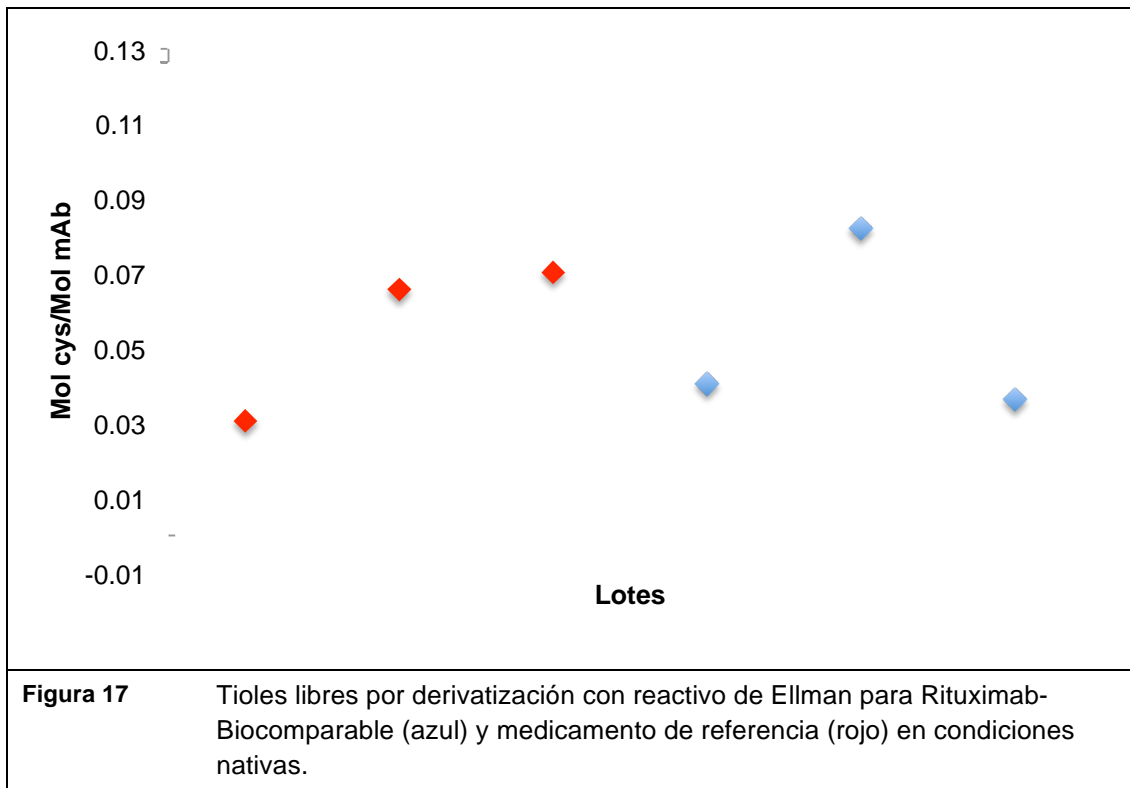
secundarias que presentan Rituximab-Biocomparable y su medicamento de referencia (hélices alfa, betas plegadas, giros y plegamiento al azar). Lo anterior es reflejado en una misma respuesta en los patrones de absorción diferencial de luz polarizada (Figura 15 y Figura 16). Por lo que ésta técnica ortogonal revela, tanto igual disposición espacial de los aminoácidos que constituyen a Rituximab-Biocomparable como una misma estabilidad en solución<sup>[34]</sup>, demostrando comparabilidad respecto de su estructura tridimensional.



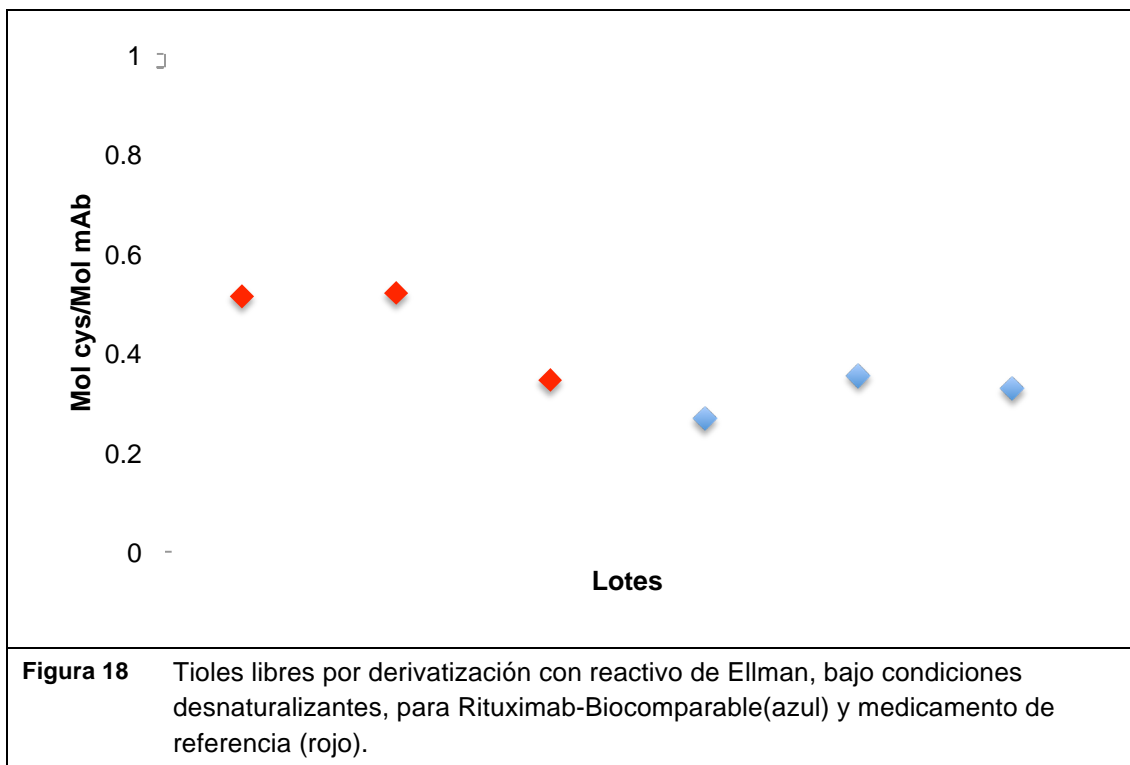
**Figura 15** Espectro de la absorbancia diferencial por dicroísmo circular (UV lejano). Se muestra el espectro de Rituximab-Biocomparable (línea azul) y medicamento de referencia (línea roja).



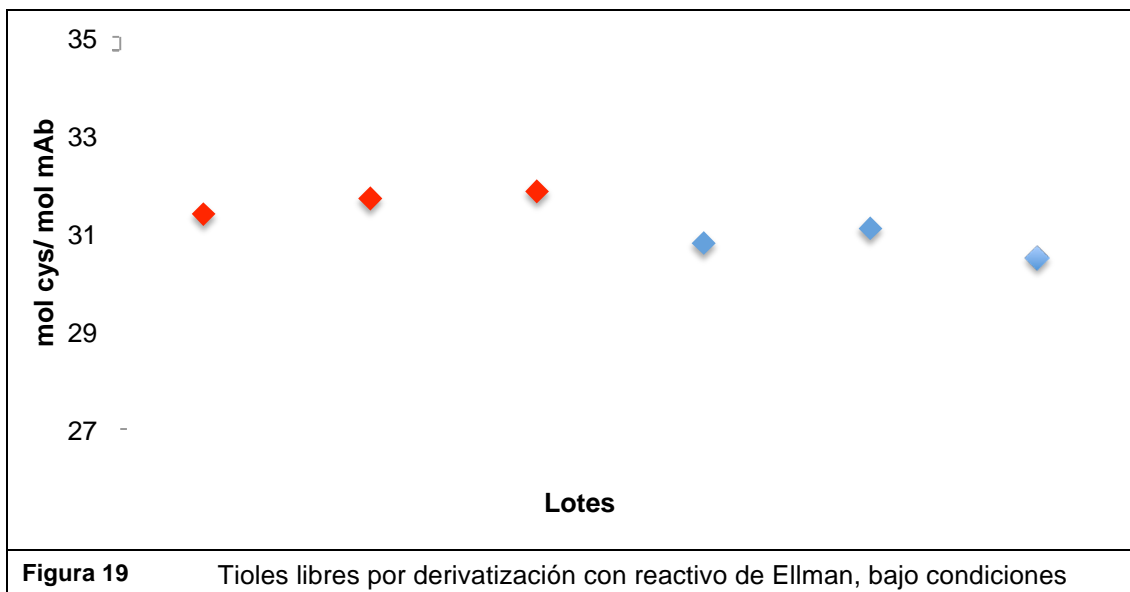
En la figura 17 se muestran los valores de grupos tiol libres en relación molar a rituximab para tres diferentes lotes de Rituximab-Biocomparable y medicamento de referencia en condiciones nativas, el cual indica la cantidad de tioles libres disponibles en la superficie de rituximab. Puede observarse, además de comparabilidad entre los productos, que ambos presentan una adecuada conformación y plegamiento, contribuyendo a su estabilidad en solución. Todo ello acorde a los valores reportados para anticuerpos monoclonales en productos comerciales, de 0.02 a 1.35 mol Cys/mol mAb<sup>[35, 36]</sup>.



En la figura 18, se observan los valores obtenidos en el análisis realizado bajo condiciones desnaturalizantes, en donde se cuantifican los tioles libres en el interior de la rituximab ocultos al solvente por efecto estérico, donde se observan asimismo valores análogos entre Rituximab-Biocomparable y su medicamento de referencia.

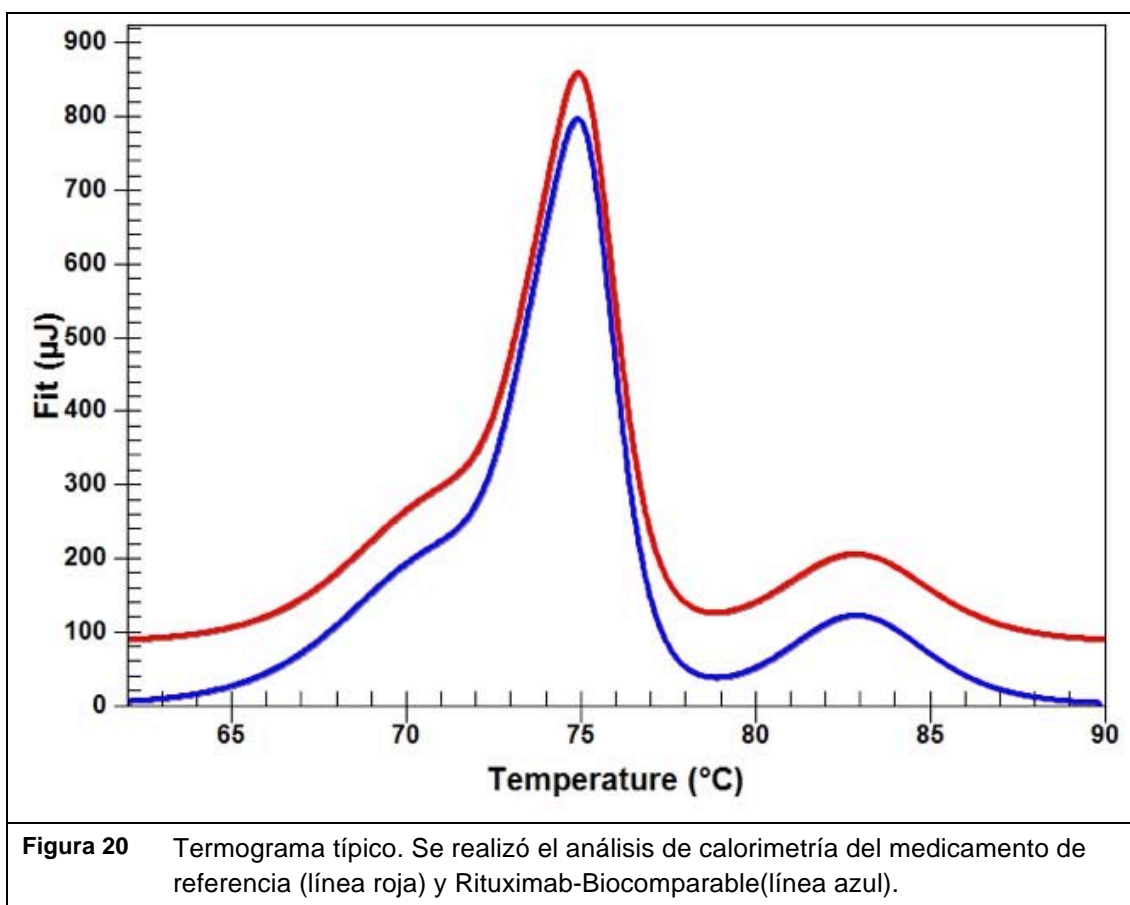


En la Figura 19 se muestran los resultados del análisis realizado bajo condiciones reductoras en donde se muestra la cantidad total de cisteínas contenidas en rituximab. De modo que esta prueba es una muestra de la identidad de una proteína, si se obtiene el número de cisteínas esperadas por la secuencia de aminoácidos.

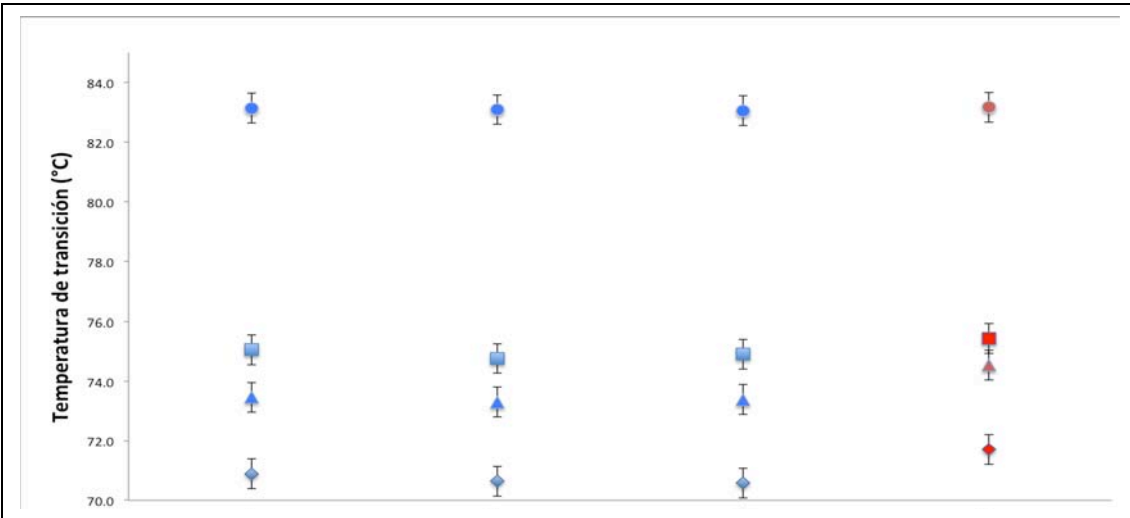


reductoras, para Rituximab-Biocomparable(azul) y medicamento de referencia (rojo).

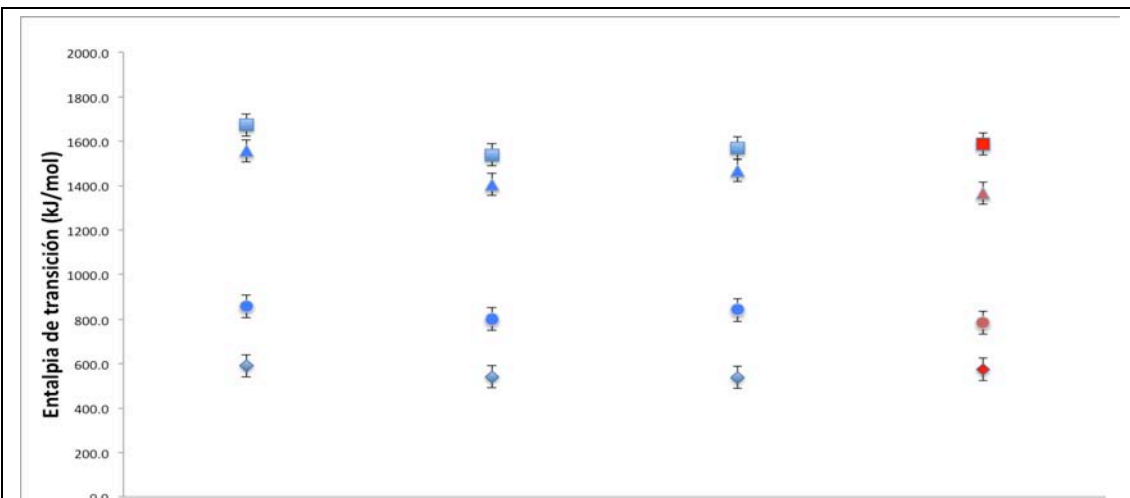
Finalmente, en las figuras 20 a 22 se muestran cada una de las temperaturas de transición y entalpías obtenidas por calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) para diferentes lotes Rituximab-Biocomparable y medicamento de referencia. La similitud observada para dichos atributos resulta de la misma composición y secuencia proteica entre Rituximab-Biocomparable y medicamento de referencia, corresponsables de la formación de fuerzas de Van der Waals, dispersivas de London y puentes de hidrógeno contenidos en una proteína, mismas que determinan su estabilidad termodinámica.



**Figura 20** Termograma típico. Se realizó el análisis de calorimetría del medicamento de referencia (línea roja) y Rituximab-Biocomparable(línea azul).



**Figura 21** Temperaturas de transición características en lotes de Rituximab-Bioequivalente (azul) y medicamento de referencia (rojo).



**Figura 22** Entalpías de transición características en lotes de Rituximab-Bioequivalente (azul) y medicamento de referencia (rojo).

La comparabilidad de la identidad física entre Rituximab-Bioequivalente y su medicamento de referencia se evidenció mediante la correspondencia de aquellos atributos que nos proporcionan información acerca de la estructura de este anticuerpo monoclonal, como su tamaño y masa molecular determinados por SE-UPLC-UV-MALS-QELS-RI, estructura tridimensional por espectroscopía de fluorescencia, estructura secundaria y terciaria por dicroísmo circular,

estructura terciaria por contenido de tioles libres, y su estabilidad térmica por calorimetría diferencial de barrido.

La correcta estructura tridimensional de un anticuerpo es fundamental para que lleve a cabo su función biológica, desde la unión a su antígeno CD20 en los linfocitos B maduros, hasta la unión a los receptores responsables de su acción.

El análisis de comparabilidad estructural entre Rituximab-Biocomparable y su medicamento de referencia, muestra que ambos productos tienen una estructura primaria idéntica y un alto grado de similitud en su estructura secundaria y terciaria.

## **5. 2 Heterogeneidad**

El ejercicio de comparabilidad incluyó, además de la evaluación de la estructura química y física a entre Rituximab-Biocomparable y el medicamento de referencia, la evaluación de la diversidad de especies presentes en ambos productos. Esto debido a que rituximab, una inmunoglobulina quimérica murino-humana, está conformada por un grupo de isoformas que pueden distinguirse por sus diferencias en carga, masa, tamaño, forma, momento del dipolo molecular y punto isoeléctrico, que en conjunto constituyen su perfil de heterogeneidad.

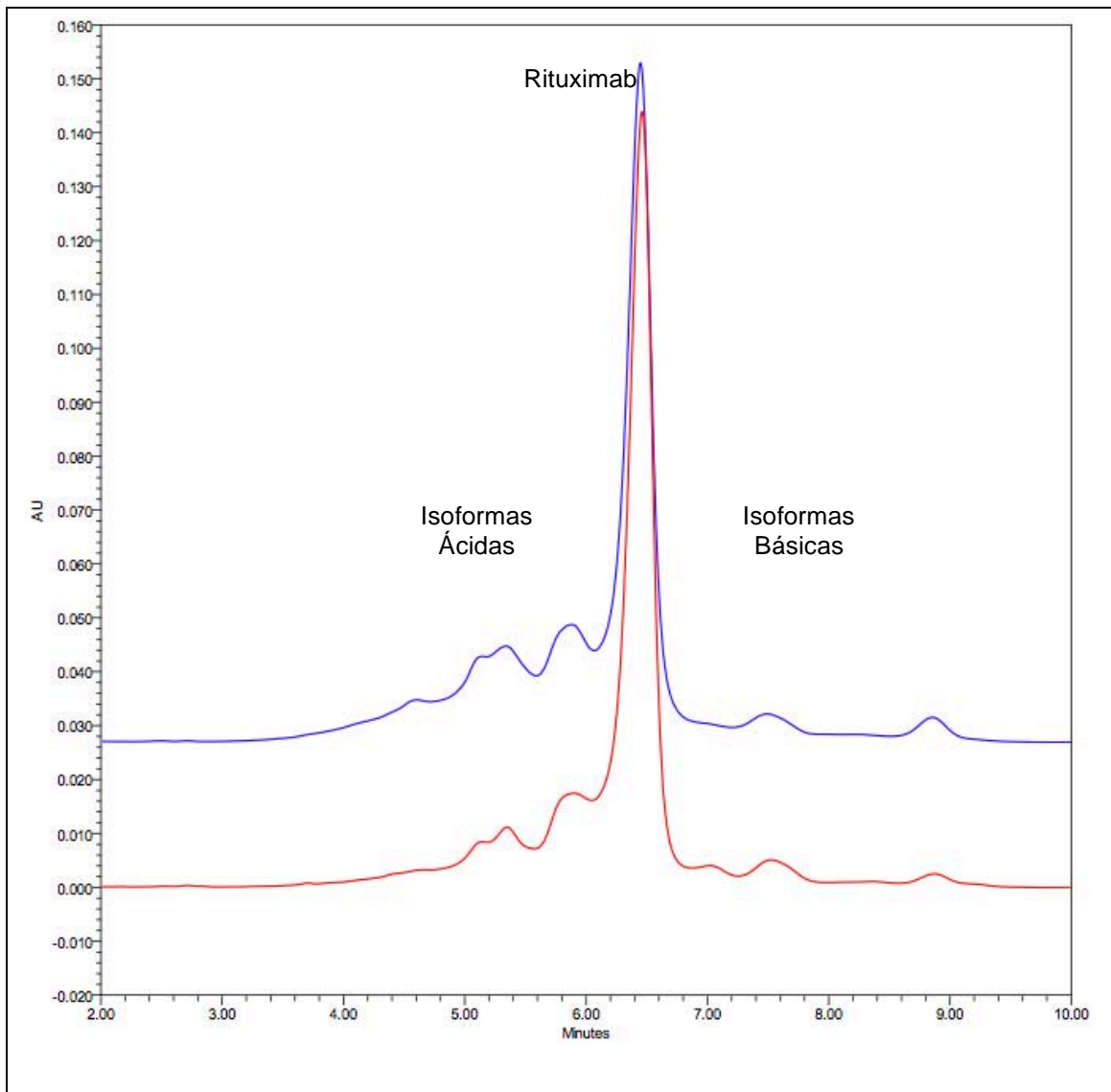
A continuación, se discuten aquellos atributos de rituximab, consecuencia de cada una de las modificaciones postraduccionales y fisicoquímicas esperadas para un anticuerpo monoclonal desde su biosíntesis hasta el término de su vida de anaquel, que en conjunto describen el atributo conocido como heterogeneidad, relacionándolos con la seguridad y eficacia del medicamento bioterapéutico.

### 5.2.1 Heterogeneidad de carga

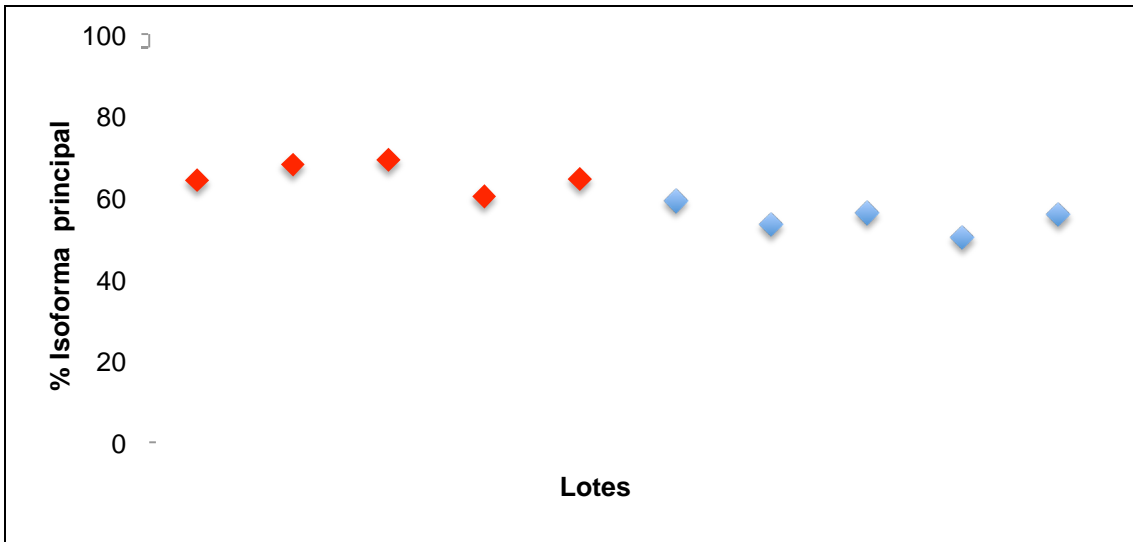
Uno de los atributos de calidad mas relevantes a evaluar con respecto de la estabilidad y eficacia de un anticuerpo monoclonal, es su heterogeneidad de carga eléctrica. Cada una de las modificaciones con efecto en la constante de disociación ácida, densidad de carga eléctrica y momento del dipolo, de los grupos funcionales que lo componen, pueden afectar las interacciones, tanto electrostáticas como de efecto hidrófobo (entrópico) y fuerzas de Van der Waals, contra los fosfolípidos de la superficie celular, su blanco terapéutico y los receptores encargados de su actividad terapéutica y estabilidad en torrente sanguíneo<sup>[37]</sup>.

A continuación se presentan los resultados obtenidos por cromatografía de intercambio catiónico (CEX, por sus siglas en inglés) en forma comparativa para diferentes lotes de Rituximab-Biocomparable y su medicamento de referencia. Se muestran las figuras del cromatograma tipo (Figura 23), a partir del cual se obtienen los valores porcentuales para cada una de las variantes de carga, así como las gráficas comparativas con los valores porcentuales observados lote a lote para Rituximab-Biocomparable y su medicamento de refererencia para la isoforma principal (Figura 24), sus isoformas básicas (aminación, Lys C-Terminal, ciclaciones, isomerizaciones) (Figura 25) o ácidas (oxidaciones, deamidaciones, glucosilación, adición de ácidos siálicos) (Figura 26).

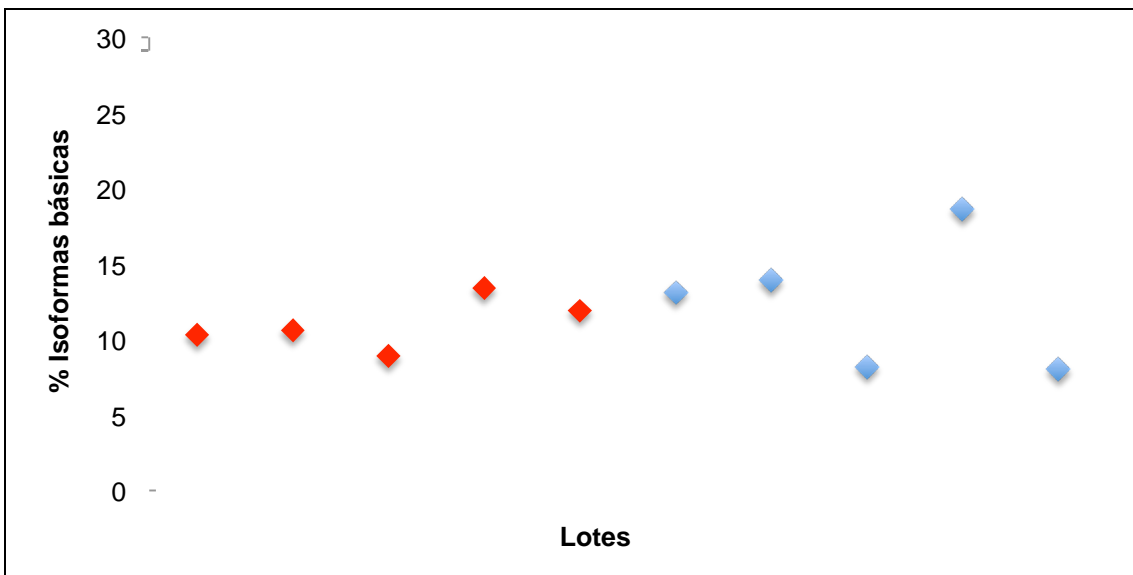




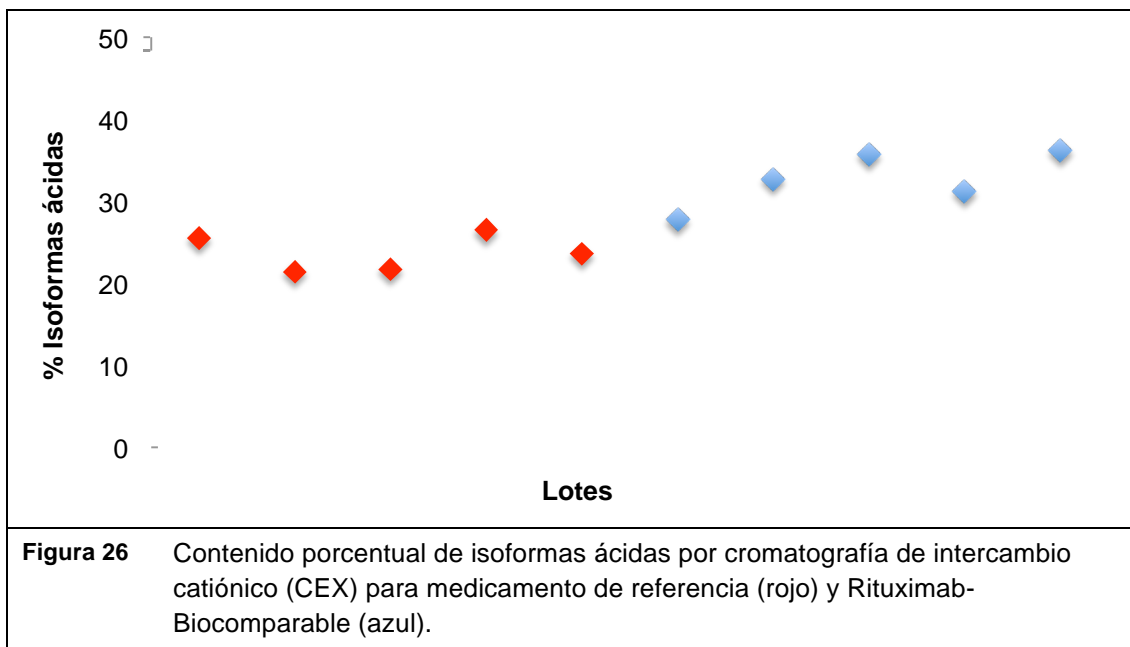
**Figura 23** Perfil cromatográfico tipo por cromatografía de intercambio catiónico (CEX) para medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Biocomparable (azul).



**Figura 24** Contenido porcentual de isoforma principal por cromatografía de intercambio catiónico (CEX) para medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Biocomparable(azul).



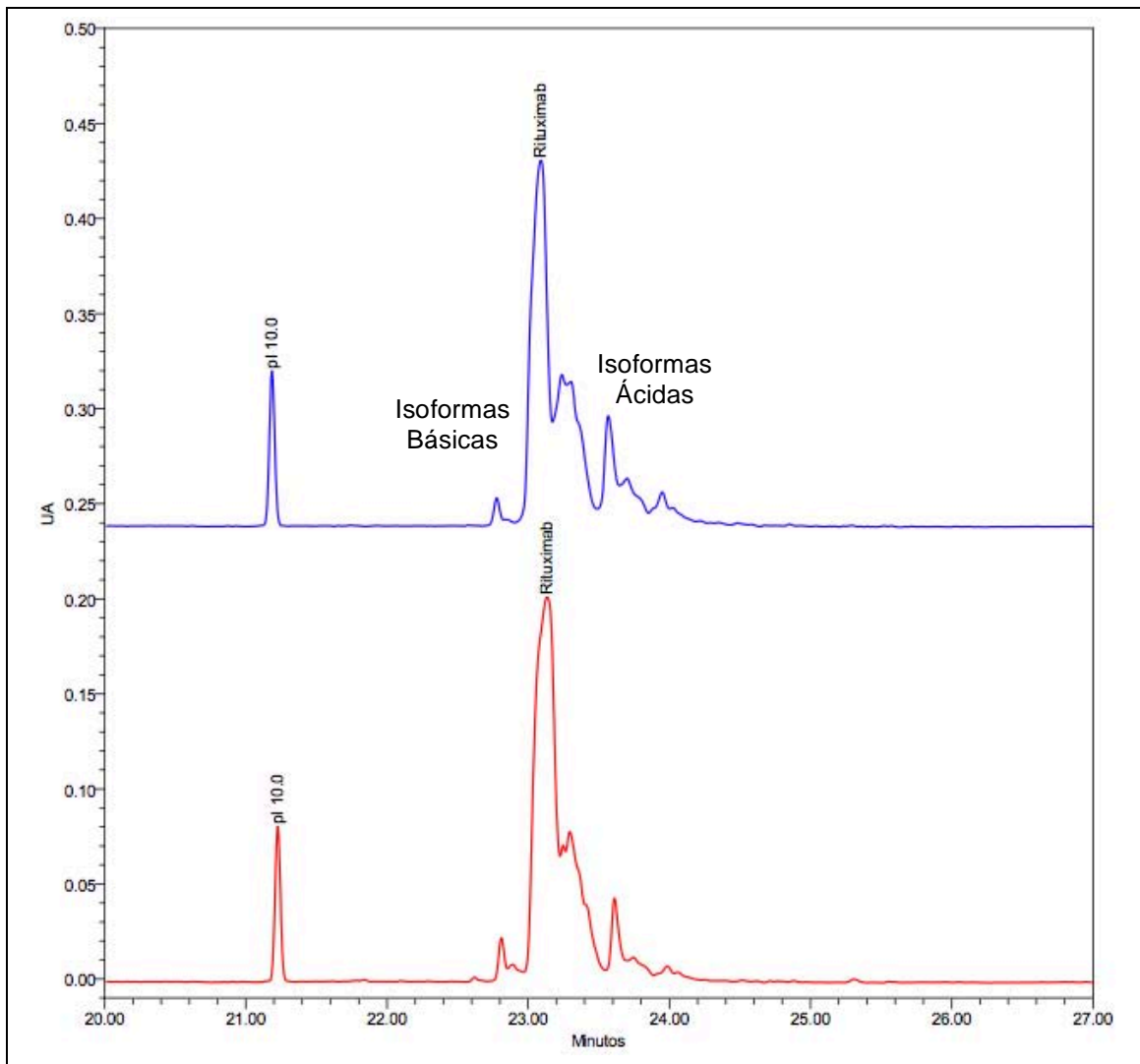
**Figura 25** Contenido porcentual de isoformas básicas por cromatografía de intercambio catiónico (CEX) para medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Biocomparable (azul).



Los resultados anteriores muestran que la heterogeneidad de carga presente en Rituximab-Biocomparable, es similar respecto de la observada en el medicamento de referencia. Si bien pueden detectarse algunas diferencias, éstas son parte de la oscilación natural de este atributo en este anticuerpo monoclonal, y no representan impacto alguno en la seguridad y eficacia del medicamento, según se observa en la evaluación de las propiedades funcionales de Rituximab-Biocomparable. Estos resultados coinciden con lo reportado por otros grupos de investigación<sup>[37]</sup>, en el sentido que las modificaciones de carga forman parte de un producto sin que ello se refleje en un impacto en su función, siempre que dichas variantes, principalmente las variantes ácidas, no se encuentren en una abundancia relativa mayor a la isoforma principal, donde se ha observado un impacto en la potencia cuando el contenido de isoformas ácidas para un anticuerpo monoclonal excede el 60 %<sup>[37]</sup>.

De igual forma, se ha señalado que las modificaciones de carga pueden causar diferencias que afectan el comportamiento global del

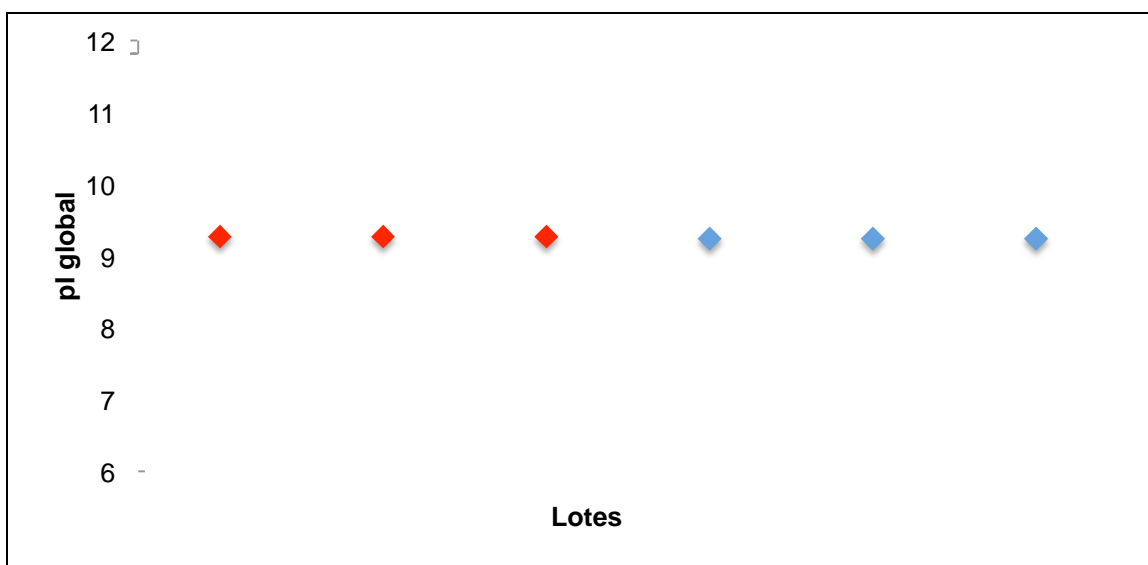
anticuerpo, como el valor de su punto isoeléctrico (pI) pueden variar hasta un 0.5%, sin que ello represente un efecto adverso a la seguridad y eficacia<sup>[38,39]</sup>. En el caso de Rituximab-Biocomparable, el punto isoeléctrico determinado por isoelectroenfoque capilar (cIEF por sus siglas en inglés), no muestra diferencias con respecto del medicamento de referencia. En la figura 27 se muestra el electroferograma tipo para el análisis de variantes de carga y punto isoeléctrico por cIEF, en modo comparativo para Rituximab-Biocomparable y su medicamento de referencia, así como el análisis tanto del punto isoeléctrico de la forma principal (Figura 28), como el pI global (Figura 29), resultado del promedio de los pI de cada una de las isoformas de rituximab y su abundancia, con los datos provenientes de los diferentes lotes estudiados.



**Figura 27** Perfil electroforético tipo por isoelectroenfoque capilar (cIEF) para medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Biocomparable (azul).



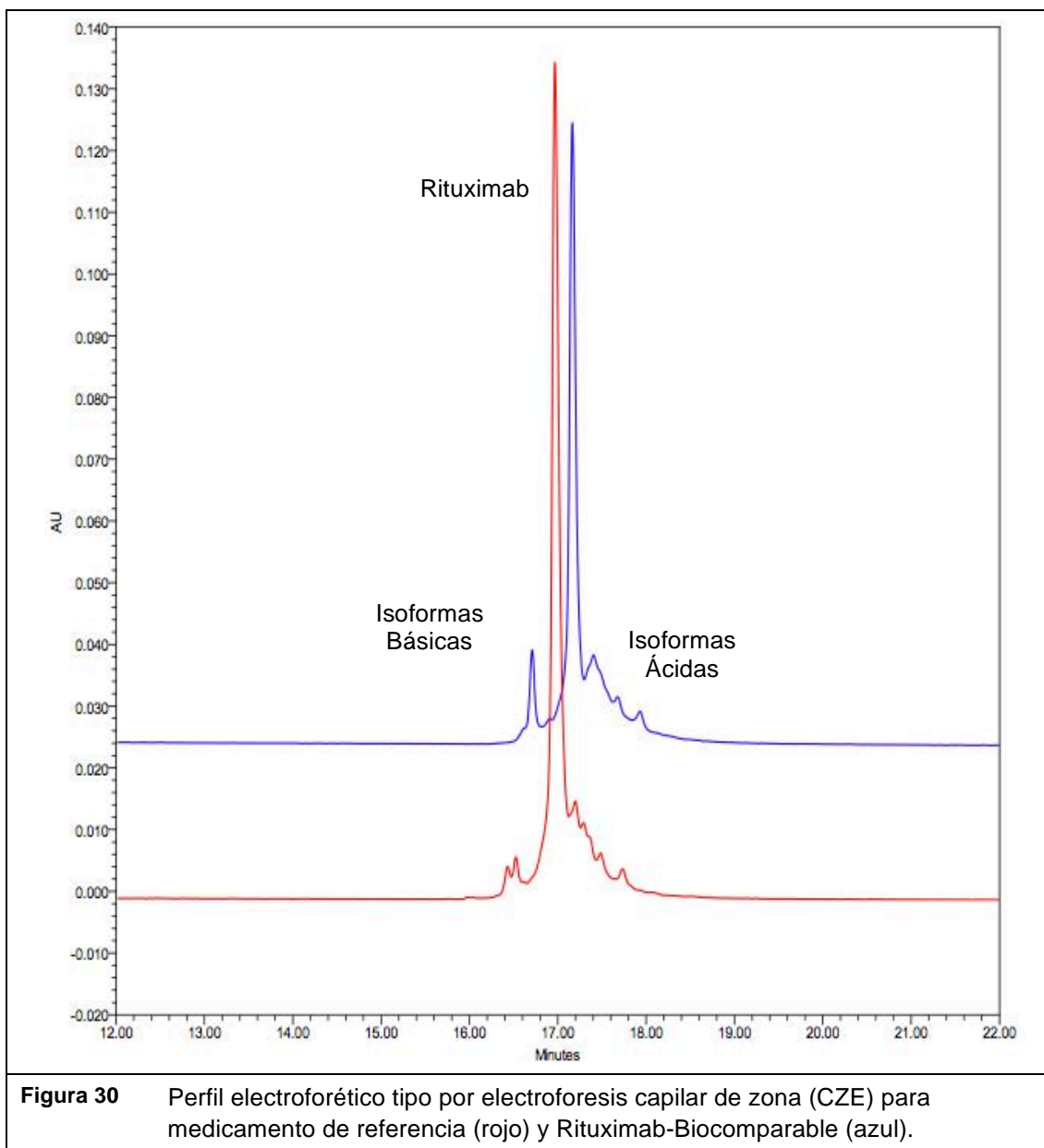
**Figura 28** Punto isoeléctrico de la isoforma principal por isoelectroenfoque capilar (cIEF) para el medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Biocomparable (azul).

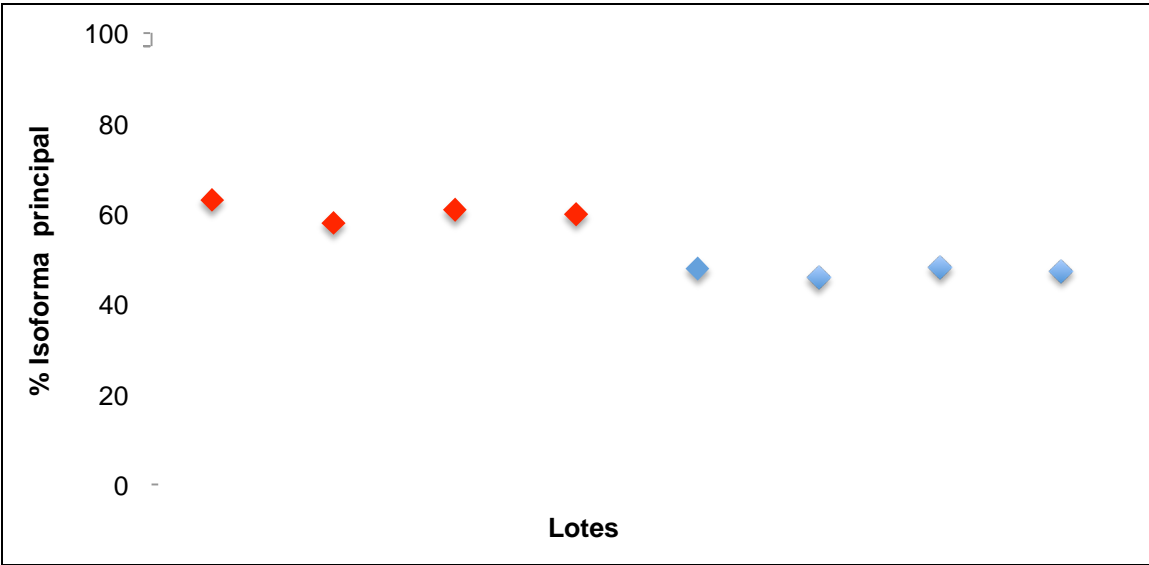


**Figura 29** Punto isoeléctrico global por isoelectroenfoque capilar (cIEF) para el medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Biocomparable (azul).

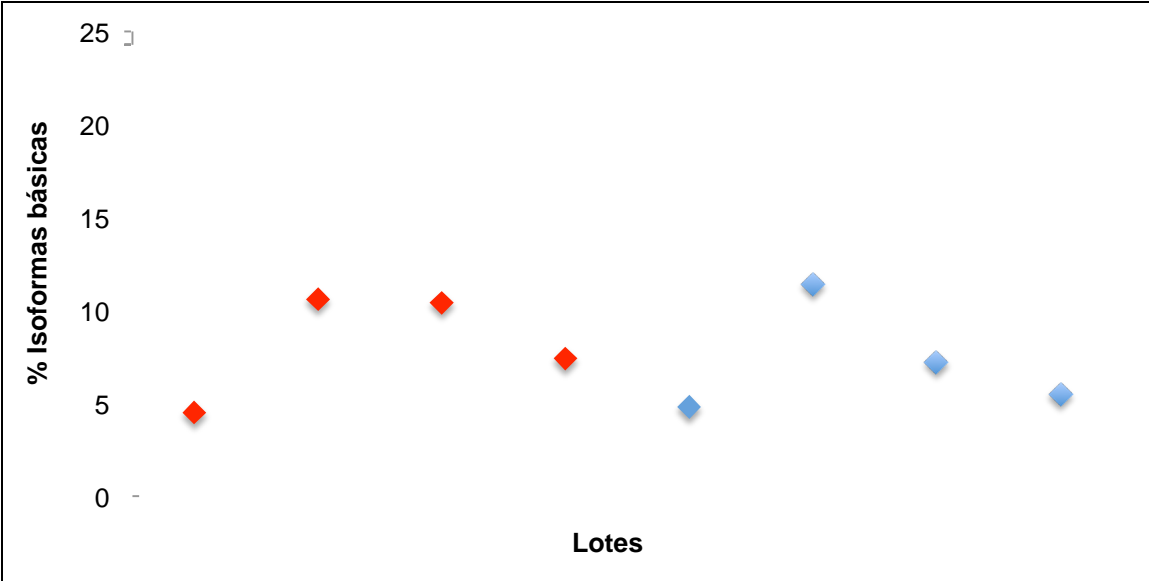
Los resultados anteriores son corroborados con el uso de técnicas ortogonales de separación, como CZE y HIC. Dichas técnicas son capaces de distinguir variantes de carga por cambios en el momento del dipolo y conformación espacial de Rituximab-Biocomparable, según el tipo, abundancia y sitio de alguna modificación<sup>[28]</sup>. A continuación se muestran los perfiles electroforéticos de Rituximab-

Biocomparable y su medicamento de referencia analizados por CZE (figura 30) y HIC (figura 34), lo mismo que los gráficos para cada una de las variantes que se distinguen por estas técnicas (figuras 31-33 y 35-37).



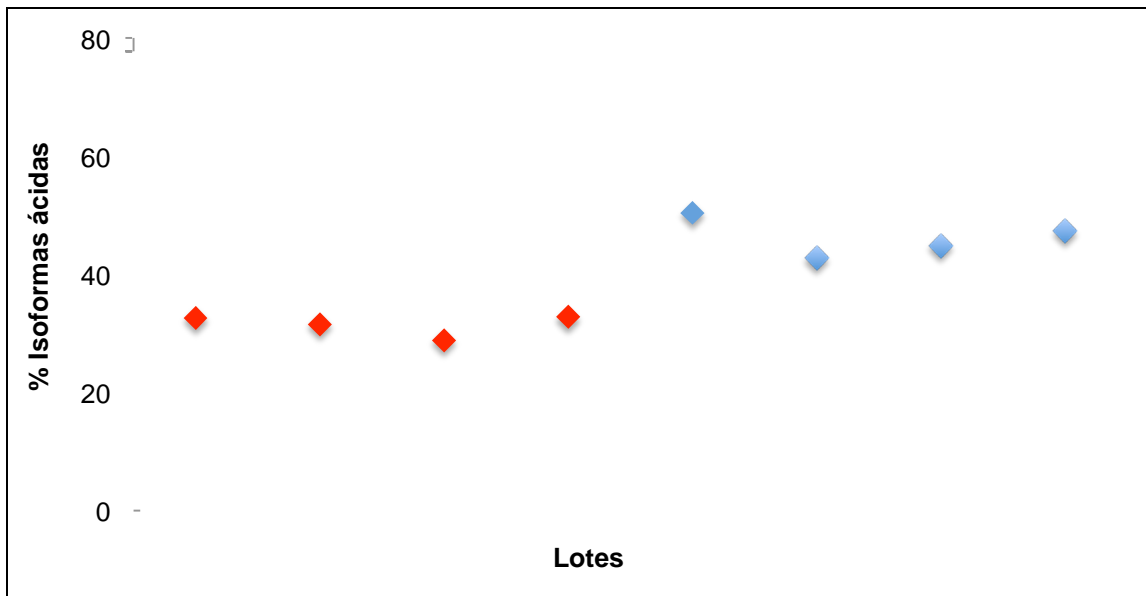


**Figura 31** Contenido porcentual de la isoforma principal por electroforesis capilar de zona (CZE) para medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Biocomparable (azul).

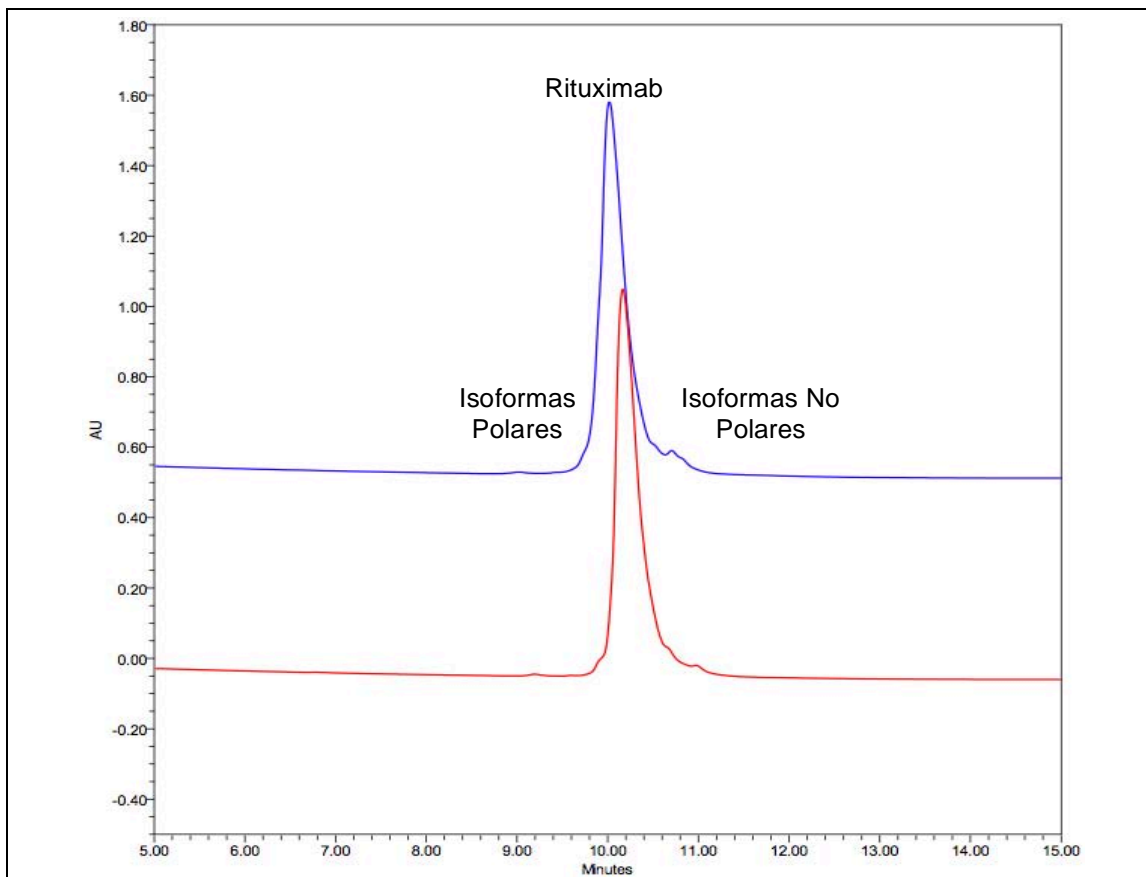


**Figura 32** Contenido porcentual de isoformas básicas por electroforesis capilar de zona (CZE) para medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Biocomparable (azul).

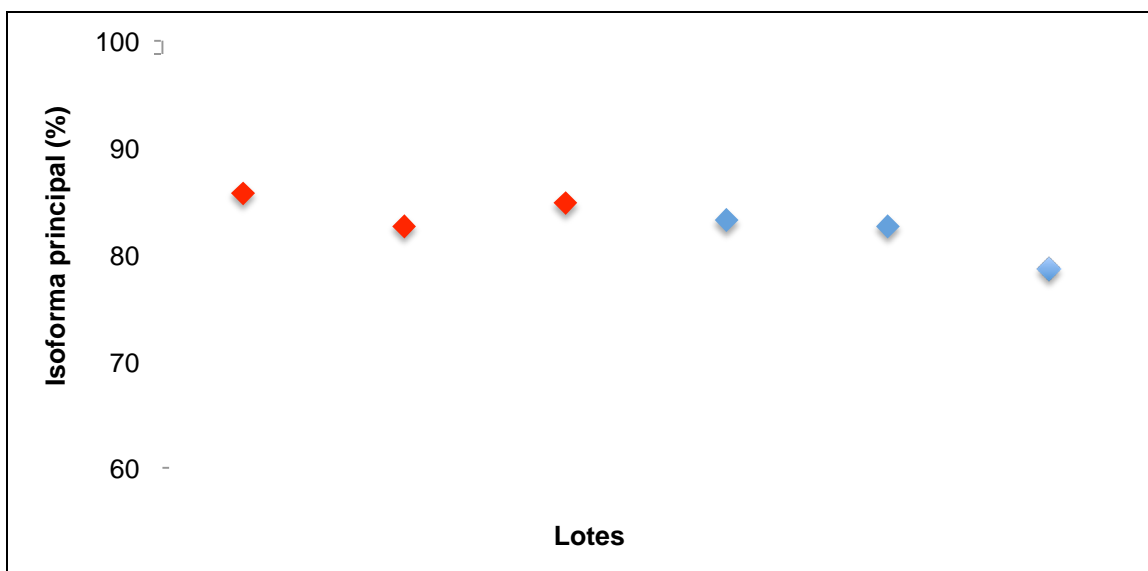




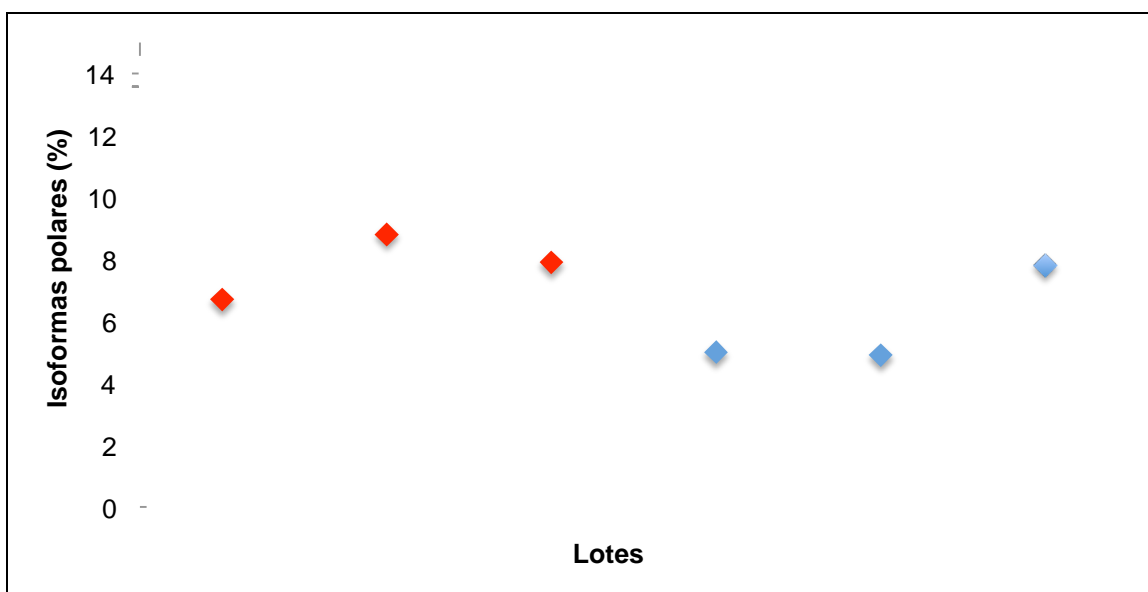
**Figura 33** Contenido porcentual de isoformas ácidas por electroforesis capilar de zona (CZE) para medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Biocomparable (azul).



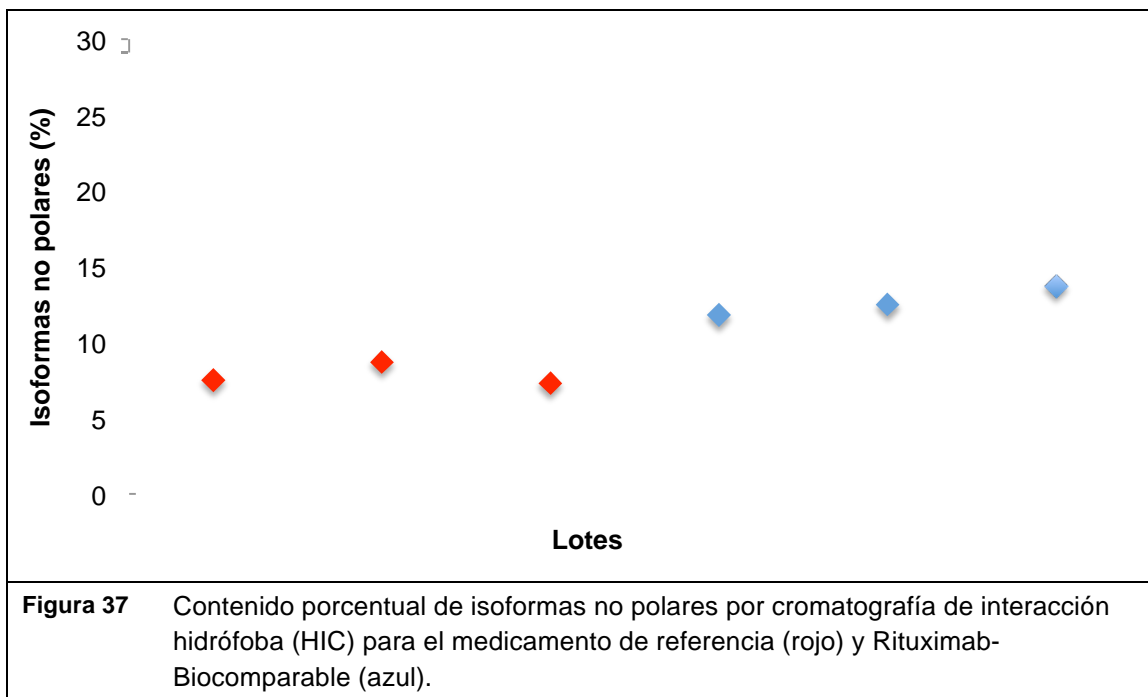
**Figura 34** Perfil cromatográfico tipo por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) de medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Biocomparable (azul).



**Figura 35** Contenido porcentual de la isoforma principal por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) para el medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Biocomparable (azul).

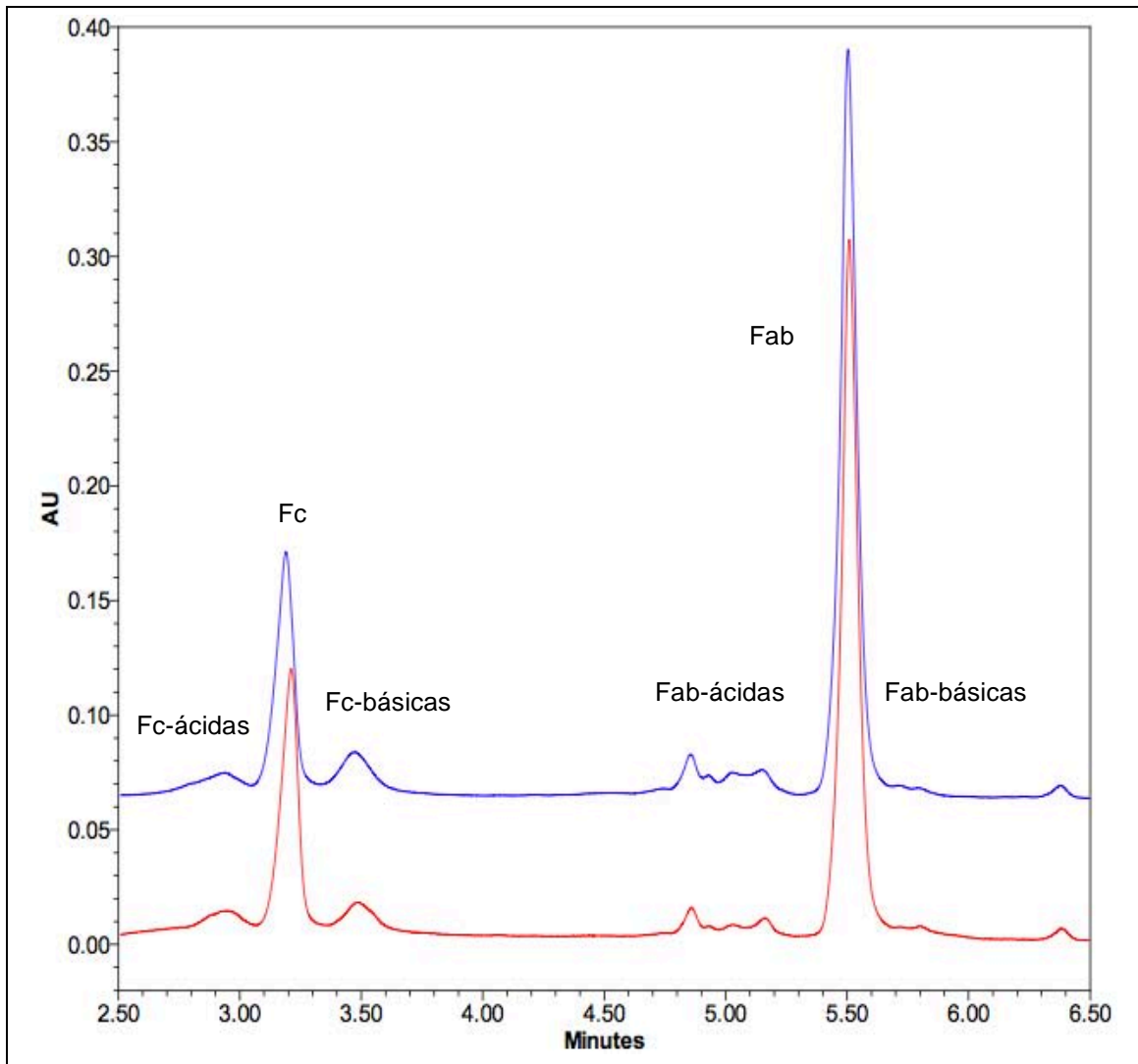


**Figura 36** Contenido porcentual de isoformas polares por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) para el medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Biocomparable (azul).



Asimismo, se realizó el análisis de cada uno de los fragmentos provenientes del anticuerpo monoclonal, con objeto de demostrar, en modo comparativo con su medicamento de referencia, que Rituximab-Biocomparable cuenta con las mismas modificaciones químicas y se encuentran en similar abundancia en cada región del anticuerpo, dígase: la fracción cristalizable (Fc, por sus siglas en inglés) y el fragmento de unión al antígeno (Fab, por sus siglas en inglés). Para tales efectos, ambas moléculas se sometieron a la acción enzimática con papaína. En la figuras 38 a 53 se muestran tanto los cromatogramas tipo, como los gráficos con la abundancia relativa de variantes ácidas y básicas para cada fragmento, analizados por cromatografía de intercambio catiónico (figuras 38 a 45) o cromatografía de interacción hidrófoba (figuras 46 a 53).

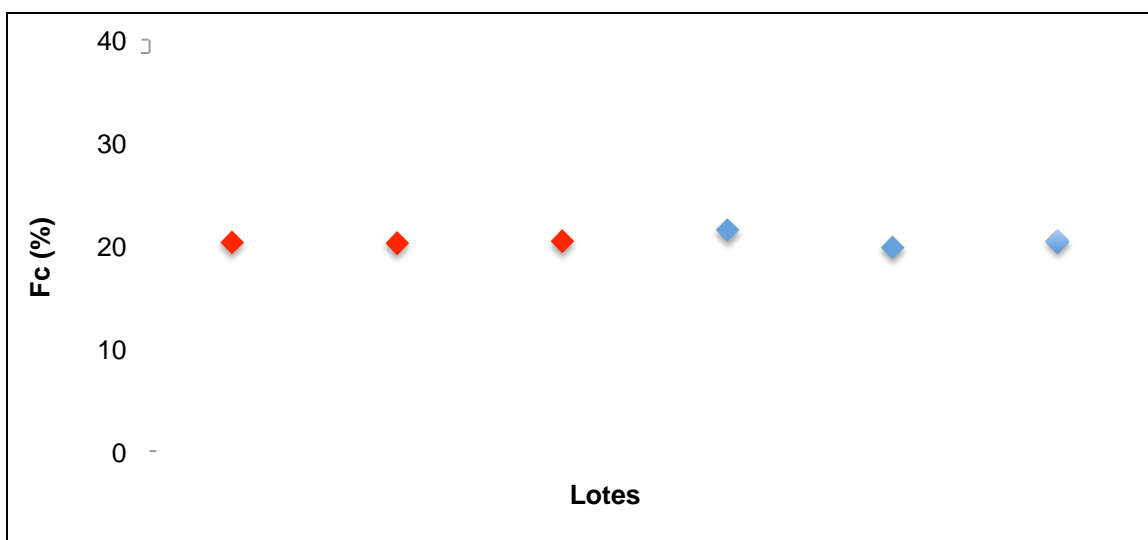
Como resultado, puede concluirse que existe comparabilidad de identidad química y conformacional, entre Rituximab-Biocomparable y su medicamento de referencia, evidenciadas por estas metodologías.



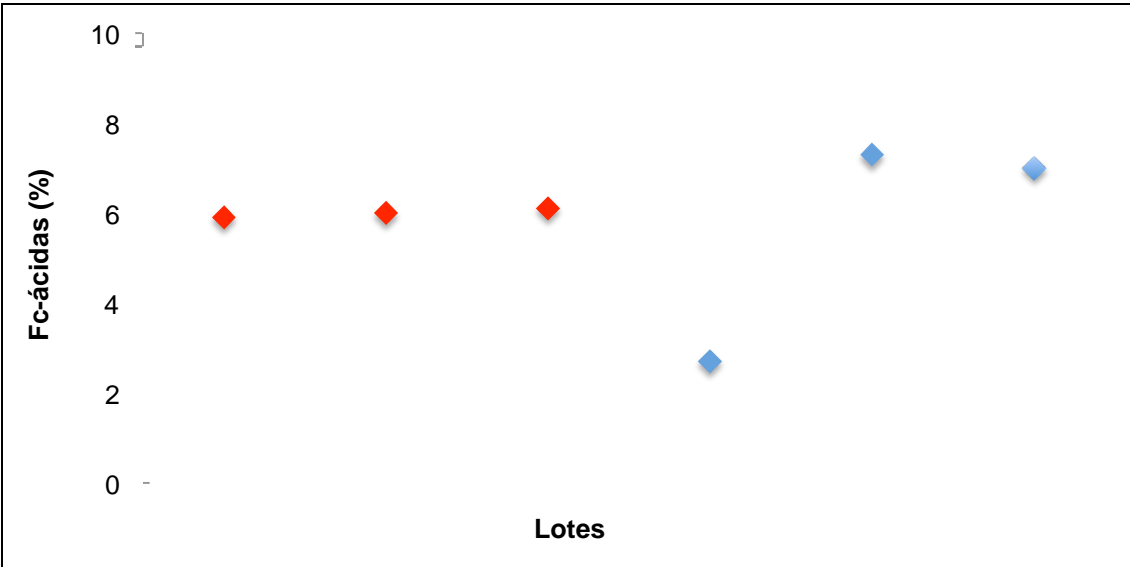
**Figura 38** Perfil cromatográfico tipo por cromatografía de intercambio catiónico (CEX) medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Biocomparable (azul) después de su digestión con papaína.



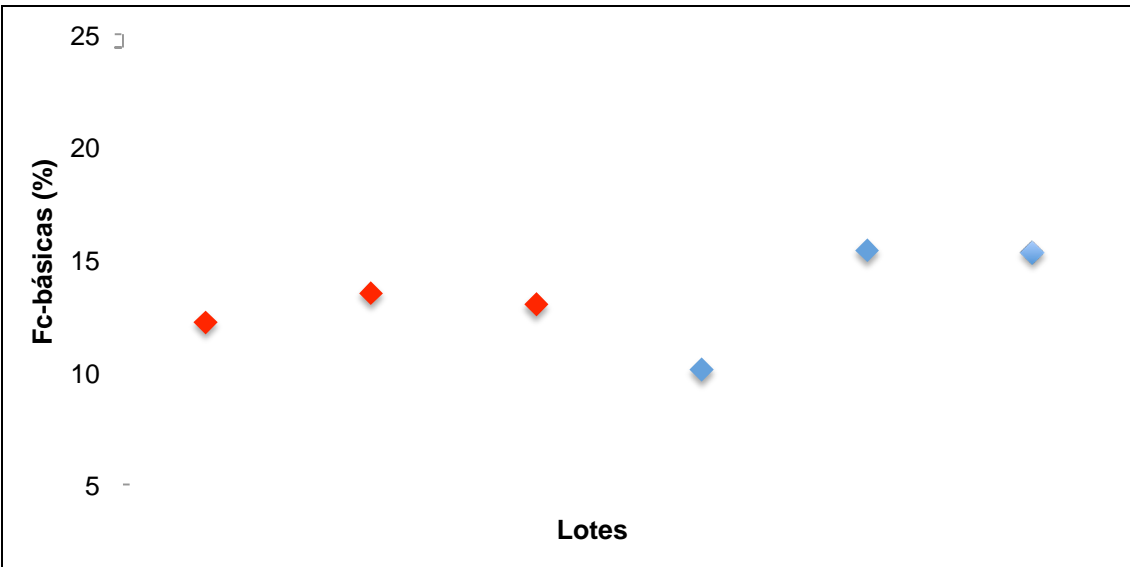
**Figura 39** Contenido de fragmentos Fc y Fab por cromatografía de intercambio catiónico (CEX) para medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Biocomparable (azul).



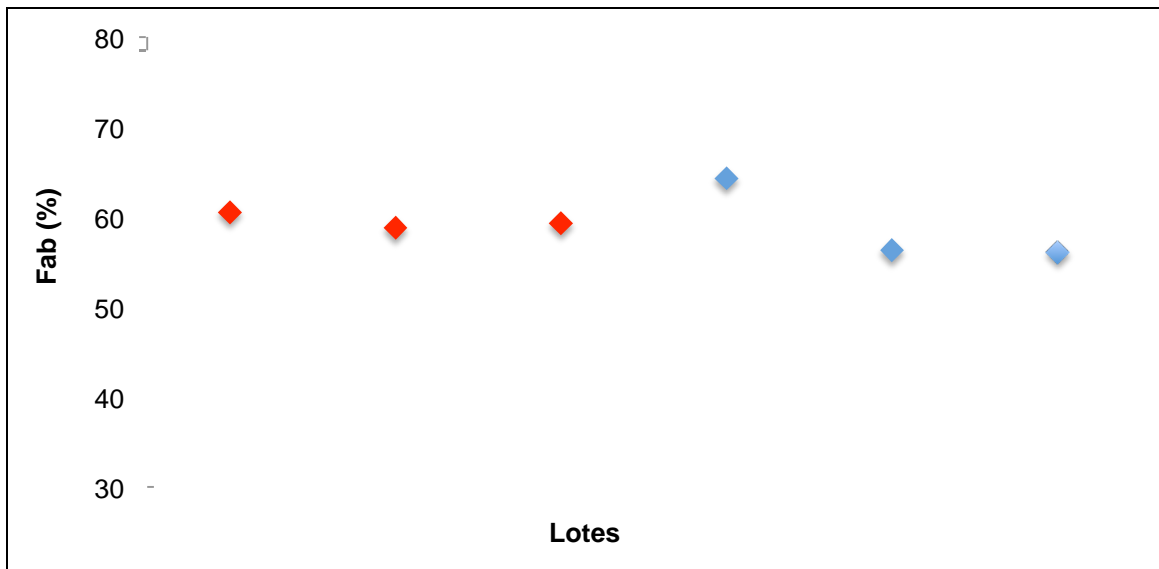
**Figura 40** Contenido de fragmento Fc (forma principal) por cromatografía de intercambio catiónico (CEX) para el medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Biocomparable (azul).



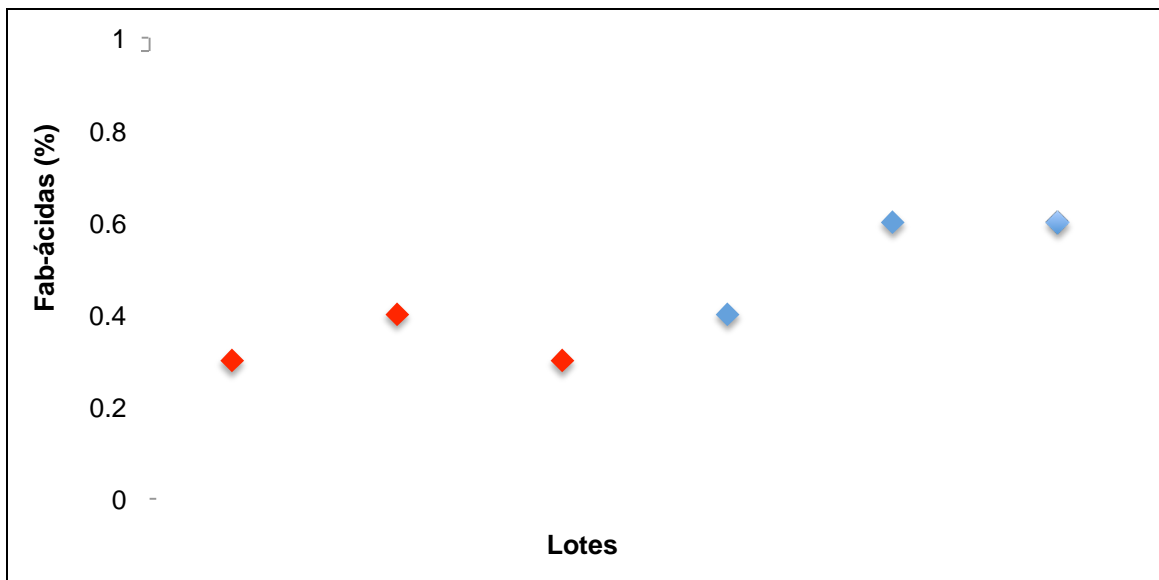
**Figura 41** Contenido de isoformas ácidas del fragmento Fc por cromatografía de intercambio catiónico (CEX) para el medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Biocomparable (azul).



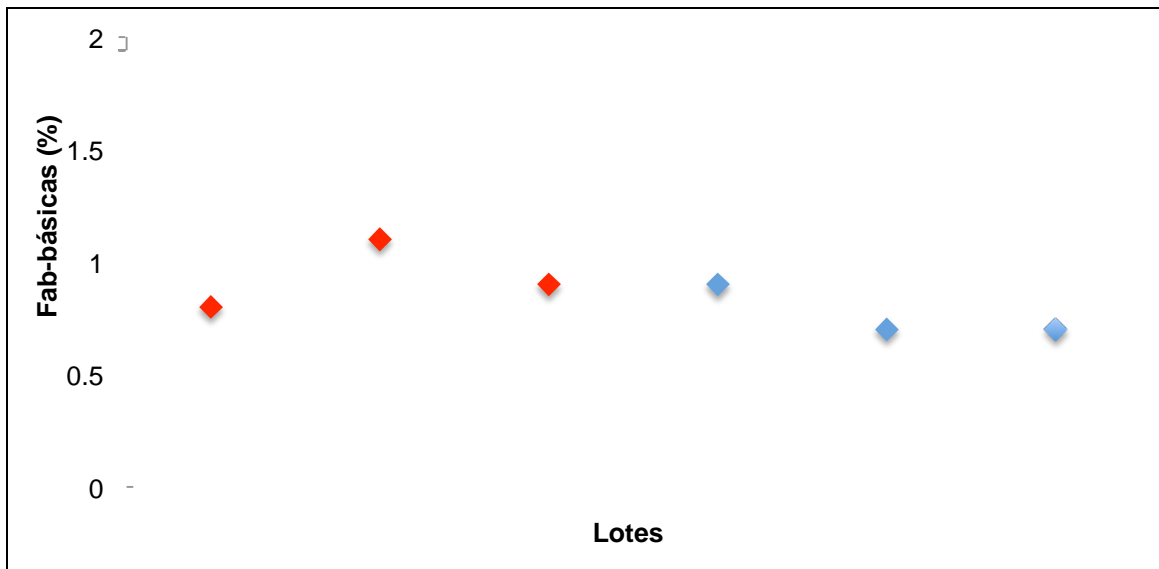
**Figura 42** Contenido de isoformas básicas del fragmento Fc por cromatografía de intercambio catiónico (CEX) para el medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Biocomparable (azul).



**Figura 43** Contenido de fragmento Fab (forma principal) por cromatografía de intercambio catiónico (CEX) para el medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Bioequivalente (azul).

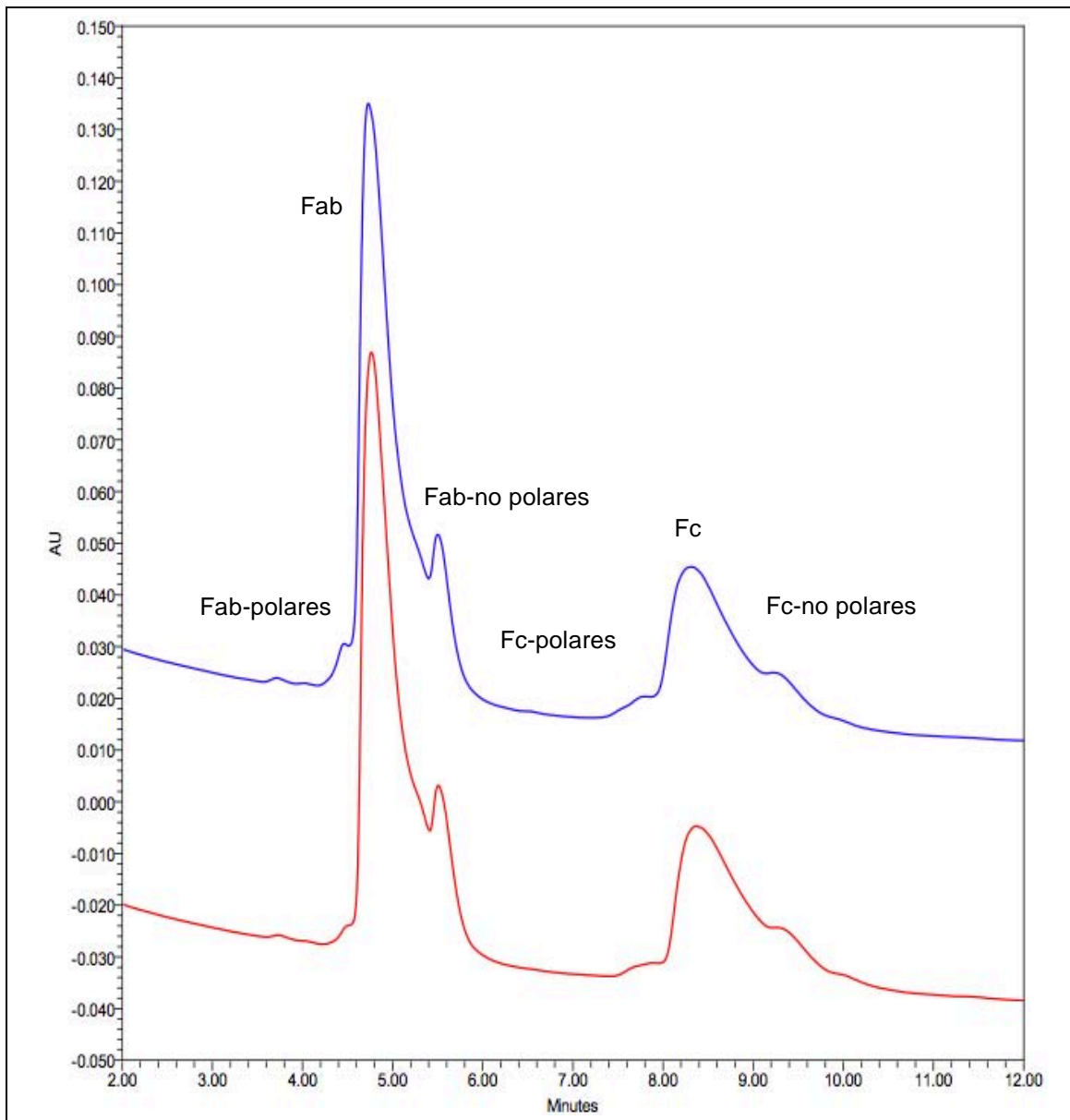


**Figura 44** Contenido de isoformas ácidas del fragmento Fab por cromatografía de intercambio catiónico (CEX) para el medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Bioequivalente (azul).

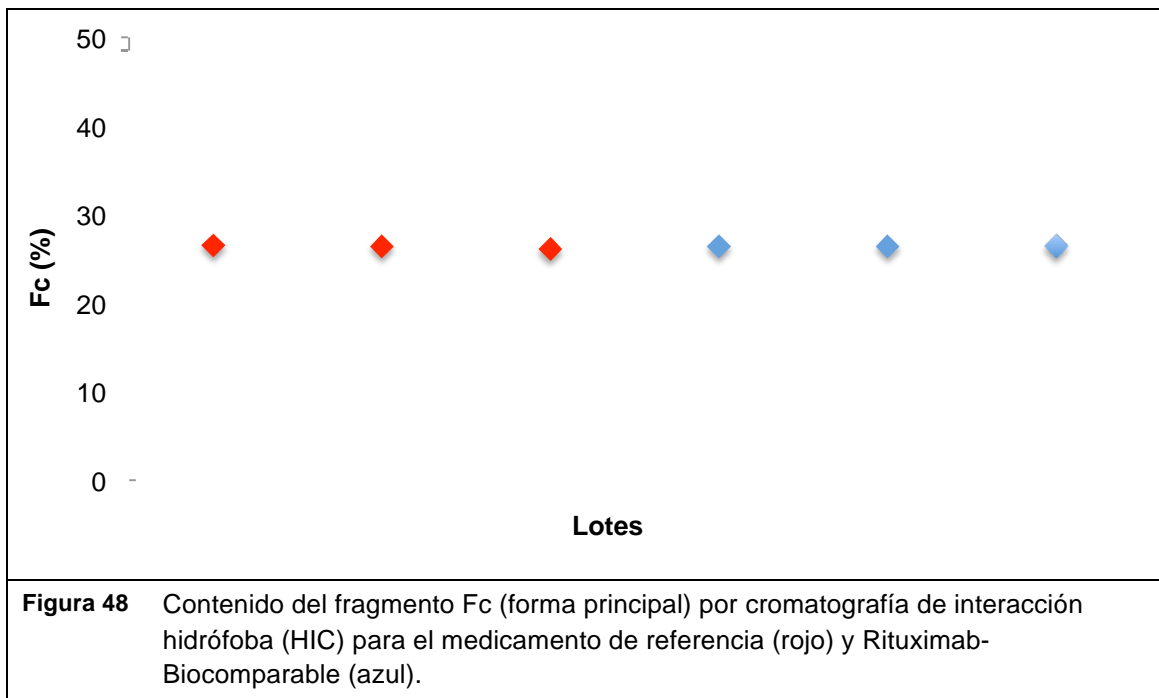
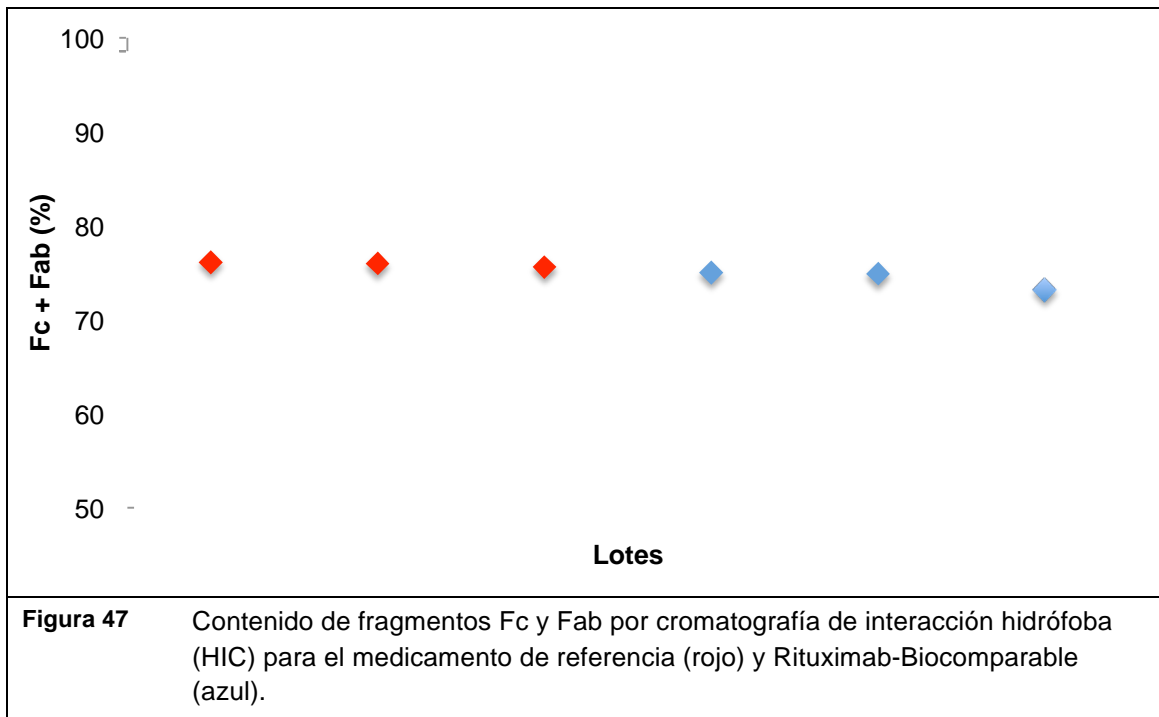


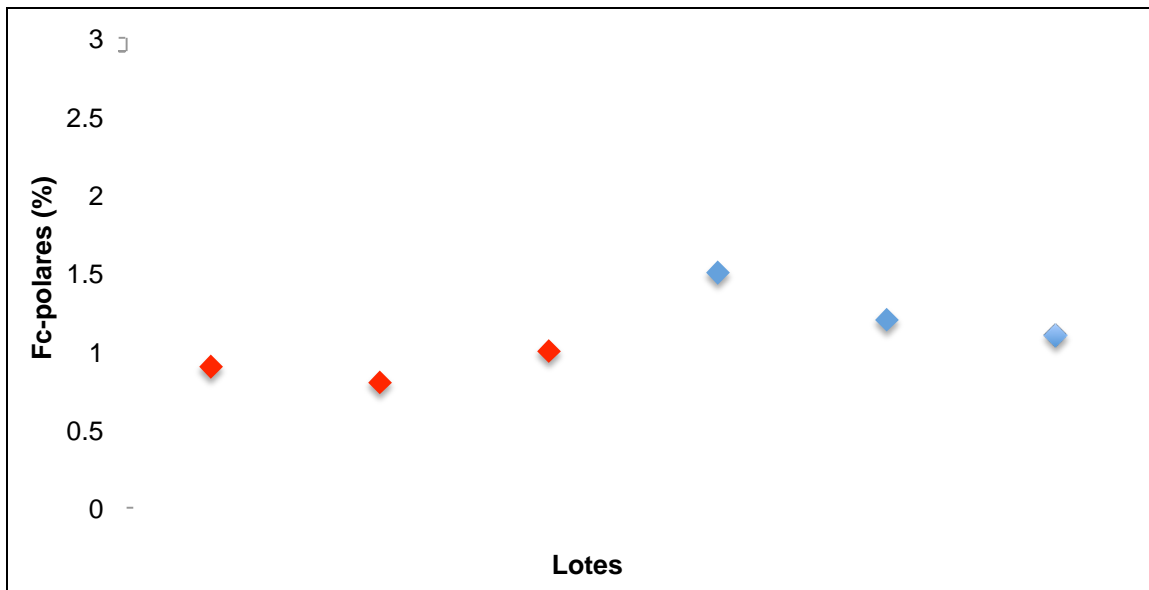
**Figura 45** Contenido de isoformas básicas del fragmento Fab por cromatografía de intercambio catiónico (CEX) para el medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Biocomparable (azul).



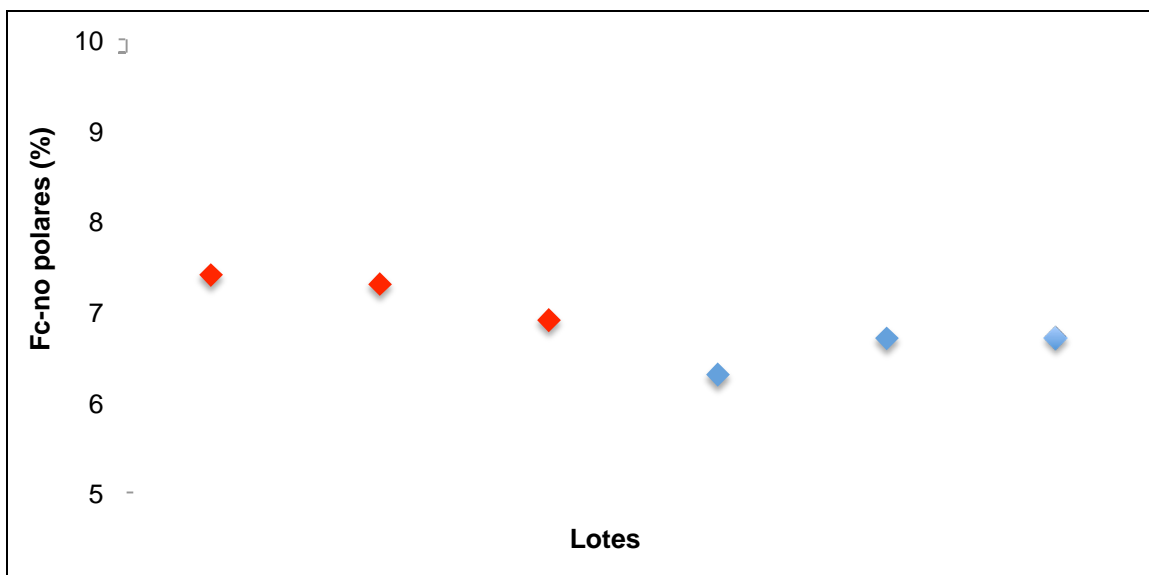


**Figura 46** Perfil cromatográfico tipo por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) para medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Biocomparable (azul) después de digestión con papaína.

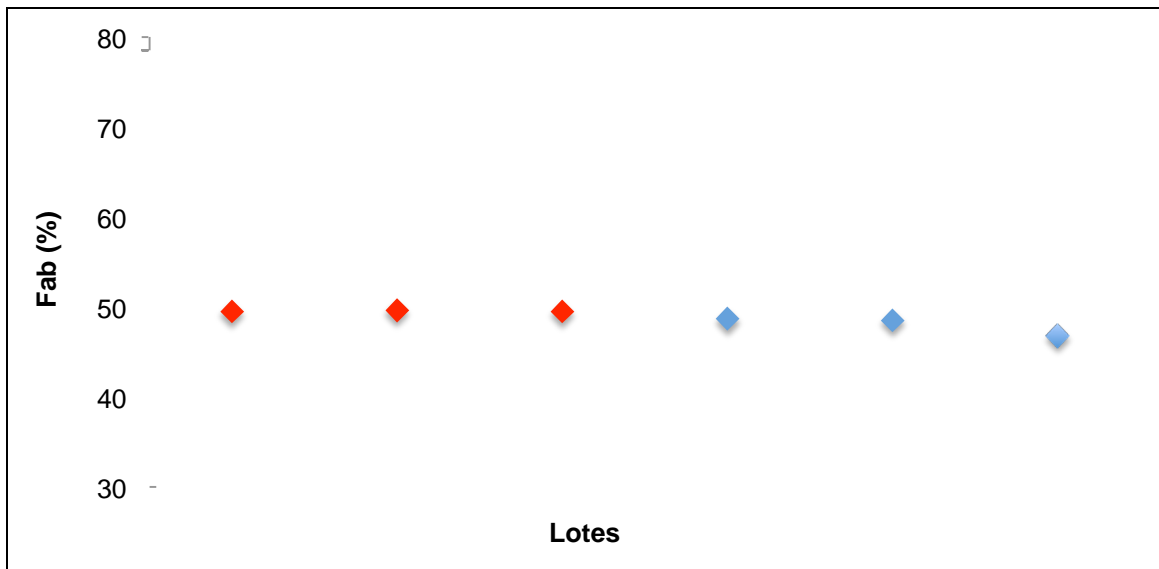




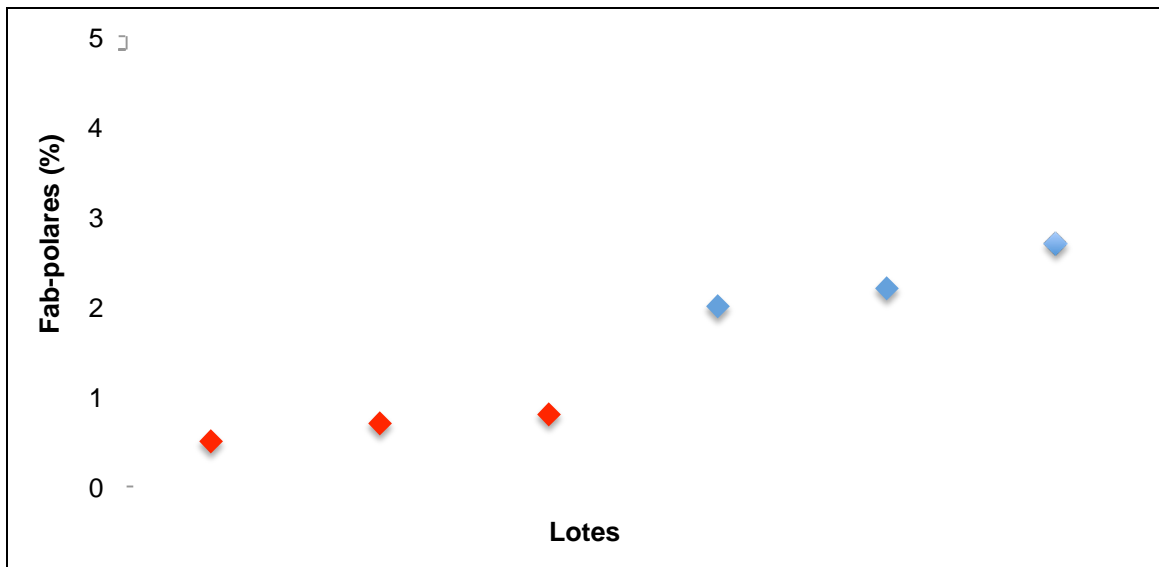
**Figura 49** Contenido de isoformas polares del fragmento Fc por cromatografía interacción hidrófoba (HIC) para el medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Bioequivalente (azul).



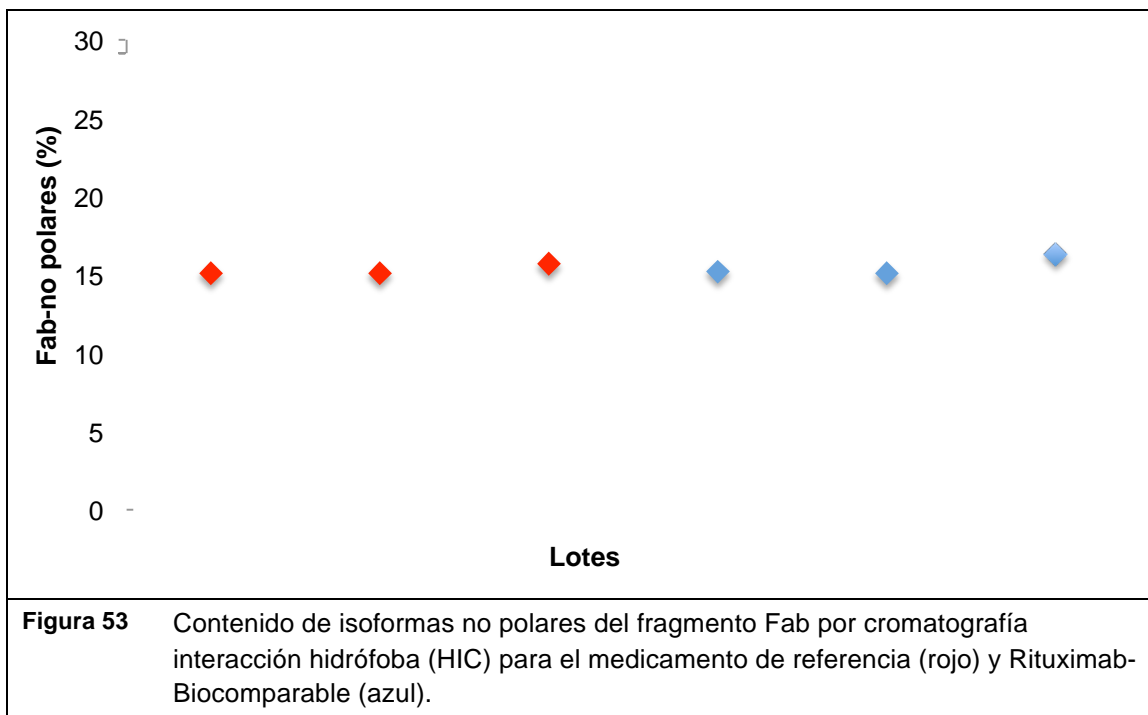
**Figura 50** Contenido de isoformas no polares del fragmento Fc por cromatografía interacción hidrófoba (HIC) para el medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Bioequivalente (azul).



**Figura 51** Contenido del fragmento Fab (forma principal) por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) para el medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Biocomparable (azul).



**Figura 52** Contenido de isoformas polares del fragmento Fab por cromatografía interacción hidrófoba (HIC) para el medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Biocomparable (azul).



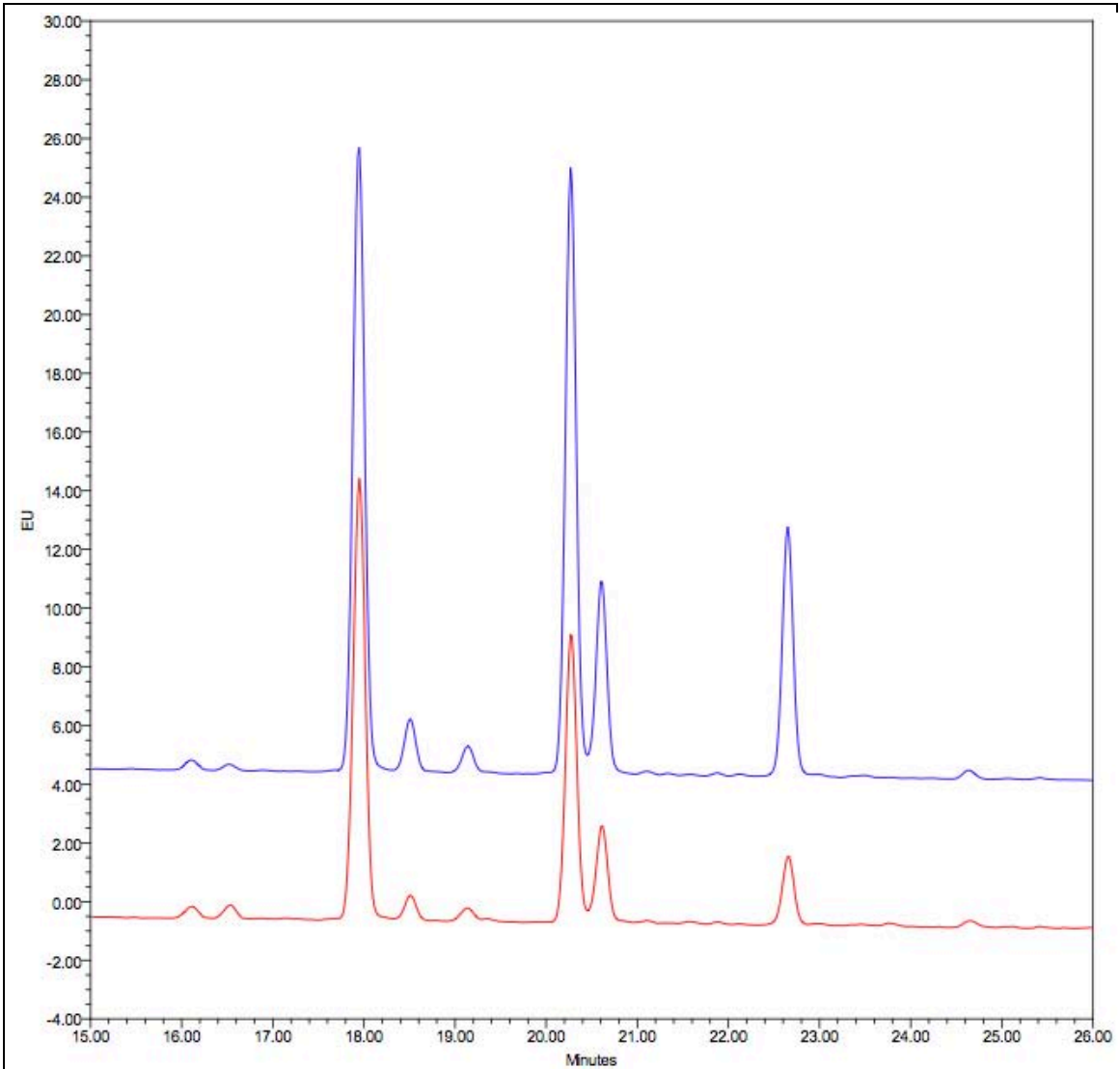
Los valores observados para los atributos de heterogeneidad en Rituximab-Biocomparable se encuentran dentro del intervalo de valores observados en el medicamento de referencia, es decir son comparables. Ello sugiere que las variantes de carga encontradas en Rituximab-Biocomparable son de la misma naturaleza que las encontradas en el medicamento de referencia y los intervalos de oscilación son análogos, concluyendo que ambos medicamentos son fisicoquímicamente comparables.

### 5.2.2 Heterogeneidad de glicosilación

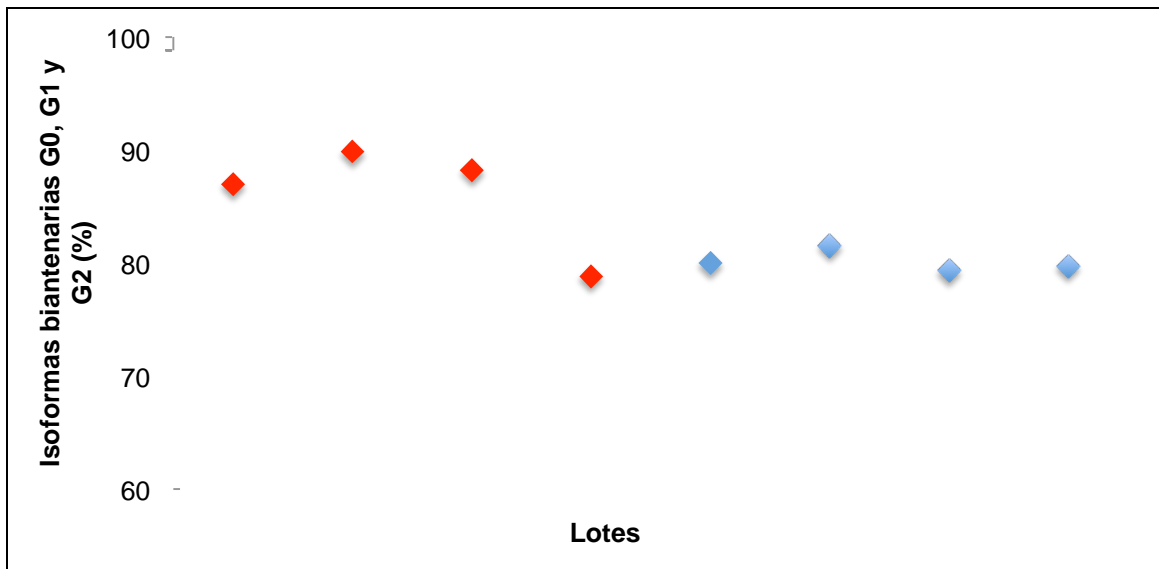
Igualmente, la glicosilación, otro tipo de modificación postraduccional presente en anticuerpos monoclonales, puede tener influencia en la solubilidad, carga eléctrica, masa molecular, tamaño, plegamiento y estabilidad de Rituximab-Biocomparable; lo mismo que en las propiedades biológicas y funcionales. Se ha reportado que la presencia de isoformas afucosiladas y bisectadas, incrementan la

afinidad del mAb por el receptor FcγRIIIa, que tiene como resultado un aumento en la eficacia por ADCC<sup>[40]</sup>. Por otro lado, se ha descrito que las isoformas sializadas podrían incrementar las respuestas inmunológicas<sup>[41]</sup>.

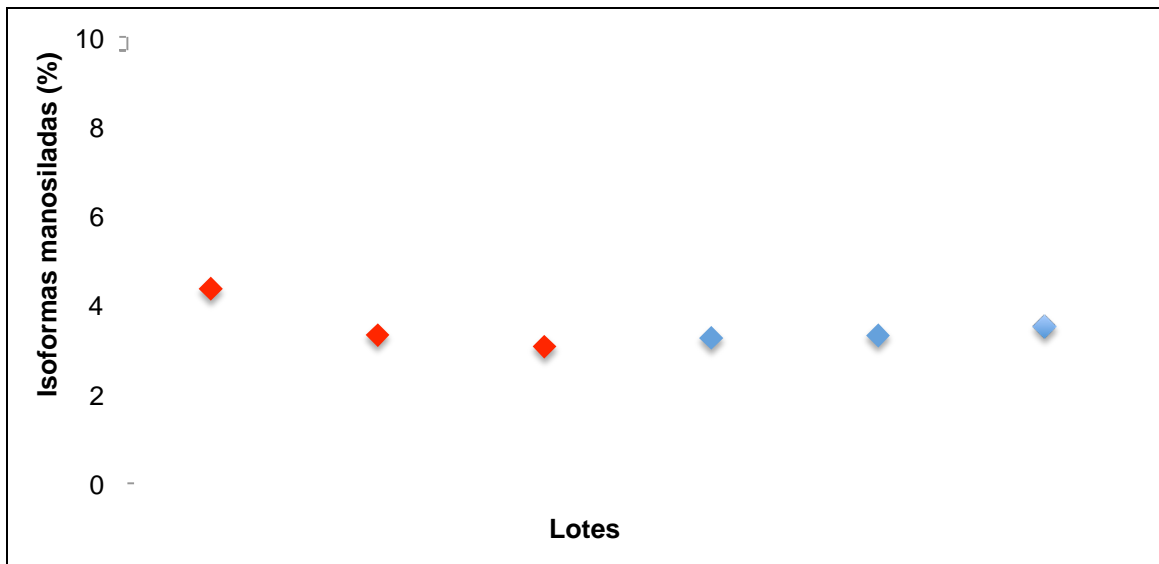
Por ello, cada una de las variantes o isoformas de glúcidos presentes en Rituximab-Biocomparable y su medicamento de referencia, fueron analizadas por cromatografía de interacción hidrófila (HILIC, por sus siglas en inglés). Durante el análisis pudo observarse un perfil cromatográfico similar entre ambos productos (Figura 54). Lo anterior es confirmado con el cálculo de la proporción relativa de cada una de las isoformas presentes en Rituximab-Biocomparable, misma que oscila dentro de una misma amplitud respecto al medicamento de referencia, tanto para el conjunto de formas principales de un anticuerpo, a saber: formas con y sin galactosa terminal (G0, G1 y G2) (Figura 55); como para las formas altamente manosiladas (Figura 56), bisectadas (Figura 57), sializadas (Figura 58) y afucosiladas (Figura 59). Lo anterior es consistente con los análisis de masa exacta glicosilada realizados por espectrometría de masas, por lo que es posible afirmar que la heterogeneidad de glúcidos presente en Rituximab-Biocomparable es similar a la que presenta el medicamento de referencia.



**Figura 54** Perfil cromatográfico tipo por cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) para el medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Biocomparable (azul).

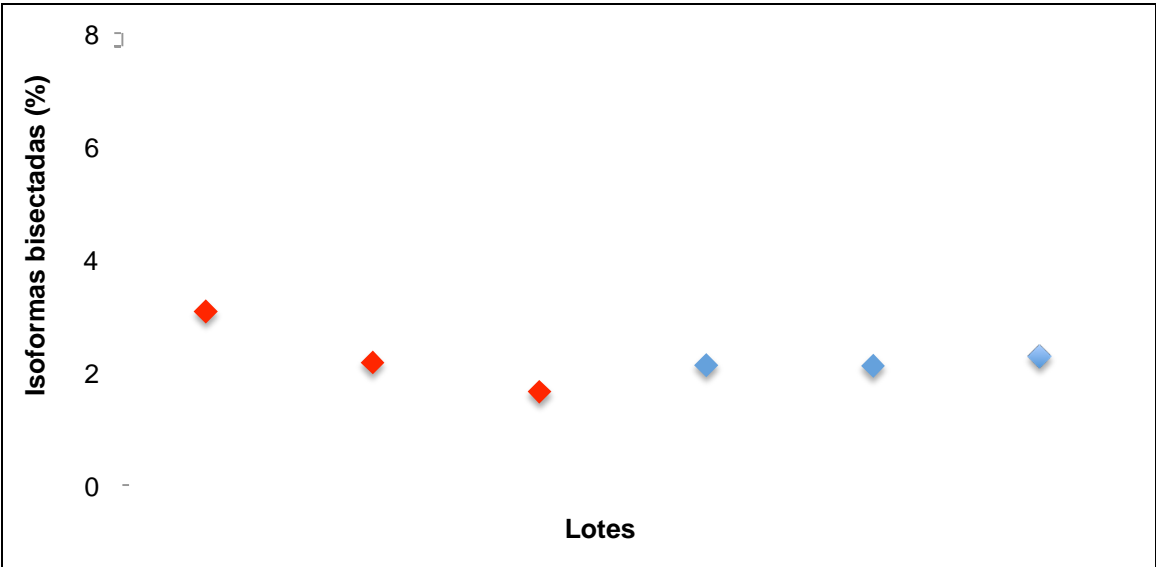


**Figura 55** Contenido de isoformas biantenarias por cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) para el medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Biocomparable (azul).

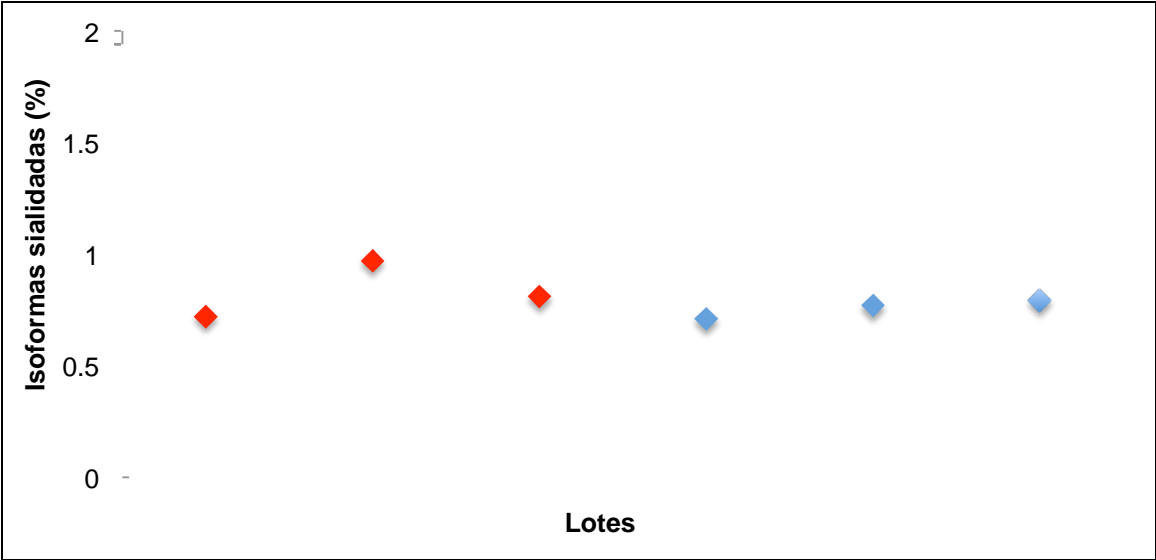


**Figura 56** Contenido de isoformas altamente manosiladas por cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) para el medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Biocomparable (azul).

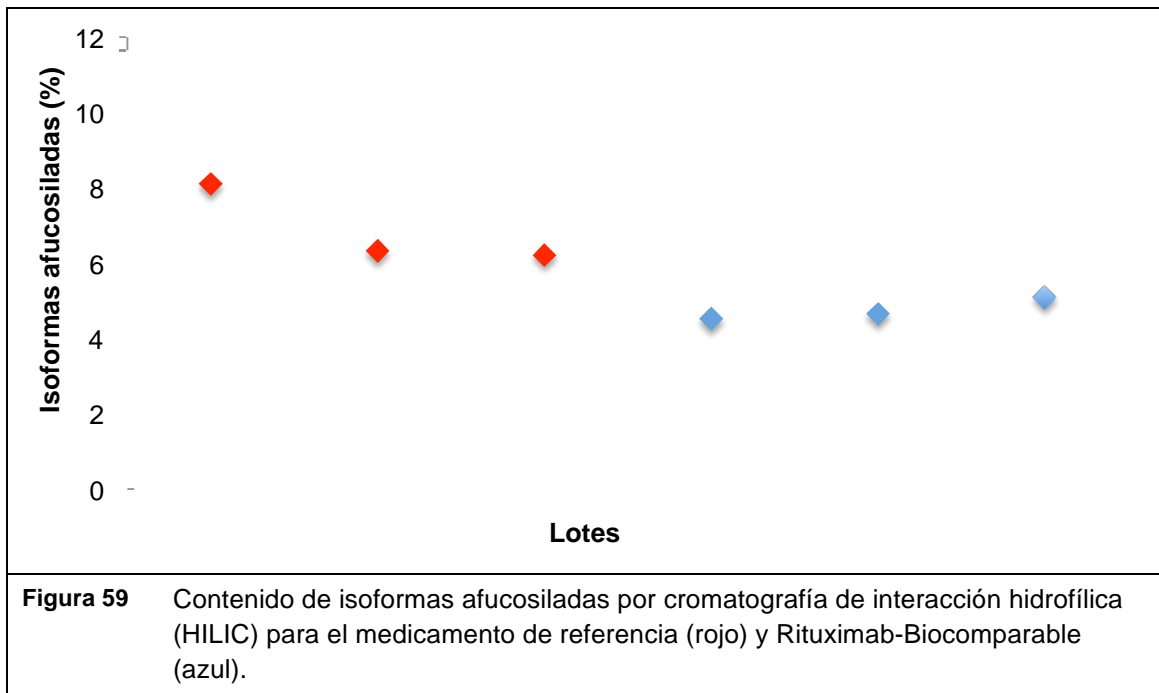




**Figura 57** Contenido de isoformas bisectadas por cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) para el medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Biocomparable (azul).



**Figura 58** Contenido de isoformas sializadas por cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) para el medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Biocomparable (azul).



Los resultados obtenidos en el ejercicio de caracterización de Rituximab-Biocomparable y su medicamento de referencia indican que ambos medicamentos son similares en cuanto a su composición química (secuencia de aminoácidos) y estructura tridimensional, así como en su perfil de heterogeneidad.

La subsecuente caracterización de las propiedades funcionales, basadas en los mecanismos de acción descritos para Rituximab-Biocomparable y su medicamento de referencia, tiene como finalidad verificar que debido a la gran similitud de los diferentes atributos observada en los análisis espectroscópicos, cromatográficos, electroforéticos y de espectrometría de masas; resulta asimismo, en una actividad biológica comparable entre ambos medicamentos.

## **5.3 Propiedades funcionales**

Con objetivo de evaluar si las características fisicoquímicas de Rituximab-Biocomparable son adecuadas para inducir las funciones biológicas con potencia y eficacia similar a la de su medicamento de referencia, se desarrollaron estudios en los que se evalúan las propiedades de unión y las propiedades funcionales biológicas *in vitro*. Las pruebas de unión abarcaron la evaluación de las distintas interacciones descritas para los dominios Fab y Fc, como la afinidad a CD20, evaluada por inmunoensayo, y la afinidad a receptores Fc $\gamma$ RIa, Fc $\gamma$ RIIa y Fc $\gamma$ RIIIa, evaluada por ITC. En cuanto a las pruebas funcionales biológicas, se estudiaron aquellas que representan los mecanismos de acción descritos para rituximab, díganse: citotoxicidad dependiente de complemento (CDC, por sus siglas en inglés) y citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés).

Estos resultados, se complementan con aquellos obtenidos en la caracterización comparativa de la estructura y heterogeneidad como parte de la evidencia requerida para la demostración de comparabilidad entre dos productos bioterapéuticos, a la vez que disminuyen la incertidumbre de presentar propiedades farmacológicas distintas.

### **5.3.1 Propiedades de unión**

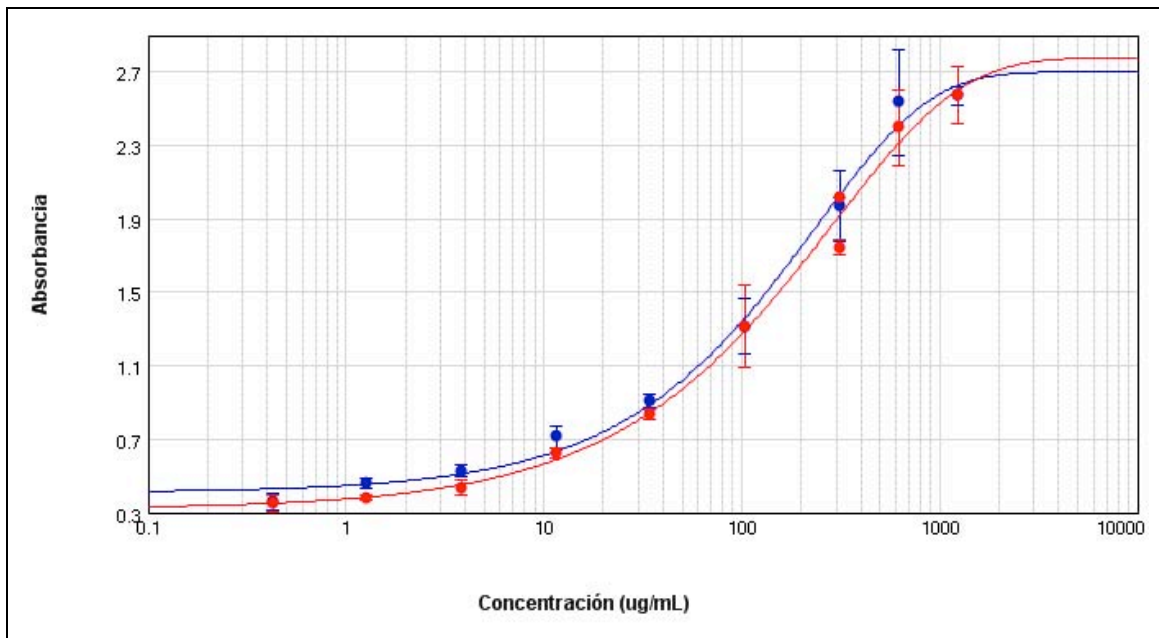
Como parte del ejercicio de comparabilidad se evaluó la capacidad de Rituximab-Biocomparable para unirse con su antígeno CD20 y a los receptores FcR $\gamma$ Ia, FcR $\gamma$ IIa y FcR $\gamma$ IIIa. Este análisis tienen como

objetivo generar información para determinar si Rituximab-Biocomparable presenta interacciones semejantes a las del medicamento de referencia y de esta forma pueda desencadenar los mecanismos de acción descritos para este producto. Estos análisis a su vez brindan información acerca de las características fisicoquímicas de Rituximab-Biocomparable ya que al observarse interacciones semejantes, es posible inferir que éstas son adecuadas y comparables a las del medicamento de referencia.

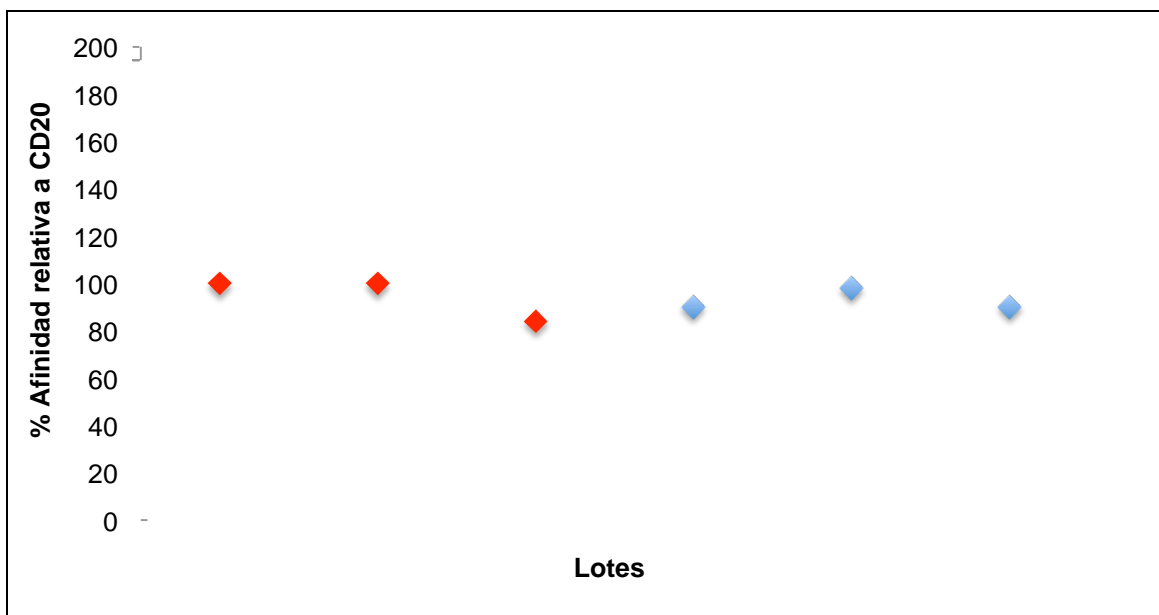
### **Afinidad a CD20**

La unión de Rituximab-Biocomparable a su blanco CD20 activa los distintos mecanismos de acción por los que genera su efecto terapéutico como apoptosis, inhibición de la proliferación, CDC y ADCC<sup>[20]</sup>. Por lo que la afinidad a CD20 es una característica del dominio Fab fundamental para poder determinar la comparabilidad entre Rituximab-Biocomparable y el medicamento de referencia.

En la figura 60 se muestra la curva concentración-respuesta de la unión a CD20 de un lote típico de Rituximab-Biocomparable y el medicamento de referencia. En la figura 61 se presentan de forma gráfica los valores de afinidad relativa a su blanco CD20 observada en diferentes lotes de Rituximab-Biocomparable con respecto de los valores observados para el medicamento de referencia.



**Figura 60** Curva concentración-respuesta de la unión a CD20 de un lote típico de medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Biocomparable (azul).



**Figura 61** Gráfica de la unión relativa a CD20 de distintos lotes para medicamento de referencia (rojo) y Rituximab-Biocomparable (azul).

Los resultados muestran que ambos productos presentan afinidades a CD20 semejantes, indicando que las características fisicoquímicas del dominio Fab de Rituximab-Biocomparable son adecuadas para unirse a su antígeno CD20, de manera comparable al medicamento de

referencia. Por ello, es de esperar que tengan capacidades similares para activar los mecanismos de acción descritos para la unión de este anticuerpo monoclonal con CD20.

Por otra lado, los receptores Fc juegan un papel importante en las funciones terapéuticas de los anticuerpos, debido a que sirven como un vínculo entre las respuestas inmunes mediadas por anticuerpos y las funciones efectoras mediadas por células. En el caso de los Fc $\gamma$ R, han sido evaluados tres tipos distintos: Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, y Fc $\gamma$ RIII, que se unen con distintas afinidades y especificidades a los diferentes anticuerpos del tipo IgG, especialmente a los isotipos IgG1 e IgG3.

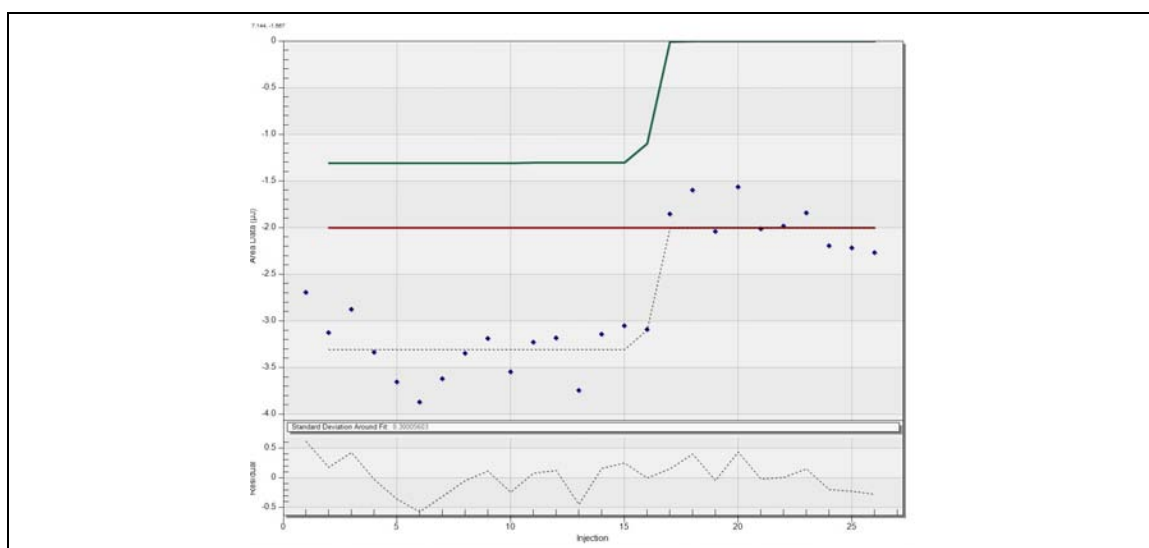
La heterogeneidad estructural de los Fc $\gamma$ R se ve reflejada en su amplio rango de funciones biológicas, incluyendo la eliminación de los complejos antígeno-anticuerpos, regulación de la producción de anticuerpos, incremento en la presentación de antígeno, ADCC, fagocitosis, endocitosis, degranulación y activación de las células pro-inflamatorias. Muchas de estas respuestas son únicas dependiendo del tipo celular y su expresión, tejido-específica<sup>[42]</sup>.

Debido a que una de las funciones que se han descrito para rituximab es la inducción de ADCC<sup>[16, 43]</sup>, tiene gran importancia el determinar la unión del dominio Fc con los receptores Fc $\gamma$ R. Este análisis de afinidad nos permite determinar si las características fisicoquímicas del dominio Fc (estructura terciaria y modificaciones postraduccionales), son adecuadas para generar una unión con los receptores Fc $\gamma$ R comparable a la del medicamento de referencia.

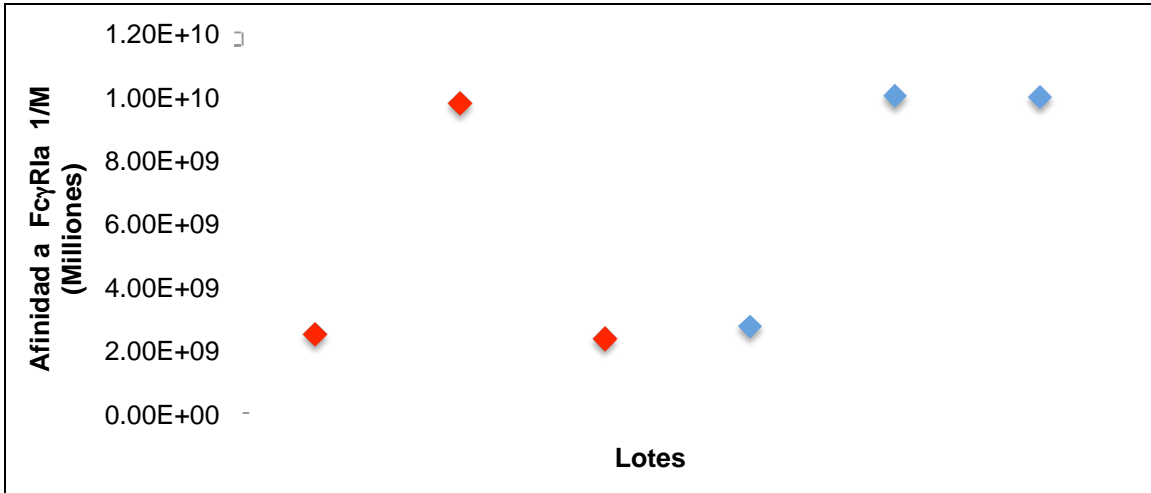
Este parámetro se evalúa por ITC, metodología que permite medir la liberación o absorción de calor cuando dos moléculas interactúan, permitiendo cuantificar distintos parámetros termodinámicos como la entalpía, la estequiometría y la constante de afinidad (K<sub>a</sub>) de la

reacción de enlace. Esta técnica es comúnmente utilizada para la investigación de la interacción entre moléculas. Los receptores evaluados fueron FcγRIa, FcγRIIa y FcγRIIIa.

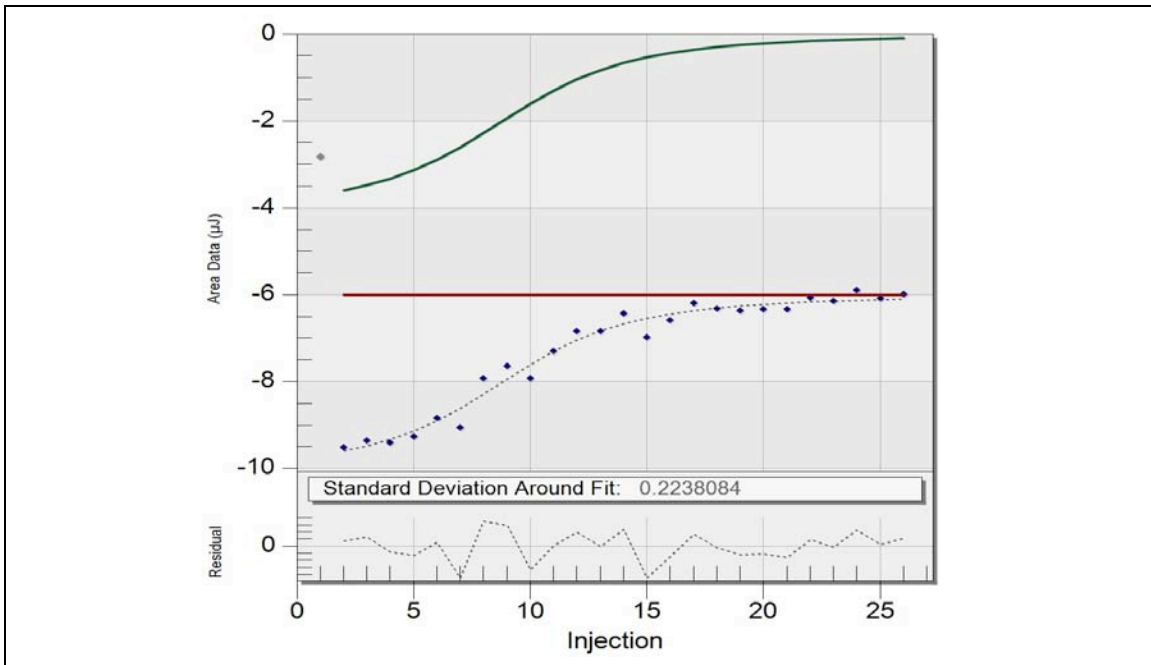
En las figuras 62, 64 y 66 se muestran las gráficas de afinidad obtenidas por ITC para los receptores FcγRIa, FcγRIIa y FcγRIIIa respectivamente, de un lote típico de Rituximab-Biocomparable. En las figuras 63, 65 y 67 se presentan de forma gráfica los valores obtenidos para las constantes de afinidad de los diferentes lotes evaluados de Rituximab-Biocomparable y su medicamento de referencia.



**Figura 62** Curva de la afinidad a FcγRIa de un lote típico de Rituximab-Biocomparable (azul), datos del control (rojo) y curva teórica ajustada (verde) obtenida por ITC.

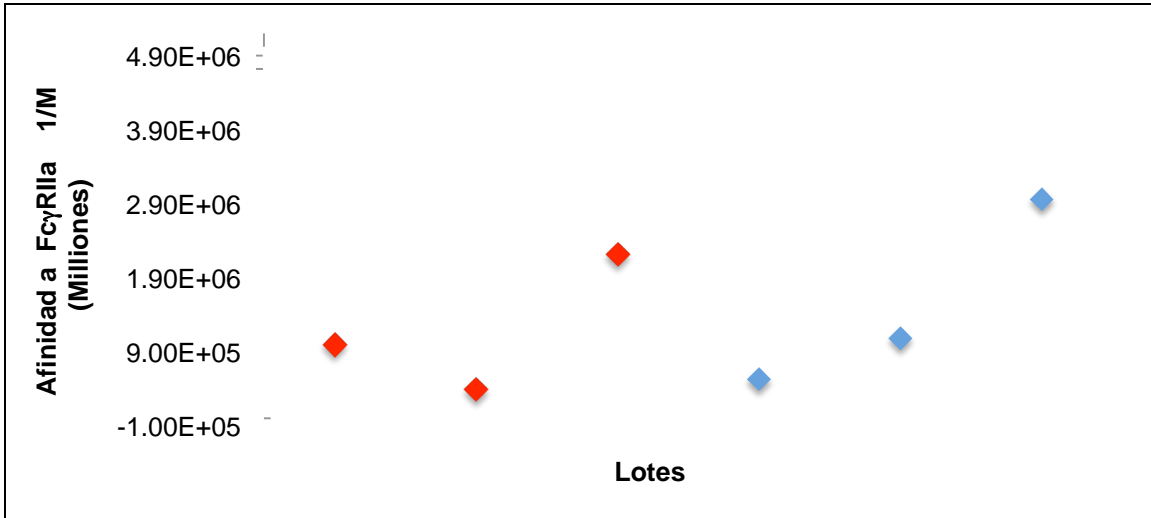


**Figura 63** Constantes de afinidad a Fc $\gamma$ RIa de distintos lotes de Rituximab-Biocomparable (azul) y medicamento de referencia (rojo).

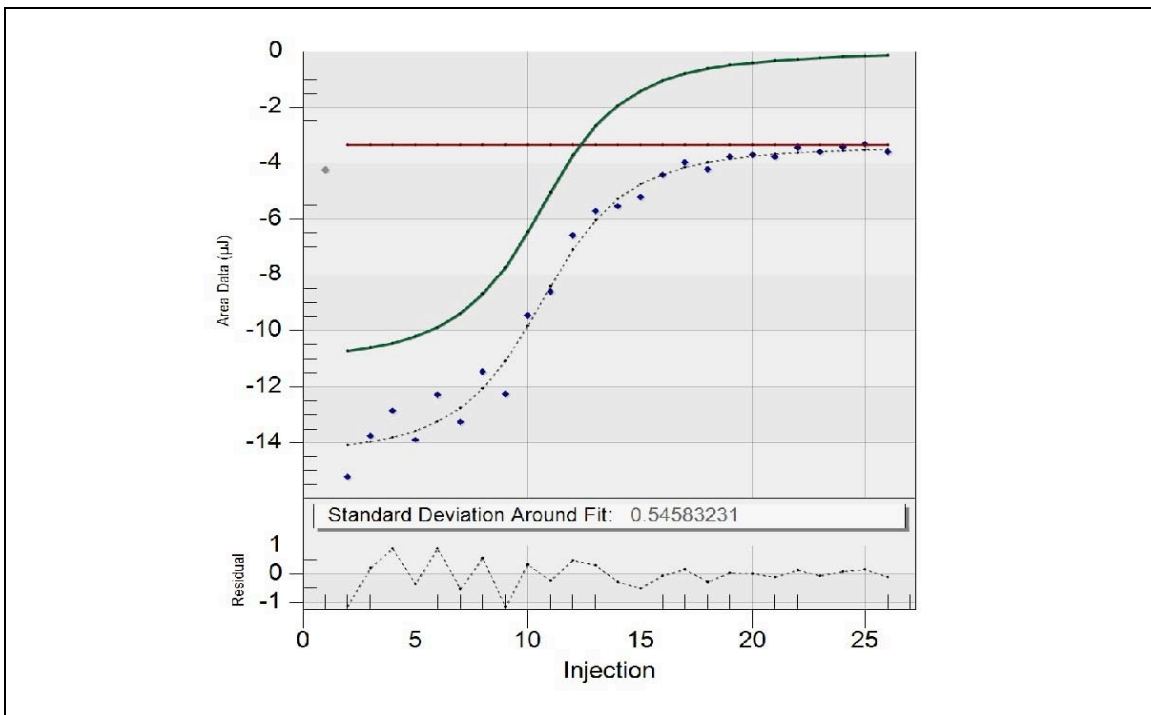


**Figura 64** Curva de la afinidad a Fc $\gamma$ RIa de un lote típico de Rituximab-Biocomparable (azul), datos del control (rojo) y curva teórica ajustada (verde) obtenida por ITC.

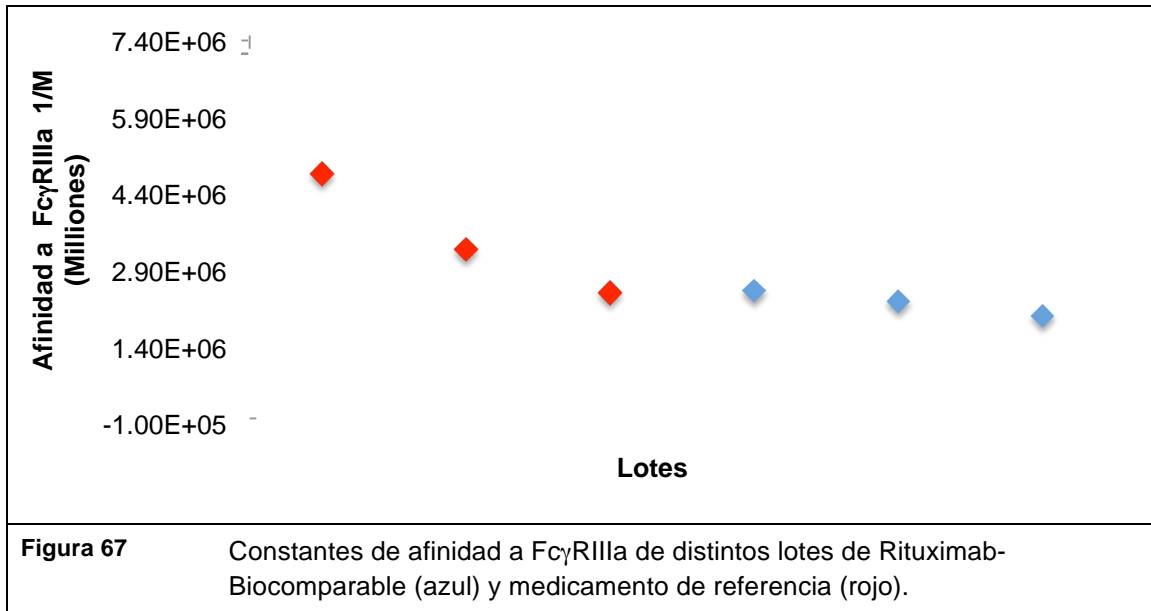




**Figura 65** Constantes de afinidad a FcγRIIIa de distintos lotes de Rituximab-Biocomparable (azul) y medicamento de referencia (rojo).



**Figura 66** Curva de la afinidad a FcγRIIIa de un lote típico de Rituximab-Biocomparable (azul), datos del control (rojo) y curva teórica ajustada (verde) obtenida por ITC.



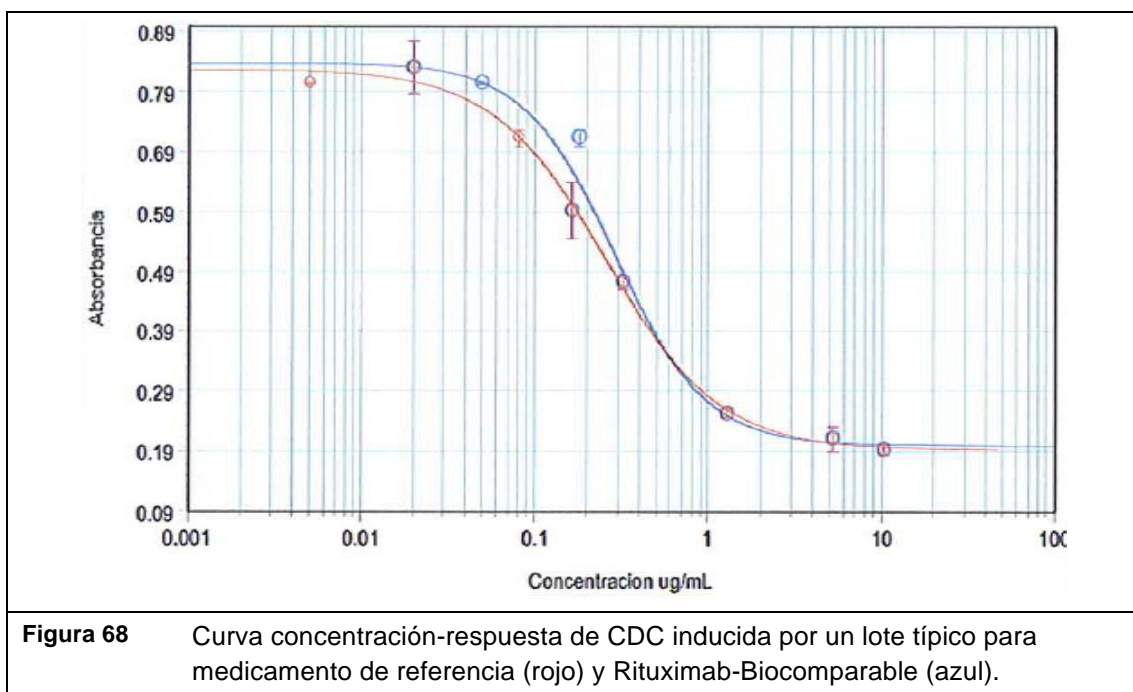
Los resultados muestran que ambos productos presentan constantes de afinidad a los receptores FcγRIa, FcγRIIa y FcγRIIIa comparables entre si. Por ello se infiere que las características fisicoquímicas del dominio Fc de Rituximab-Biocomparable son adecuadas y comparables a las del medicamento de referencia. Dado lo anterior, es de esperarse que se presenten capacidades similares para activar los mecanismos de acción descritos para la unión con los receptores FcγR, lo cual fue evaluado y determinado satisfactoriamente en el ensayo de ADCC.

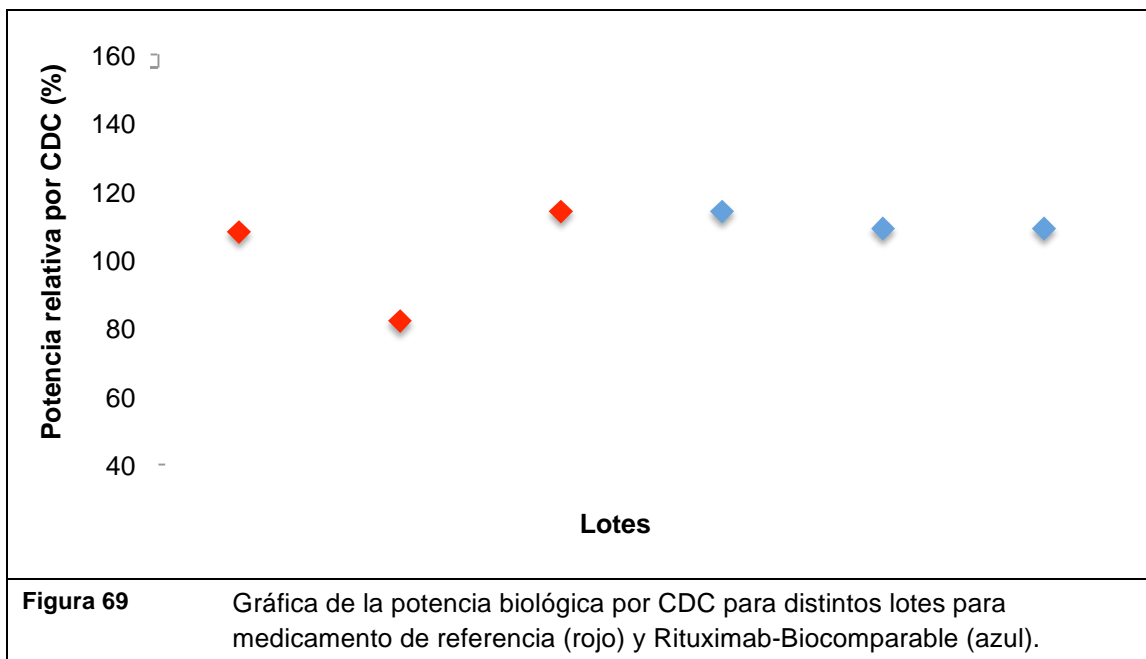
### 5.3.2 Propiedades funcionales biológicas

Las funciones biológicas descritas para rituximab, son la inducción de CDC, ADCC, apoptosis y la inhibición de la proliferación<sup>[20, 44]</sup>. Éstas funciones biológicas fueron evaluadas de forma comparativa entre Rituximab-Biocomparable y su medicamento de referencia, para demostrar que las funciones biológicas descritas pueden ser desencadenadas de forma comparable como consecuencia de la similitud estructural y química entre ambos medicamentos.

## CDC

La inducción de CDC es uno de los principales mecanismos de acción por los que rituximab ejerce su efecto terapéutico. En la figura 68 se muestra la curva concentración-respuesta de CDC de un lote típico de Rituximab-Biocomparable y el medicamento de referencia. En la figura 68 se muestran de forma gráfica los valores de la potencia relativa observada en diferentes lotes de Rituximab-Biocomparable con respecto de los valores observados para el medicamento de referencia.



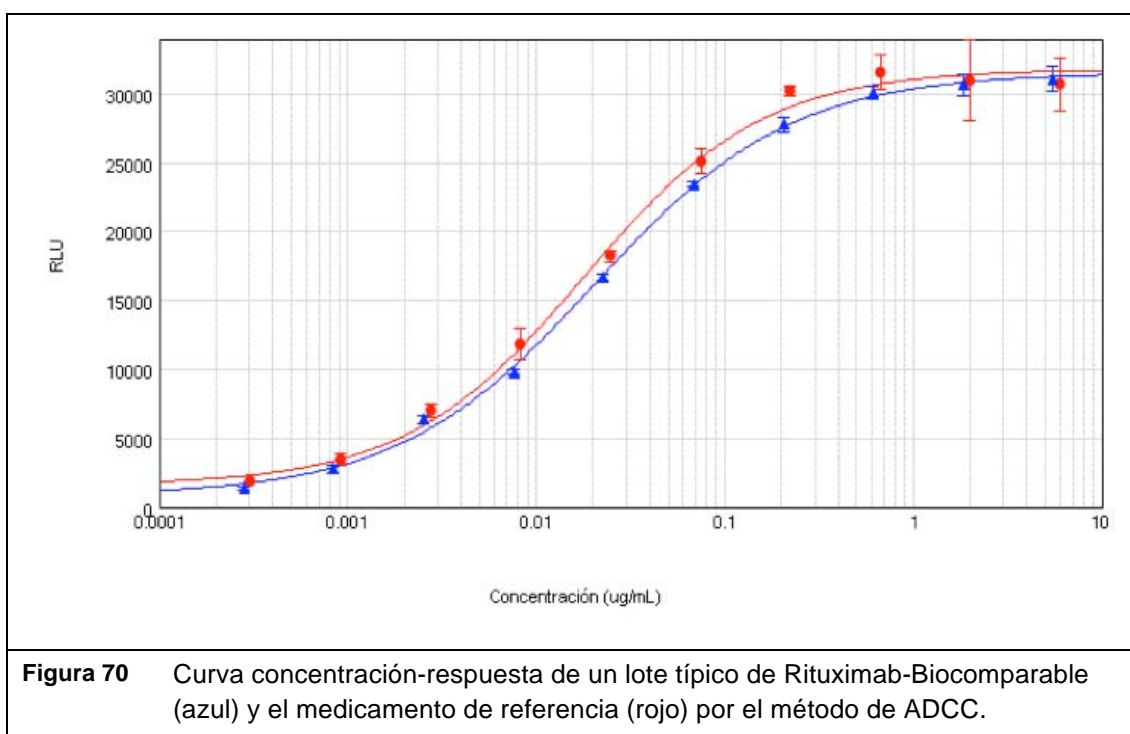


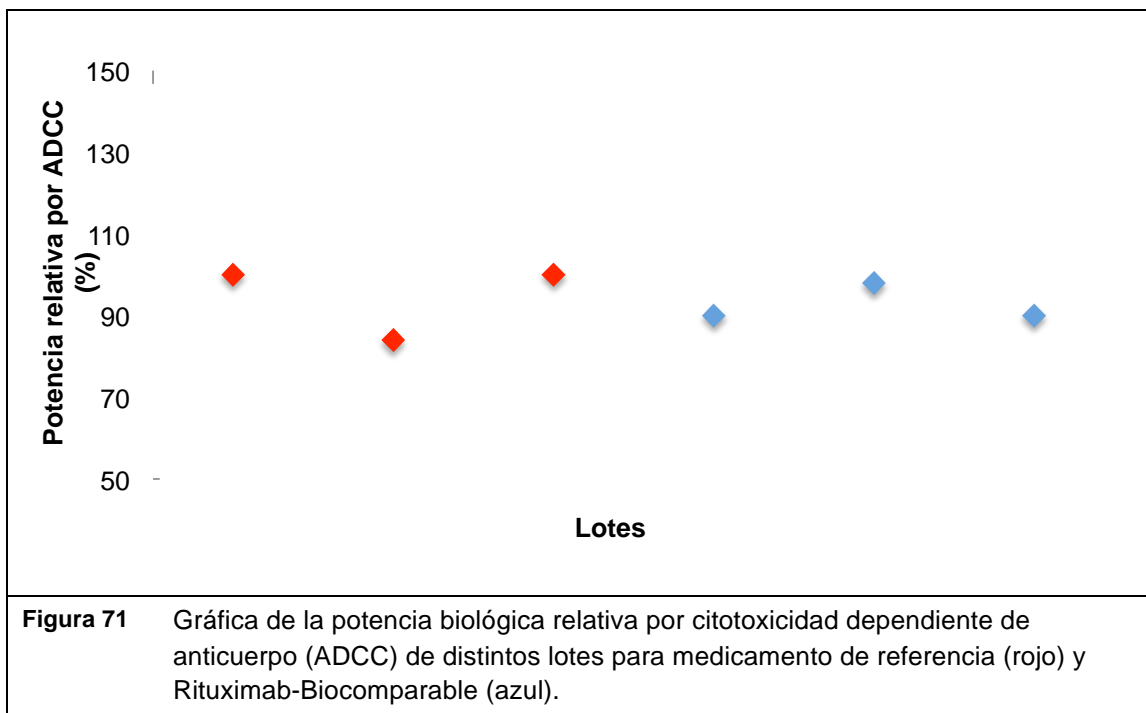
Los resultados muestran que Rituximab-Biocomparable induce CDC de forma comparable al medicamento de referencia, indicando que el efecto biológico generado por la unión del dominio Fc con C1q es semejante entre los medicamentos. Estos resultados son indicativos de que las características fisicoquímicas del dominio Fc de Rituximab-Biocomparable relacionadas con la inducción de la función de CDC son comparables a las de su medicamento de referencia.

#### ADCC

Junto a CDC, ADCC es uno de los mecanismos antitumorales por los que rituximab presenta actividad terapéutica<sup>[20, 43]</sup>. Se ha descrito que rituximab puede inducir la muerte de las células de linfoma al activar a células efectoras del sistema inmune como células NK, monocitos y macrófagos, al unirse a los receptores Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ I, Fc $\gamma$ II y Fc $\gamma$ III) con el dominio Fc del anticuerpo, luego de haberse unido a CD20 en la superficie de la célula de linfoma vía el fragmento Fab [45].

Con objeto de demostrar la comparabilidad de las funciones biológicas asociadas al dominio Fc, se desarrolló el método para evaluar la potencia de ADCC. En la figura 70 se muestra la curva concentración-respuesta de ADCC de un lote típico de Rituximab-Biocomparable y el medicamento de referencia. En la figura 71, se presentan de forma gráfica los valores de potencia relativa para diferentes lotes de Rituximab-Biocomparable con respecto de los valores observados para el medicamento de referencia.





Los resultados muestran que Rituximab-Biocomparable induce el mecanismo de ADCC de forma comparable al medicamento de referencia, indicando que no sólo las características fisicoquímicas del dominio Fc relacionadas con la activación de la respuesta son adecuadas para inducir la función de ADCC, sino también que la respuesta se desencadena con una magnitud semejante al medicamento de referencia.

En resumen, en los ensayos de afinidad a CD20 y a los diferentes receptores FcγR realizados para Rituximab-Biocomparable se observaron patrones de unión y afinidades semejantes al medicamento de referencia, indicándonos que las características fisicoquímicas de los dominios Fab y Fc son adecuadas para llevar a cabo dicha unión; lo cual fue complementado con los estudios funcionales biológicos. En estos ensayos se observó que Rituximab-Biocomparable indujo CDC y ADCC con una potencia y eficacia comparable a las del medicamento de referencia.

## 6. Conclusiones

Para la demostración de un alto grado de similitud entre un medicamento biosimilar propuesto, Rituximab-Biocomparable, y su medicamento de referencia se diseñó un ejercicio de comparabilidad que incluye el uso de técnicas analíticas en el estado del arte para la caracterización de la identidad, estructura física, heterogeneidad y propiedades funcionales de ambos medicamentos. Este incluyó el uso de metodologías analíticas ortogonales que dieron certeza de los resultados obtenidos.

El análisis de diferentes lotes, tanto del medicamento de referencia como del medicamento biosimilar propuesto, nos permitió obtener una visión global de la molécula, así como observar la variabilidad lote a lote. La caracterización fisicoquímica mostró que la mayoría de los atributos de calidad evaluados para Rituximab-Biocomparable se encontraron dentro de los límites de variabilidad del medicamento de referencia. Diferencias menores fueron observadas en el contenido de isoformas ácidas entre Rituximab-Biocomparable y su medicamento de referencia.

Sin embargo, estas diferencias no tuvieron impacto en las propiedades funcionales, como se hubo demostrado durante los estudios de caracterización funcional. Ello aporta información científica para el diseño selectivo y específico para estudios posteriores en animales y/o ensayos clínicos para la demostración de biosimilitud entre Rituximab-Biocomparable y su medicamento de referencia.

## 7. Referencias bibliográficas

[1] US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. FDA Guidance Concerning Demonstration of Comparability of Human Biological Products, Including Therapeutic Biotechnology-derived Products. FDA, Rockville, MD. 1996.

2 [4] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Q5E: Comparability of Biotechnological/Biological products subject to changes in their manufacturing process. 2004.

[3] Norma Oficial Mexicana. NOM-257-SSA1-2014. *En materia de medicamentos biotecnológicos*. México. 2014.

[4] Norma Oficial Mexicana. NOM-EM-001-SSA1-2012. *Medicamentos biotecnológicos y sus biofármacos. Buenas prácticas de fabricación. Características técnicas y científicas que deben cumplir éstos para demostrar su seguridad, eficacia y calidad. Etiquetado. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad y farmacovigilancia*. Mexico. 2012.

[5] Guía para establecer la biocomparabilidad de los medicamentos biotecnológicos, que contengan como biofármaco rituximab. Dirección Ejecutiva de Autorización de Productos y Establecimientos de la Comisión de Autorización Sanitaria (CAS)/Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) a través del Subcomité de Evaluación de Productos Biotecnológicos (SEPB). México. 2014.

[6] US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Quality considerations in demonstrating biosimilarity to a reference protein product. FDA, Rockville, MD. 2015.



- [7] The European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues. London, 2005. EMA/CHMP/BMWP/42832/2005.
- [8] World Health Organization. Global burden of disease, 2004 update. Switzerland, 2008.
- [9] H. Liu, G. Gaza-Bulseco, D. Faldu, C. Chumsae, J. Sun, "Heterogeneity of monoclonal antibodies", *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 97, no. 7, pp. 2426-2447, 2008.
- [10] M. Schiestl, T. Stangler, C. Torella, T. Cepeljnik, H. Toll, R. Grau, "Acceptable Changes in Quality Attributes of Glycosylated Biopharmaceuticals", *Nature Biotechnology*, vol. 29, no. 4, pp. 310-312, 2011.
- [11] The European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on similar biological medicinal products. London. 2005. CHMP/437/04.
- [12] US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Scientific considerations in demonstrating biosimilarity to a reference product. FDA, Rockville, MD. 2015.
- [13] US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Clinical pharmacology data to support a demonstration of biosimilarity to a reference product. FDA, Rockville, MD. 2015.
- [14] The European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues. London. 2005. EMEA/CHMP/42832/2005.
- [15] The European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on similar biological medicinal

products containing monoclonal antibodies –non- clinical and clinical issues. London, 2012. EMA/CHMP/BMWP/403543/2010.

[16] A. Beck, H. Dimer, D. Ayoub, F. Debaene, E. Wagner-Rousset, D. Carapito, A. Van Dorsselaer, S. Sanglier-Cianférani. "Analytical characterization of biosimilar antibodies and Fc-fusion proteins", Trends in Analytical Chemistry. vol. 48, pp: 81-95, 2013.

[17] The European Medicines Agency, MabThera: EPAR-scientific discussion. 2005.

[18] The United States Pharmacopeia, Medicines compendium. "Rituximab". Versión: 1.0. 2013.

[19] H. Schellekens, "Factors influencing the immunogenicity of therapeutic proteins", Nephrology Dialysis Transplantation, vol.20, no. 6, pp.vi3-vi9, 2005.

[20] M. Reff, K. Carner, K. S. Chambers, P. C. Chinn, J. E. Leonard, R. Raab, R. A. Newman, N. Hanna, D. R. Anderson, "Depletion of B cell in vitro by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20", Blood, vol. 83, no.2, pp. 435-445, 1994.

[21] J. Du, H. Wang, C. Zhong, B. Peng, M. Zhang, B. Li, S. Huo, Y. Guo, J. Ding, "Structural basis for recognition of CD20 by therapeutic antibody rituximab", Journal of Biological Chemistry, vol. 282, no. 20, pp. 15073-15080, 2007.

[22] D.G. Maloney, "Anti-CD20 Antibody Therapy for B-Cell Lymphomas", The New England journal of medicine, vol. 366, no. 21, pp. 2008-2016, 2012.

[23] Z. Zhang, H.Pan, X Chen, "Mass spectrometry for structural characterization of therapeutic antibodies", Mass spectrometry reviews, vol. 28, pp. 147-176, 2009.

[24] C. E. Espinosa-de la Garza, M. P. Miranda-Hernández, L. Acosta-Flores, N. O. Pérez, L. F. Flores-Ortiz, Emilio Medina-Rivero, " Analysis of therapeutic proteins using multi angle light scattering coupled to ultra

high performance liquid chromatography”, *Journal of Separation Science*, vol.38, no. 9, pp. 1537-1543, 2015.

[25] R. W. Cowgill. “Fluorescence and the structure of proteins. II. Fluorescence of peptides containing tryptophan or tyrosine”, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 75, pp: 272–273, 1963.

[26] L. F. Flores-Ortiz, V. R. Campos-García, F. C. Perdomo-Abúndez, N. O. Pérez, E. Medina-Rivero, “Physicochemical properties of Rituximab”, *Journal of chromatography and related technologies*, vol. 37, no. 10, pp. 1438-1452, 2013.

[27] V. Pérez Medina Martínez, M. E. Abad-Javier, Alexis J. Romero-Díaz, F. Villaseñor-Ortega, N. O. Pérez, L. F. Flores-Ortiz, E. Medina-Rivero, “Comparability of a three-dimensional structure in biopharmaceuticals using spectroscopic methods”. *Journal of analytical methods in chemistry*, vol. 2014, pp. 1-11, 2014.

[28] C. E. Espinosa-de la Garza, F. C. Perdomo-Abúndez, J. Padilla-Calderón, J. M. Uribe-Wiechers, N. O. Pérez, L. F. Flores-Ortiz, E. Medina-Rivero, “Analysis of recombinant monoclonal antibodies by capillary zone electrophoresis”. *Electrophoresis*, vol. 34, no. 8, pp. 1133-1140, 2013.

[29] S. Mittermayr, J. Bones, M. Doherty, A. Guttman, P. M. Rudd, “Multiplexed analytical glycomics: rapid and confident IgG N-Glycan structural elucidation,” *Journal of proteome research*, vol. 10, pp. 3820-3829, 2011.

[30] M. P. Miranda-Hernández, C. A. López-Morales, N. D. Ramírez-Ibáñez, N. Piña-Lara, N. O. Pérez, A. Molina- Pérez, J. Revilla-Beltri, L. F. Flores-Ortiz, E. Medina-Rivero. “Assessment of physicochemical properties of rituximab related to its immunomodulatory activity” *Journal of immunology research*, 2015.

[31] H. S. Gadgil, G. D. Pipes, T. M. Dillon, M.J. Treuheit, P. V. Bondarenko "Improving mass accuracy of high performance liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry of intact antibodies", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 17, pp. 867-872, 2006.

[32] H. Ye, "Simultaneous determination of protein aggregation, degradation, and absolute molecular weight by size exclusion chromatography-multiangle laser light scattering" , *Analytical Biochemistry*, vol. 356 no. 1, pp. 76–85, 2006.

[33] A.Hawe, W. L.Husle, W.Jiskoot, R. T.Forbes, "Taylor dispersion analysis compared to dynamic light scattering for the size analysis of therapeutic proteins and their aggregates", *Pharmaceutical Research*. Vol. 28, no. 9, pp. 2302–2310, 2011.

[34] N. Harn, C. Allan, C. Oliver, C.R. Middaugh, "Highly concentrated monoclonal antibody solutions: direct analysis of physical structure and thermal stability" *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol 96, pp. 532-546, 2007.

[35] W.Zhang, M. J. Czupryn "Free sulfhydryl in recombinant monoclonal antibodies", *Biotechnology Progress*, vol. 18, no. 3, pp. 509-513, 2002.

[36] T. Zhang, J. Zhang, D. Hewitt, B. Tran, X. Gao, Z.J. Qiu, M. Tejada, H. Gazzano-Santoro, Y.H. Kao, "Identification and characterization of buried unpaired cysteines in a recombinant monoclonal IgG1 antibody", *Analytical Chemistry*, vol. 84, no. 16, pp. 7112-7123, 2012.

[37] L. A. Khawli, S. Goswami, R. Hutchinson, Z. W. Kwong, J. Yang, X. Wang, P. Motchnik, "Charge variants in IgG1. Isolation, characterization, *in vitro* binding properties and pharmacokinetics in rats", *mAbs*, vol. 2, no. 6, pp. 613-624, 2010.

[38] H.J. Lee, W.M. Pardridge, "Monoclonal antibody radiopharmaceuticals: cationization, pegylation, radiometal chelation,

pharmacokinetics, and tumor imaging”, *Bioconjugate Chemistry*, no. 14, pp. 546–553, 2003.

[39] T. Igawa, H. Tsunoda, T. Tachibana, A. Maeda, F. Mimoto, C. Moriyama, M. Nanami, Y. Sekimori, Y. Nabuchi, Y. Aso, K. Hattori, “Reduced elimination of IgG antibodies by engineering the variable region”, *Protein engineering, Design & Selection*, vol. 23, no. 5, pp. 385-392, 2010.

[40] W. S. Putnam, S. Prabhu, Y. Zheng, M. Subramanyas, Y. C. Wang, “Pharmacokinetic, pharmacodynamic and immunogenicity comparability assessment strategies for monoclonal antibodies”, *Trends in Biotechnology*, vol. 28, no. 10, pp. 509-516, 2010.

[41] H. Li, M. d’Anjou. “Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins”, *Current opinion in biotechnology*, vol. 20, pp. 678-684, 2009.

[42] S. Sibénil, C. A. Dutertre, C. Boix, E. Bonnin, R. Ménez, S. Jorieux, W.H. Fridman, J.L., Teillaud, “Molecular aspects of human FcγR interactions with IgG: functional and therapeutic consequences”, *Immunology letters*, vol. 106, no.2, pp. 111-118, 2006.

[43] X. Zhou, W. Hu, X. Qin “The role of complement in the mechanism of action of rituximab for B-cell lymphoma: implications for therapy”, *Oncologist*, vol. 13, no. 9, pp. 954-66, 2008.

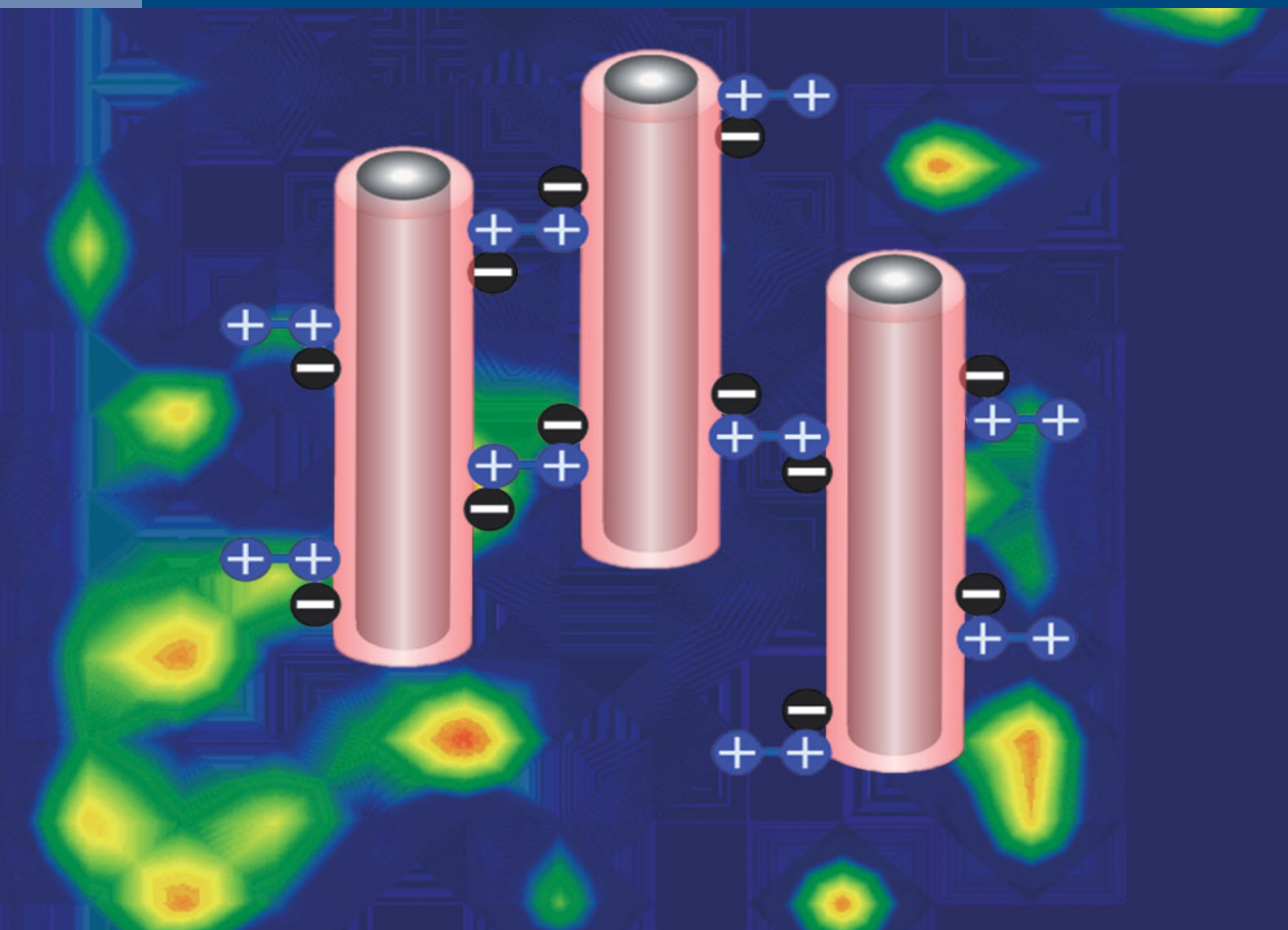
[44] E. Oflazoglu, L. P. Audoly, “Evolution of anti-CD20 monoclonal antibody therapeutics in oncology”, *mAbs*, vol. 2, no. 1, pp.14-19, 2010.

[45] MR Smith “Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance”, *Oncogene* vol. 22, pp. 7359-7368, 2003.

## 8. ANEXOS

# JOURNAL OF SEPARATION SCIENCE

9 | 15



**Methods**  
Chromatography · Electroseparation

**Applications**  
Biomedicine · Foods · Environment

[www.jss-journal.com](http://www.jss-journal.com)

WILEY

Carlos E. Espinosa-de la Garza  
 Mariana P. Miranda-Hernández  
 Lilia Acosta-Flores  
 Néstor O. Pérez  
 Luis F. Flores-Ortiz  
 Emilio Medina-Rivero\*

## Research Article

# Analysis of therapeutic proteins and peptides using multiangle light scattering coupled to ultra high performance liquid chromatography

Probiomed S.A. de C.V. Cruce de carreteras  
 Acatzingo-Zumpahuacán,  
 Unidad de Investigación y  
 Desarrollo, Tenancingo, México

Received August 7, 2014  
 Revised January 30, 2015  
 Accepted February 8, 2015

Analysis of the physical properties of biotherapeutic proteins is crucial throughout all the stages of their lifecycle. Herein, we used size-exclusion ultra high performance liquid chromatography coupled to multiangle light scattering and refractive index detection systems to determine the molar mass, mass-average molar mass, molar-mass dispersity and hydrodynamic radius of two monoclonal antibodies (rituximab and trastuzumab), a fusion protein (etanercept), and a synthetic copolymer (glatiramer acetate) employed as models. A customized instrument configuration was set to diminish band-broadening effects and enhance sensitivity throughout detectors. The customized configuration showed a performance improvement with respect to the high-performance liquid chromatography standard configuration, as observed by a 3 h column conditioning and a higher resolution analysis in 20 min. Analysis of the two monoclonal antibodies showed averaged values of 148.0 kDa for mass-average molar mass and 5.4 nm for hydrodynamic radius, whereas for etanercept these values were 124.2 kDa and 6.9 nm, respectively. Molar-mass dispersity was 1.000 on average for these proteins. Regarding glatiramer acetate, a molar mass range from 3 to 45 kDa and a molar-mass dispersity of 1.304 were consistent with its intrinsic peptide diversity, and its mass-average molar mass was 10.4 kDa. Overall, this method demonstrated an accurate determination of molar mass, overcoming the difficulties of size-exclusion chromatography.

**Keywords:** Biotherapeutic proteins / Hydrodynamic radius / Multiangle light scattering / Synthetic copolymers / Ultra high performance liquid chromatography  
 DOI 10.1002/jssc.201400863

## 1 Introduction

Biopharmaceuticals constitute a group of proteins developed and prescribed for several chronic degenerative diseases such as malignant neoplasms, rheumatoid arthritis, and multiple sclerosis [1]. Hence, the development of analytical techniques is crucial to describe the physicochemical and biological properties that can be regarded as critical quality attributes throughout the whole product lifecycle, which includes characterization and formulation studies, manufacturing process, and shelf life. In particular, the three-dimensional structure of biopharmaceuticals and its variation under certain environments can be explored from the analysis of their molar

mass ( $M$ ), mass-average molar mass ( $M_w$ ), molar-mass dispersity ( $\mathcal{D}_M$ ), and hydrodynamic radius ( $R_h$ ). The ability to detect these attributes is relevant to characterize a protein monomer and its impurities, such as aggregates and truncated forms that may affect safety and efficacy of the drug product [2].

Light scattering technology has provided useful tools for physical characterization of proteins. Static light scattering analyzed at different discrete angles (multiangle light scattering, MALS) is able to provide information on  $M$  of a protein solution or each of its components when resolved by separation methods, by the Rayleigh–Gans–Debye approximation [3,4]. Additionally, dynamic light scattering or quasielastic light scattering (QELS) can provide information on  $R_h$  by measuring the change in scattered light caused by Brownian motion of the scattering molecules, by the Stokes–Einstein equation [5].

The advantages of using a separation technique such as SEC before MALS, QELS, and refractive index (RI) detection, rely on the estimation of  $M$ ,  $M_w$ ,  $\mathcal{D}_M$ , and  $R_h$  for each size

**Correspondence:** Luis Francisco Flores-Ortiz, Cruce de carreteras Acatzingo-Zumpahuacán, Unidad de Investigación y Desarrollo, Tenancingo 52400, México  
**E-mail:** luis.flores@probiomed.com.mx  
**Fax:** +52-(55)-5352-7651

**Abbreviations:**  $R_h$ , hydrodynamic radius;  $M$ , molar mass;  $M_w$ , mass-average molar mass;  $\mathcal{D}_M$ , molar-mass dispersity; MALS, multiangle light scattering; QELS, quasielastic light scattering; RI, refractive index; SE-UHPLC, size-exclusion ultra high performance liquid chromatography

\*Additional corresponding author: Dr. Emilio Medina-Rivero  
 E-mail: emilio.medina@probiomed.com.mx



fraction of an analyzed protein [1, 6]. Although SEC has been widely employed for the determination of  $M$ , its resolution power and accuracy are highly dependent on the hydrodynamic behavior of calibration standards and samples, within a given column matrix, and may not represent the actual behavior of the analyzed protein; in addition, nonideal adsorption can alter  $M$  calculation by affecting the protein retention volume, or lead to mass losses along the column [7–10]. Consequently, SEC–MALS(QELS)–RI coupling allows the accurate estimation and confirmation of calculated  $M$ , overcoming the difficulties of actual size-to-mass calibration curves, thus expected to provide repeatable and reproducible  $M$  values. Still, some samples with highly atypical SEC separations (same hydrodynamic volumes but different  $M$ ), require additional processing to determine  $M$  accurately.

SEC–MALS coupling has been routinely conducted using an HPLC platform [11, 12]; however, it presents disadvantages mainly related to the extended time employed for the analysis (usually  $\sim 40$  min per run) [13] and fine particles released from the column (column shedding) that interfere with light scattering measurements, which in both cases varies depending on the column manufacturer [4]. On the other hand, UHPLC has been alternatively used as an improved technology compared to HPLC due to the use of columns with smaller stationary particles ( $< 2 \mu\text{m}$ ) and superior endurance under higher pressures ( $\sim 17\,000$  psi), shortening the time of analysis, and improving the separation efficiency [14].

In this study, we present a customized system configuration of size-exclusion UHPLC (SE-UHPLC) coupled to UV, MALS, QELS, and RI detectors for the analysis of physical properties of two monoclonal antibodies (rituximab and trastuzumab; chimeric and humanized IgG1, respectively), a fusion protein (etanercept composed of two identical TNFR2:Fc-IgG1 subunits), and a synthetic copolymer (glatiramer acetate composed of four amino acids: L-alanine, L-lysine, L-glutamic acid, and L-tyrosine). In addition, we obtained comparative data between these products acquired from different manufacturers.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Materials

Sodium phosphate dibasic heptahydrate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), sodium phosphate monobasic monohydrate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), sodium chloride (NaCl), and sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ) were obtained from J.T. Baker (Avantor Performance Materials, Center Valley, PA). Acetonitrile, formic acid, and toluene were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). Fifty millimolar Tris buffer at pH 8.0 (Part no. 477427) was obtained from Beckman Coulter (Brea, CA). Water was obtained from a Millipore Milli-Q Biocel system (EMD Millipore; Billerica, MA). Intact mAb Mass Check Standard (Part no. 186006552) was obtained from Waters (Milford, MA). BSA (Part no. 23209) was obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). Gel filtration

standard was obtained from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). All UHPLC running solutions were filtered through a  $0.2 \mu\text{m}$  hydrophilic polypropylene membrane before analyses. Recombinant proteins used for this study were: MabThera<sup>®</sup> (Rituximab 100 mg in 10 mL concentrate for solution for infusion) and Herceptin<sup>®</sup> (Trastuzumab 440 mg powder for concentrate for solution for infusion) from F. Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland; Kikuzubam<sup>®</sup> (rituximab 100 mg in 10 mL concentrate for solution for infusion), Infinitam<sup>®</sup> (etanercept 50 mg powder for solution for subcutaneous use), Probioglat<sup>®</sup> (glatiramer acetate 20 mg/mL solution for subcutaneous use), and Trastuzumab biosimilar drug product (trastuzumab 440 mg powder for concentrate for solution for infusion) from Probiomed, Mexico City, Mexico; Enbrel<sup>®</sup> (etanercept 50 mg/mL solution for subcutaneous use) from Amgen, California, USA; and Copaxone<sup>®</sup> (glatiramer acetate 20 mg/mL solution for subcutaneous use) from Teva Pharmaceutical Industries, Central District, Israel.

### 2.2 Methods

#### 2.2.1 SE-UHPLC procedure

An Acquity UPLC H-Class Bio instrument equipped with an UV detector and Empower Chromatography data collection system (Waters) were used for sample separation and system suitability calculations. Recombinant protein samples were diluted with mobile phase to 3 mg/mL, using extinction coefficients (experimentally obtained from the UV response of samples whose concentration was corrected by refraction index measurements using the theoretical consensus  $\text{dn}/\text{dc}$ ) of  $1.76 \pm 0.01$  ( $n = 18$ ) mL/mg·cm for rituximab,  $1.03 \pm 0.01$  ( $n = 15$ ) mL/mg·cm for etanercept, and  $1.53 \pm 0.01$  ( $n = 18$ ) mL/mg·cm for trastuzumab. Samples of glatiramer acetate were analyzed at 20 mg/mL, whose concentration was verified using the calculated extinction coefficient of  $0.98 \pm 0.03$  ( $n = 15$ ) mL/mg·cm. Intact mAb Mass Check Standard (murine antibody) at 3 mg/mL was injected for system suitability. Gel Filtration Standard was diluted with mobile phase to reach a concentration of 1 mg/mL for bovine thyroglobulin, bovine  $\gamma$ -globulin, and chicken ovalbumin, 0.5 mg/mL for horse myoglobin, and 0.1 mg/mL for vitamin B12; then was analyzed to establish a SEC calibration curve. All the samples were filtered through a  $0.2 \mu\text{m}$  hydrophilic polypropylene filter. The sample temperature was set at  $10^\circ\text{C}$ , whereas the column temperature was set at  $35^\circ\text{C}$  for the analyses of recombinant proteins or  $30^\circ\text{C}$  for the analyses of the synthetic copolymer. Samples were preheated at column temperature during injections in the UHPLC precolumn tubing. UV detector was set at a wavelength of 280 nm. Separation was carried out, after 10  $\mu\text{L}$  of sample injection, on a  $4.6 \times 300$  mm Acquity Ethylene Bridged Hybrid 200 analytical column with  $M$  range from 10 000 to 450 000 Da,  $1.7 \mu\text{m}$  particle size, and pore diameter of 200 Å (Waters). For recombinant

proteins, an isocratic elution at 0.40 mL/min was used with a 20 mM phosphate buffer containing 150 mM NaCl and 3 mM NaN<sub>3</sub>, pH 6.8 and 1.3304 RIU, as mobile phase, while for the synthetic copolymer the isocratic elution was carried out at 0.35 mL/min. Once data collection was completed, the resolution, number of theoretical plates, capacity factor, tailing factor, and selectivity factor values were calculated by the Waters Empower™ software according USP [15].

## 2.2.2 MALS(QELS) and RI procedures

A MALS instrument (DAWN HELEOS-II) with QELS located at angle 99.0°, and a RI detector (Optilab T-rEX) from Wyatt Technologies, Santa Barbara, CA, were used for *M* determinations. Astra 6 software (Wyatt Technologies) was used for data analysis. MALS and RI instruments were operated at 25°C and 658 nm. Data acquisition rate was set to 5 and 1 Hz for MALS and QELS, respectively. Before analyses, the MALS instrument was calibrated using toluene following the manufacturer procedures. Depending on the *M* of the drug product to be analyzed, MALS detectors were normalized using either the Intact mAb Mass Check Standard (for recombinant proteins) or BSA (for synthetic copolymer) as <10 nm isotropic scatterers, as recommended by the manufacturer. Further, UV, MALS, and RI signals were aligned and adjusted for interdetector band broadening using the corresponding algorithms of Astra 6 for each employed isotropic scatterer. Normalization, interdetector alignment and band broadening corrections were applied into each subsequent experiment. *M*, *M<sub>w</sub>*, *D<sub>M</sub>*, and *R<sub>h</sub>* values were obtained using RI as the concentration detector. A specific RI increment (dn/dc) value of 0.185 mL/g was used for recombinant proteins, as the theoretical consensus [16]; while a value of 0.182 ± 0.008 (*n* = 9) mL/g (experimentally calculated from the refraction index response of samples whose concentration was corrected by weight) was used for the synthetic copolymer.

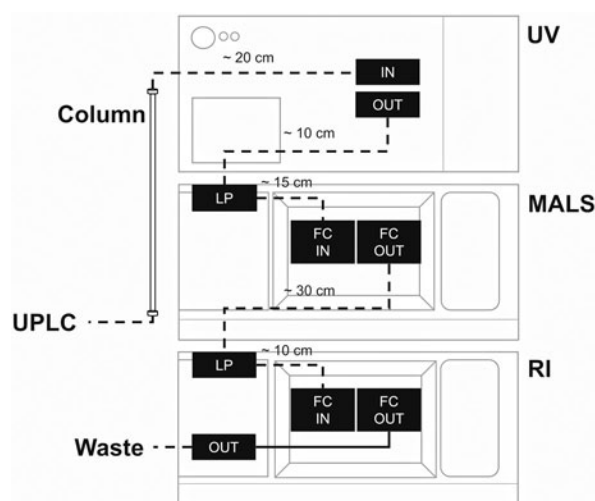
## 2.2.3 MS procedure

Exact mass analysis was performed as previously described [17]. Samples were analyzed on a SYNAPT G2 HDMS coupled to an Acquity UPLC (Waters) using an ESI source (ESI). Samples were diluted to 1.0 mg/mL with 50 mM Tris buffer solution at pH 8.0, and injected through a C<sub>18</sub> BEH 300, 2.1 × 150 mm UPLC column using a linear gradient (1–99% v/v acetonitrile, with 0.1% v/v formic acid). MS acquisition range was set from 500 to 4000 *m/z*. Data processing was performed with the BiopharmaLynx software v1.3.1 from Waters.

## 3 Results and discussion

### 3.1 System configuration

After SEC separations, the configuration of light scattering (MALS) and concentration (UV or RI) detectors can influence



**Figure 1.** UHPLC–UV–MALS(QELS)–RI system configuration. Dashed line, 0.01'' PEEK tubing; solid line, steel tubing; LP: leak port located at instrument's top cover; FC: flow cell.

**Table 1.** Chromatographic system performance

| Parameter                    | Mean         | Literature            |
|------------------------------|--------------|-----------------------|
| Retention time (min)         | 6.45 ± 0.00  | NA                    |
| Resolution                   | 2.4 ± 0.0    | >2.0 <sup>[10]</sup>  |
| Number of theoretical plates | 10 000 ± 200 | >2000 <sup>[10]</sup> |
| Capacity factor              | 2 ± 0        | 2–10 <sup>[10]</sup>  |
| Tailing factor               | 2 ± 0        | ≤2 <sup>[10]</sup>    |
| Selectivity factor           | 1 ± 0        | >1 <sup>[14]</sup>    |

Variation is presented as SD (*n* = 3). For experimental conditions, see Section 2.

*M* and size determinations [1]. Depending on the system, analyte diffusion can occur in a lesser or greater degree, during their transit from the SEC column to the UV, MALS, and RI detectors, which should also account for potential losses of protein throughout the system. In this regard, RI detector was used as the absolute concentration data source at the end of the instrument configuration, because it responds to the composition of the analyte rather than its spatial arrangement, unlike UV detection that responds to the spatial allocation of chromophores (i.e., tryptophan, tyrosine, phenylalanine, histidine, and disulfide bonds) in the protein. Besides, band-broadening effects were minimized by a reduction of the tubing length from the injector to the last detector [18]. Figure 1 shows a schematic representation of the customized SE-UHPLC–UV–MALS(QELS)–RI system configuration. UV detector was placed on the MALS instrument, and further placed on the RI detector. Interdetector connections were abridged to the minimal extent using 0.01 polyetheretherketone (PEEK) tubing.

Additionally, as the high efficiency of UHPLC technology resulted in the rapid elution of analytes, evidenced by narrower width peaks (<2 min), the acquisition of sufficient

**Table 2.** Comparison of physical properties among intermanufacturer drug products

| Drug               | Brand                                 | Batch      | $M_w$ (kDa) | $R_h$ (nm) | $\mathcal{D}_M$ |
|--------------------|---------------------------------------|------------|-------------|------------|-----------------|
| Rituximab          | MabThera®                             | B6083      | 148.2 ± 0.2 | 5.4 ± 0.1  | 1.000 ± 0.000   |
|                    |                                       | B6084      | 148.0 ± 0.2 | 5.3 ± 0.1  | 1.000 ± 0.000   |
|                    |                                       | B2101      | 148.1 ± 0.4 | 5.4 ± 0.1  | 1.000 ± 0.001   |
|                    | Kikuzubam®                            | 5445120306 | 148.3 ± 0.1 | 5.3 ± 0.1  | 1.000 ± 0.001   |
|                    |                                       | 5445120508 | 148.5 ± 0.2 | 5.4 ± 0.0  | 1.000 ± 0.001   |
|                    |                                       | 5445120609 | 148.1 ± 0.2 | 5.4 ± 0.1  | 1.000 ± 0.000   |
| Trastuzumab        | Herceptin®                            | B3423B020  | 148.2 ± 0.4 | 5.4 ± 0.0  | 1.000 ± 0.000   |
|                    |                                       | B3430B010  | 147.5 ± 3.0 | 5.3 ± 0.1  | 1.000 ± 0.001   |
|                    |                                       | B34310     | 148.0 ± 1.1 | 5.4 ± 0.0  | 1.001 ± 0.001   |
|                    | Trastuzumab's biosimilar drug product | 5423120601 | 148.4 ± 0.5 | 5.5 ± 0.4  | 1.000 ± 0.001   |
|                    |                                       | 5423140201 | 148.1 ± 0.5 | 5.4 ± 0.0  | 1.000 ± 0.000   |
|                    |                                       | 5423121103 | 148.0 ± 0.7 | 5.4 ± 0.1  | 1.000 ± 0.000   |
| Etanercept         | Enbrel®                               | E87320     | 124.6 ± 0.1 | 6.9 ± 0.1  | 1.000 ± 0.001   |
|                    |                                       | F40596     | 123.7 ± 0.9 | 6.8 ± 0.0  | 1.001 ± 0.000   |
|                    |                                       | G18414     | 125.2 ± 1.3 | 6.9 ± 0.0  | 1.001 ± 0.001   |
|                    | Infinitam®                            | 4510130102 | 123.8 ± 0.4 | 6.9 ± 0.0  | 1.000 ± 0.000   |
|                    |                                       | 4510130203 | 123.6 ± 0.8 | 6.9 ± 0.1  | 1.000 ± 0.000   |
|                    |                                       | 4510130508 | 124.5 ± 0.4 | 6.8 ± 0.0  | 1.000 ± 0.000   |
| Glatiramer Acetate | Copaxone®                             | P53567     | 10.9 ± 0.0  | NA         | 1.282 ± 0.018   |
|                    |                                       | P53749     | 10.5 ± 0.1  | NA         | 1.343 ± 0.024   |
|                    |                                       | P53814     | 10.1 ± 0.1  | NA         | 1.289 ± 0.007   |
|                    | Probioglat®                           | 4363130916 | 10.3 ± 0.0  | NA         | 1.279 ± 0.023   |
|                    |                                       | 4363130103 | 10.0 ± 0.0  | NA         | 1.223 ± 0.005   |
|                    |                                       | 4363130507 | 10.6 ± 0.0  | NA         | 1.240 ± 0.014   |

Variation is presented as confidence interval at 95% ( $n = 3$ ). For experimental conditions, see Section 2.

data points was required for an accurate estimation of  $M_w$ ,  $\mathcal{D}_M$ , and  $R_h$ , so that the data acquisition rates were fixed at 5 Hz for MALS and 1 Hz for QELS, which represent an increment from typical HPLC-based configuration values of 1 and 0.5 Hz, respectively (Wyatt Technologies).

### 3.2 System performance

Before sample analysis, MALS baseline needs to be stabilized in terms of its noise and potential drifts caused by column shedding. The SE-UHPLC column conditioning, using mobile phase at 0.40 mL/min, was accomplished in 3 h as denoted by MALS signal that reach  $\sim 40 \mu\text{V}$ , in accordance to the accepted noise level of 30–50  $\mu\text{V}$  derived from photodiode and solvent scattering in a HELEOS II (Wyatt Technologies); overall this represents a saving in reagent consumption and an eightfold decrease in column conditioning time compared to SE-HPLC (>24 h).

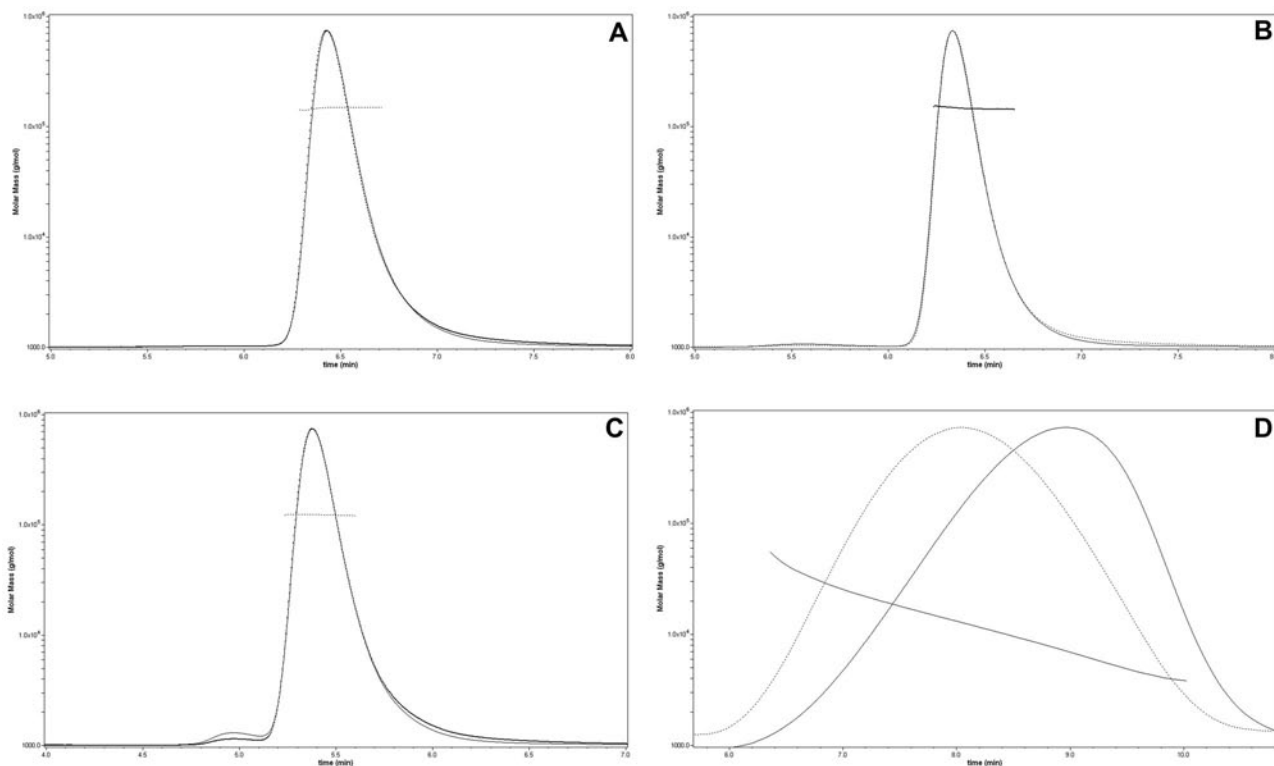
The system performance was evaluated using the Intact mAb Mass Check Standard. A retention time of  $6.45 \pm 0.00$  min ( $n = 3$ ) was obtained within a total experiment runtime of 20 min. After separation, data were processed in terms of resolution, number of theoretical plates, capacity factor, tailing factor, and selectivity factor. The results are shown on Table 1; as can be noticed all parameters were consistent with the reported criteria [14, 19], which demonstrated system suitability.

$M_w$  of Intact-mAb-Mass-Check-Standard monomer was  $149.9 \pm 0.3$  kDa ( $n = 3$ ), with a  $R_h$  of  $5.2 \pm 0.1$  nm ( $n = 3$ ), which corresponded to the abundance-weighted average mass of 148.4 kDa coming from the native glycoforms of the standard (exact mass for each glycoform: 148.2 kDa, G0F/G0F; 148.4 kDa, G0F/G1F; 148.5 kDa, G1F/G1F; 148.7 kDa, G1F/G2F; and 148.9 kDa, G2F/G2F). Both parameters also corresponded with the reported values of  $\sim 150$  kDa [19] and 5–6 nm [20] for immunoglobulins (IgGs).

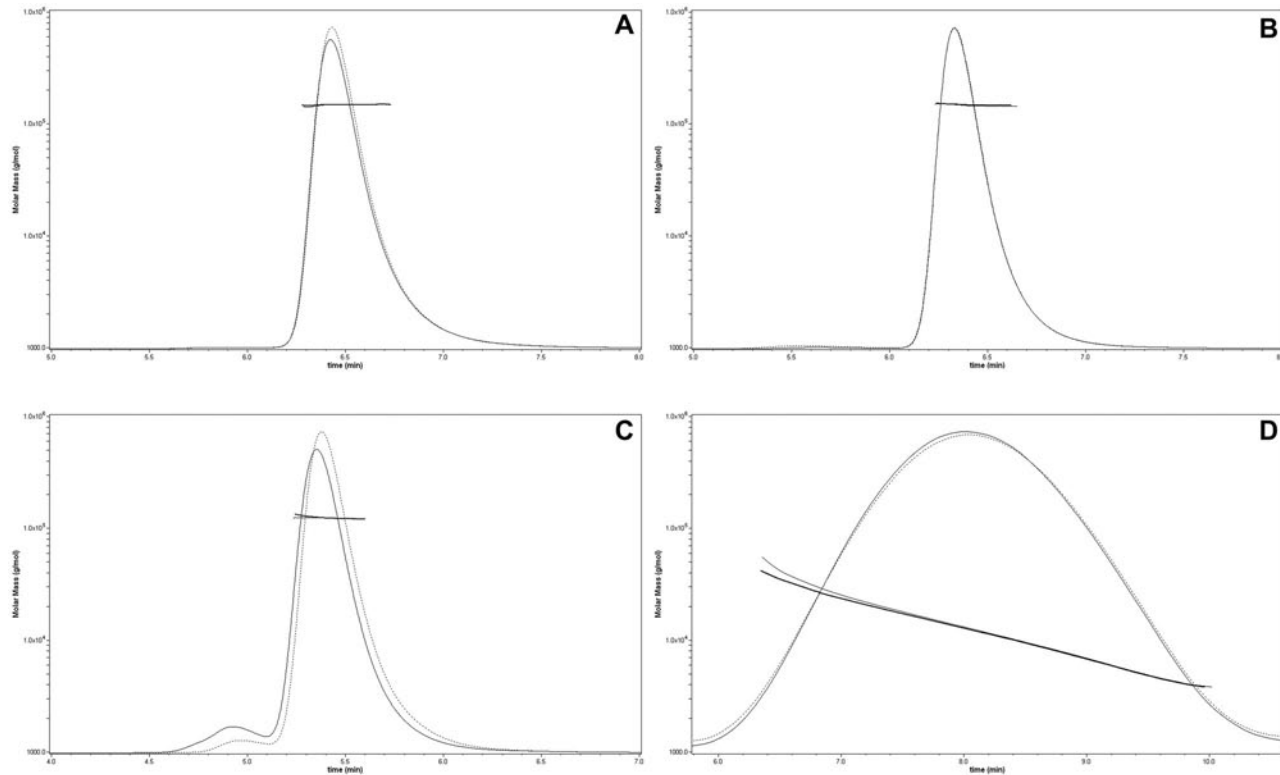
### 3.3 SE-UHPLC–UV-MALS(QELS)-RI analysis of drug products

Mean values of  $M_w$ ,  $\mathcal{D}_M$ , and  $R_h$  from three batches of rituximab, trastuzumab, etanercept, and glatiramer acetate of each manufacturer are summarized in Table 2.

$M_w$  and  $R_h$  for rituximab by SE-UHPLC–UV-MALS (QELS)-RI were  $148.1 \pm 0.2$  kDa, and  $5.4 \pm 0.1$  nm, respectively, while for trastuzumab were  $147.9 \pm 0.6$  kDa and  $5.4 \pm 0.1$  nm. In both cases,  $M_w$  corresponded to the exact masses calculated by MS (abundance-weighted average from detected glycoforms) of 147.3 kDa for rituximab and 148.3 kDa for trastuzumab; and reported data for IgGs (150.1 kDa) [11]. Whereas using the calculated third-order polynomial calibration curve of SEC ( $\log_{10}M_w = 27.903(V_R/V_C)^3 - 51.948(V_R/V_C)^2 + 26.747(V_R/V_C) - 1.162$ ;  $R^2 = 0.999$ ),  $M_w$  was  $136.2 \pm 0.1$  kDa for rituximab and 152.7



**Figure 2.** MALS and RI signals for (A) rituximab, (B) trastuzumab, (C) etanercept, and (D) glatiramer acetate. Dotted lines: MALS signal from 90.0° detector. Solid lines: RI signal.



**Figure 3.** MALS chromatograms and molar-mass distributions of (A) rituximab, (B) trastuzumab, (C) etanercept, and (D) glatiramer acetate products. Solid lines: Mabthera®, Herceptin®, Enbrel®, and Copaxone®. Dotted lines: Kikuzubam®, Biosimilar Trastuzumab Drug Product, Infinitam®, and Probioglat®.

$\pm 0.8$  kDa for trastuzumab, revealing a higher  $M$  accuracy of MALS-RI coupling. On the other hand, the calculated  $R_h$  values were also consistent with the reported range from 5 to 6 nm for IgGs [21]. Similarly, etanercept SE-UHPLC–UV-MALS(QELS)-RI  $M_w$  of  $124.5 \pm 1.3$  kDa and  $R_h$  of  $6.9 \pm 0.1$  nm, corresponded to published values around 130 kDa and 7.1 nm [22]. Although this  $M_w$  differs from the apparent  $M \sim 150$  kDa determined by SDS-PAGE [23]; it should be considered that the high content of N- and O-glycans (up to 30% of its total mass) may affect its scattering and refractive properties [24], for instance pure oligosaccharides  $dn/dc$  values are close to 0.15 mL/g [25]; along with the known deviations of apparent masses calculation, analogous to SEC inconveniences; as seen from the SEC calculated  $M_w$  of  $453.8 \pm 2.9$  kDa, which differs  $\sim 3.5$  times with respect to the expected value from 102.6, considering the deglycosylated amino acid sequence, to 146.6 kDa with a glycan content up to 30%.

Calculated  $\mathcal{D}_M$  were  $1.000 \pm 0.000$  for rituximab,  $1.001 \pm 0.001$  for trastuzumab, and  $1.001 \pm 0.001$  for etanercept.  $\mathcal{D}_M = 1$  indicates that the selected peak (Figs. 2 and 3) appeared to be composed of homogeneous mass species (i.e., uniform polymer) [26]. Although SE-UHPLC has a higher resolution than SE-HPLC, all post-translational modifications that should be differentiated, as monomer variants, are unable to become resolved by these techniques (MS analyses exhibited a  $<2.2$  kDa difference among this variants), thus the mass of the monomer peak seemed to be uniform regardless of their embedded masses and their actual heterogeneous nature (i.e.: nonuniform polymer).

Glatiramer acetate  $\mathcal{D}_M$  was  $1.304 \pm 0.057$  indicating that the selected peak (Figs. 2 and 3) consists of a polymer composed of heterogeneous mass species (i.e., nonuniform polymer) [26] with an observed molar-mass range from 3 to 45 kDa. Its  $M_w$  of  $10.5 \pm 0.7$  kDa reveals a major abundance of low molar-mass peptides, in correspondence to the expected averaged  $M$  of glatiramer acetate from 4.7 to 11.0 kDa [27]. These results evidenced the improvement on the  $M$  determination by MALS-RI after SEC analysis, where  $M_w$  of  $98.2 \pm 8.4$  kDa within a molar-mass range from 21 to 725 kDa, calculated from the SEC calibration curve for both glatiramer acetate products, sustains this assertion.

It is also important to remark that glatiramer acetate samples were analyzed at 20 mg/mL to detect all the peptides included on its distribution; because it is well known that the light scattering signal is proportional to the  $M$  of the analyzed species, thus the accuracy for lower  $M$  species depends on the available amount of sample to be detected [10]. Though this concentration represents more than six times the concentration used for recombinant proteins, glatiramer acetate is eluted with a volume more than five times larger; resulting in a single wider chromatographic peak where each of its peptides can be detected.

Finally, a comparative analysis between the evaluated products was conducted to determine if  $M_w$ ,  $R_h$ , and  $\mathcal{D}_M$  values were comparable among manufacturers (Table 2). In all cases the calculated  $M_w$ ,  $\mathcal{D}_M$ , and  $R_h$  for rituximab, trastuzumab, etanercept, and glatiramer acetate suggest that

the values obtained for the evaluated physical attributes were similar among products, as evidenced by the overlapping of their 95% confidence intervals.

## 4 Concluding remarks

In this study, UHPLC was coupled to MALS and RI detectors in a customized system configuration used to determine  $M$ ,  $M_w$ ,  $\mathcal{D}_M$ , and  $R_h$  of different biotherapeutic proteins and a synthetic copolymer.

This system configuration allowed shortening runtime for column conditioning, compliance of chromatographic system suitability, high S/N, and responses that corresponded to the expected values for a standard sample. An SEC method executed through this configuration was successfully applied to different protein models, including two monoclonal antibodies, a fusion protein, and a synthetic copolymer. The obtained results were confirmed by inter-manufacturer analyses of the corresponding drug products. Overall, the advantages of a SE-UHPLC–UV-MALS(QELS)-RI system rely on the high efficiency, accuracy, and briefer analysis time that can be used for the elucidation of physical properties of proteins.

*This work was supported by CONACYT, Mexico grants FINNOVA 174102, 174104, and 174106. We thank Carlos A. López-Morales for his valuable collaboration.*

*The authors are employees of Probiomed S.A. de C.V., which is developing, manufacturing and marketing biosimilar products. All authors are involved in the development of biosimilar products for Probiomed.*

*The authors have declared no conflict of interest.*

## References

- [1] Samra, H. S., He, F., *Mol. Pharm.* 2012, 9, 696–707.
- [2] Putnam, W., Prabhu, S., Zheng, Y., Subramanyam, M., Wang, Y., *Trends Biotechnol.* 2010, 28, 5009–516.
- [3] Wyatt, P. J., *Anal. Chim. Acta* 1993, 272, 1–40.
- [4] Sahin, E., Roberts, C. J., in: Voynov, V., Caravella, J. A. (Eds.), *Therapeutic Proteins: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, Humana Press, New York 2012, pp. 403–423.
- [5] Gast, K., Fiedler, C., in: Uversky, V. N., Dunker, A. K. (Eds.), *Intrinsically Disordered Protein Analysis: Volume 2, Methods and Experimental Tools, Methods in Molecular Biology*, Humana Press, New York 2012, pp. 137–161.
- [6] Cao, A., *Anal. Lett.* 2003, 36, 3185–3225.
- [7] Stulik, K., Pacáková, V., Tichá, M., *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2003, 56, 1–13.
- [8] Kopaciewicz, W., Regnier F. E., *Anal. Biochem.* 1982, 126, 8–16.
- [9] Golovchenko, N. P., Kataeva, I. A., Akimenko, V. K., *J. Chromatogr.* 1992, 591, 121–128.

- [10] Hong, P., Koza, S., Bouvier, E. S. P., *J. Liq. Chromatogr.* 2012, *35*, 2923–2950.
- [11] Ye, H., *Anal. Biochem.* 2006, *356*, 76–85.
- [12] Soman, G., Kallarakal, A.T., Michiel, D., Yang, X., Saptharishi, N., Jiang, H., Giardina, S., Gilly, J., Mitra, G., *mAbs* 2012, *4*, 84–100.
- [13] Wren, S. A. C., Tchelitcheff, P., *J. Chromatogr. A* 2006, *1119*, 140–146.
- [14] Gumustas, M., Kurbanoglu, S., Uslu, B., Ozkan, S.A., *Chromatographia* 2013, *76*, 1365–1427.
- [15] The United States Pharmacopeia (36), The National Formulary (31), Chapter 621, 2009.
- [16] Barer, R., Josephs, R., *Q. J. Microsc. Sci.* 1954, *95*, 399–423.
- [17] Flores-Ortiz, L. F., Campos-García, V. R., Perdomo-Abúndez, F. C., Pérez, N. O., Medina-Rivero, E., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2014, *37*, 1438–1452.
- [18] Kirkland, J. J., Yau, W. W., Stoklosa, H. J., Dilks, C. H. Jr. *J Chromatogr Sci.* 1977, *15*, 303–316.
- [19] The United States Pharmacopeia (37), The National Formulary (32) 2006, pp. 301–308.
- [20] Rosati, S., Yang, Y., Barendregt, A., Heck, A. J. R., *Nat. Protoc.* 2014, *9*, 967–976.
- [21] Hawe, A., Husle, W. L., Jiskoot, W., Forbes, R. T., *Pharm. Res.* 2011, *28*, 2302–2310.
- [22] Kohno, T., Tam, L. T., Stevens, S. R., Louie, J. S., *J. Invest. Derm. Symp. P.* 2007, *12*, 5–8.
- [23] VanMaarschalkerweerd, A., Wolbink, G. J., Stapel, S. O., Jiskoot, W., Hawe, A., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2011, *78*, 213–221.
- [24] Wen, J., Arakawa, T., Philo, J. S., *Anal. Biochem.* 1996, *240*, 155–166.
- [25] Fedosov, N., Fedosova, N. U., Berglund, L., Moestrup, S. K., Nexø, E., Petersen, T., *Biochemistry* 2004, *43*, 15095–15102.
- [26] Stepto, R. F. T., *Pure Appl. Chem.* 2009, *81*, 351–353.
- [27] Neuhaus O., Farina C., Werkele H., Hohlfeld R., *Neurology* 2001, *56*, 702–708.

## Research Article

# Assessment of Physicochemical Properties of Rituximab Related to Its Immunomodulatory Activity

Mariana P. Miranda-Hernández,<sup>1</sup> Carlos A. López-Morales,<sup>1</sup>  
Nancy D. Ramírez-Ibáñez,<sup>1</sup> Nelly Piña-Lara,<sup>1</sup> Nestor O. Pérez,<sup>1</sup> Aarón Molina-Pérez,<sup>2</sup>  
Jorge Revilla-Beltri,<sup>2</sup> Luis F. Flores-Ortiz,<sup>1</sup> and Emilio Medina-Rivero<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigación y Desarrollo, Probiomed S.A. de C.V., Cruce de carreteras Acatzingo-Zumpahuacán, 52400 Tenancingo de Degollado, MEX, Mexico

<sup>2</sup>Dirección Médica, Probiomed S.A. de C.V., Avenida Ejército Nacional No. 499, Colonia Granada, Delegación Miguel Hidalgo, 11520M México, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Luis F. Flores-Ortiz; luis.flores@probiomed.com.mx and Emilio Medina-Rivero; emilio.medina@probiomed.com.mx

Received 26 September 2014; Revised 19 December 2014; Accepted 20 December 2014

Academic Editor: Oscar Bottasso

Copyright © Mariana P. Miranda-Hernández et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Rituximab is a chimeric monoclonal antibody employed for the treatment of CD20-positive B-cell non-Hodgkin's lymphoma, chronic lymphocytic leukemia, rheumatoid arthritis, granulomatosis with polyangiitis and microscopic polyangiitis. It binds specifically to the CD20 antigen expressed on pre-B and consequently on mature B-lymphocytes of both normal and malignant cells, inhibiting their proliferation through apoptosis, CDC, and ADCC mechanisms. The immunomodulatory activity of rituximab is closely related to critical quality attributes that characterize its chemical composition and spatial configuration, which determine the recognition of CD20 and the binding to receptors or factors involved in its effector functions, while regulating the potential immunogenic response. Herein, we present a physicochemical and biological characterization followed by a pharmacodynamics and immunogenicity study to demonstrate comparability between two products containing rituximab. The physicochemical and biological characterization revealed that both products fit within the same response intervals exhibiting the same degree of variability. With regard to clinical response, both products depleted CD20+ B-cells until posttreatment recovery and no meaningful differences were found in their pharmacodynamic profiles. The evaluation of anti-chimeric antibodies did not show differential immunogenicity among products. Overall, these data confirm that similarity of critical quality attributes results in a comparable immunomodulatory activity.

## 1. Introduction

Rituximab is a chimeric monoclonal antibody (mAb) approved by the FDA on 1997 as single agent for the treatment of relapsed or refractory, low-grade or follicular CD20-positive B-cell non-Hodgkin's lymphoma (NHL) and later, in 2006, as a treatment in combination with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) or other anthracycline-based chemotherapy regimens for patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). In both cases

it increases the response rate, diminishes disease progression events, and augments patients survival [1–3].

The molecular weight of rituximab is 144,544 Da and is constituted of 1328 aa. As an IgG isotype 1/ $\kappa$ , rituximab contains a conserved N-glycosylation site at Asn297 of both heavy chains and is occupied by biantennary glycan structures, while murine variable regions and human constant regions define its chimeric nature.

Rituximab mechanisms of action comprise the binding of its Fab domain to CD20+ B-lymphocytes for the induction

of apoptosis, either directly or throughout the recruitment of immune effector functions by its Fc domain, thus mediating B-cell lysis through complement-dependent cytotoxicity mechanism (CDC), after binding to C1q, or antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism (ADCC) once is recognized by the Fcγ receptors (FcγRs) of effector cells, including natural killers, granulocytes, and macrophages [4–6].

Besides, the current knowledge concerning monoclonal antibodies (mAb) permits us to correlate the immunomodulatory activity of a mAb to critical quality attributes (CQAs) that depict its chemical composition and spatial configuration. On this regard, rituximab CQAs are associated with the appropriate recognition of CD20+ B-cells and the achievement of effector functions. Nevertheless, rituximab is subject to posttranslational modifications that can be acquired during its lifecycle, which provides an inherent physicochemical heterogeneity that could impact on its functionality [7, 8]. Although this heterogeneity is expected to occur batch to batch, its variability breadth can be controlled during the manufacturing process; thus, an acceptance range should be established for each CQA, depending on the observed safety and efficacy for the given process capabilities [9]. This is particularly important for the development of follow-on products, for which the demonstration of highly similar CQAs variability, along with the demonstration of comparable pharmacological responses with respect to the reference product, grant the biosimilar denomination [10–12].

Charge and glycosylation heterogeneities are relevant modifications that influence the immunomodulatory activity of mAbs. It is reported that acidic and basic isoforms, coming mainly from oxidation, deamidation, isomerization, amination, cyclization, glycation, and the presence of C-terminal lysines [13], could alter the mAb affinity to target and receptor molecules due to the modification of electrostatic and hydrophobic interactions with cell membranes. On the other hand, glycosylation contributes in maintaining stability of the mAbs' three-dimensional structure and modulates the binding interaction of the Fc domain to the effector cells, influencing CDC and ADCC mechanisms [14].

Regarding its immunogenicity, rituximab is considered as a low risk molecule although potentially immunogenic, since it does not exhibit cross-reactions with endogenous antibodies or autoimmunity induction; however, due to its chimeric nature, the production of human anti-chimeric antibodies (HACAs) may lead to the loss of efficacy in certain cases. Consequently, to discard any differential immunogenic response of a biosimilar rituximab, the comparability of its chemical composition (i.e., sequence and posttranslational modifications) should be demonstrated [15, 16]. Aggregation is another attribute that has been also identified as a CQA that participates in the development of an immunogenic response [17].

In this work, we conducted a comprehensive characterization followed up by a pharmacodynamics-immunogenicity clinical study of two products containing rituximab. The characterization exercise is focused on the comparison between the CQAs associated with the pharmacodynamic

profile (PD) and the potential immunogenicity of rituximab such as protein identity (amino acid sequence), charge and glycosylation heterogeneity, aggregates content, and binding affinity to FcγRIIa and FcγRIIIa, while the biological characterization included measurement of the affinity to CD20 and potency through ADCC and CDC. The clinical evaluation was intended to demonstrate that both products exhibit the same behaviour as the result of a high physicochemical comparability.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Materials.** Dibasic sodium phosphate heptahydrate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), monobasic sodium phosphate monohydrate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), sodium chloride (NaCl), Tris-hydrochloride ( $\text{NH}_2\text{C}(\text{C}_2\text{OH})_3 \cdot \text{HCl}$ ), and sodium hydroxide (NaOH) were obtained from J. T. Baker (Center Valley, PA). Sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ), ammonium formate ( $\text{CH}_5\text{NO}_2$ ), RPMI-1640 medium, fetal bovine serum (FBS), and formic acid were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). 2-Aminobenzamide (2-AB) was obtained from ProZyme Inc. (Hayward, CA); PNGase F was purchased from New England Biolabs (Woburn, MA) and Human IgG-Fc antibody from Bethyl Laboratories Inc. (Montgomery, TX). Tetramethylbenzidine (TMB) substrate was obtained from Thermo Scientific (Waltham, MA). ADCC Reporter Bioassay Kit and CellTiter 96 MTT were purchased from Promega (Madison, WI). Water was obtained from a Millipore Milli-Q Biocel system (Billerica, MA). All solutions were filtered through  $0.2 \mu\text{m}$  prior to analysis. Two products containing rituximab were employed: Kikuzubam from Probiomed S.A. de C.V., Mexico, and MabThera from F. Hoffmann-La Roche Ltd. Basel, Switzerland, as the reference product.

**2.2. Mass Spectrometry (MS).** MS analyses were performed on a SYNAPT G2 HDMS (Waters Corp.; Manchester, UK) coupled to an ACQUITY UPLC H-Class Bio System (Waters Corp., Milford, MA) using an ESI source. Data was analyzed using BiopharmaLynx software (Waters Corp., Milford, MA) according to reported conditions [18].

**2.3. Charge Heterogeneity.** Capillary isoelectrofocusing (cIEF) was performed as we described in a previous report [19].

**2.4. Glycosylation Heterogeneity.** Glycan release and derivatization were performed as previously described [20]. Chromatographic separation was carried out using an ACQUITY UPLC H-Class Bio System with a linear gradient from 22 to 50% of acetonitrile using 100 mM ammonium formate aqueous solution at pH 4.50 as mobile phase A. Fluorescence detection was set at an excitation wavelength of 250 nm and 420 nm for emission, using a  $150 \times 2.1 \text{ mm}, 1.7 \mu\text{m}$  ACQUITY UPLC BEH glycan column coupled with a  $1.7 \mu\text{m}$  VanGuard BEH Glycan Precolumn from Waters Corp. (Milford, MA).

**2.5. Aggregates.** Rituximab purity was assessed on a  $4.6 \text{ mm} \times 300 \text{ mm}$  ACQUITY Ethylene Bridged Hybrid 200 analytical



column with particle and pore diameters of  $7.7 \mu\text{m}$  and  $200 \text{ \AA}$ , respectively (Waters Corp., Milford, MA).  $20 \text{ mM}$  phosphate buffer containing  $150 \text{ mM}$  NaCl and  $3 \text{ mM}$   $\text{NaN}_3$  at pH 6.8 was used as mobile phase with isocratic gradient. UV detector was set at  $280 \text{ nm}$  in an ACQUITY UPLC H-Class Bio System.

**2.6. Affinity Constants.** Affinity constants under equilibrium ( $K_a$ ) were obtained by isothermal titration calorimetry (ITC) using a Nano ITC instrument from TA Instruments Inc. (New Castle, DE).  $300 \mu\text{L}$  of Fc $\gamma$ RIIa and Fc $\gamma$ RIIIa solutions at  $5.0 \mu\text{M}$  in PBS at pH 7.0 was titrated with continuous injections of  $1.9 \mu\text{L}$  rituximab solutions at  $50 \mu\text{M}$  in PBS at pH 7.0 until saturation at  $25^\circ\text{C}$ . NanoAnalyze Software v2.4.1 (TA Instruments Inc.; New Castle, DE) was used for the integration of heat signals and nonlinear regression analysis of the data.

**2.7. Affinity to CD20.** WIL2-S cell line (ATCC: CRL-8885) that expresses the CD20 antigen was incubated in the presence of different concentrations of rituximab in RPMI-1640 medium with  $10\%$  FBS for 2 h at  $37^\circ\text{C}$ . A secondary antibody (anti-human IgG-Fc) coupled to a radish peroxidase was added to detect the rituximab-WIL2-S complex after 1 h of incubation at  $37^\circ\text{C}$ , using TMB as substrate for 30 min at room temperature. Absorption was acquired at  $450 \text{ nm}$ . The test results were expressed as the relative percentage of the  $\text{EC}_{50}$  from the concentration-response curve of Kikuzubam with respect to the reference product.

**2.8. CDC Assay.** CD20 positive cells (WIL2-S, ATCC CRL-8885) were incubated in RPMI 1640 media with  $10\%$  of FBS with different concentrations of rituximab and complement human serum for 4 h at  $37^\circ\text{C}$  and  $5\%$   $\text{CO}_2$ . Then MTS substrate was added to each well with a further incubation of 2 h at the same conditions. The result of the assay was expressed as % relative potency, which is obtained comparing to the  $\text{EC}_{50}$  of the dose-response curve of Kikuzubam with respect of the  $\text{EC}_{50}$  of the dose-response curve of the reference product.

**2.9. ADCC Assay.** The ADCC Reporter Bioassay Kit from Promega (Madison, WI) was used according to manufacturer instructions. CD20 positive cells (WIL2-S, ATCC CRL-8885) were incubated with different concentrations of test antibody and a specific concentration of Jurkat transformed cells expressing CD16. Then a luminescent substrate was added with further incubation of 20 min. The result of the assay was expressed as % of relative potency of Kikuzubam with respect to the reference product.

**2.10. Clinical Assessment.** A double-blind, randomized, three-arm, and prospective study was designed. Two arms (1 and 2) were crossed after three cycles of treatment in order to review the expected use conditions of Kikuzubam and the possible impact on its efficacy as suggested by the Mexican health authorities.

The study protocol was approved by the IRB/IEC (Institutional Review Board/Independent Committee) of the participating research centres and by the Mexican health authorities (study protocol codes CAS/OR/01/CMN/083300410<sup>a</sup>1444-0114/2009 and CAS/OR/01/CMN/07330021830339-0816/2008). The study was conducted in accordance with the regulations and ethical principles based on the Declaration of Helsinki, the principles of the International Conference on Harmonization (ICH), and the Guidelines for Good Clinical Practice (GCP). An informed consent was obtained from all patients prior to their participation in the study. All procedures were explained in detail to the patients and all doubts were resolved.

The aim of the study was to evaluate the biological effects and safety of Kikuzubam compared to the reference product during six treatment cycles with CHOP therapy. Patients received either Kikuzubam or the reference product in each cycle, according to their treatment group, at a dose of  $375 \text{ mg/m}^2$  every 14 days by IV infusion. 59 patients diagnosed with moderate to high degree diffuse CD20+ B-cell non-Hodgkin lymphoma were randomly assigned into three groups. Group 1 was treated with Kikuzubam during the first three cycles and subsequently with the reference product for the remaining three cycles. Group 2 was initially treated with the reference product for three cycles and then with Kikuzubam for the next three cycles. Group 3 was treated with Kikuzubam throughout six cycles. All patients received concomitant CHOP chemotherapy for the six cycles. A 12-month observational period was included after the completion of the treatments.

Blood samples were collected from all patients for the determination of CD20+ B-cells levels as the PD endpoint on visits 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, and 12 using a CD20 Becton Dickinson FITC Labelling Kit in a EPIC XL Beckman Coulter Inc. (Brea, CA) flow cytometer. Additionally, levels of serum human anti-chimeric antibodies (HACAs) were determined using the Human Antirrituximab (HADA/HACA/HAMA/HAHA) IgG ELISA Kit for Human from Alpha Diagnostics (San Antonio, TX). The assay precision was determined from the graphs obtained with serum samples, resulting in a coefficient of variation (CV) lower than  $10\%$  with accuracy ranging from  $90$  to  $110\%$ .

**2.11. Statistical Analysis.** Analysis of covariance was performed to evaluate the effect of both treatments (Kikuzubam and the reference product) on the number of CD20+ B-cells relative to basal values (covariable). The ANOVA test was evaluated with a significance level of  $0.05$ .

To avoid the effect of crossing treatments, the CD20+ B-cells depletion analyses were performed considering only the results from the first three cycles of treatment with either Kikuzubam or the reference product, in order to compare the response between treatments in a parallel design.

### 3. Results and Discussion

The physicochemical properties of rituximab are discussed according to its impact on PD and immunogenicity potential.



| HC                          |            |                       |            |                             |            |  |
|-----------------------------|------------|-----------------------|------------|-----------------------------|------------|--|
| Control coverage (%)        | 98.7       | Combined coverage (%) | 98.7       | Analyte coverage (%)        | 0.0        |  |
| Control unique coverage (%) | 98.7       | Common coverage (%)   | 0.0        | Analyte unique coverage (%) | 0.0        |  |
| 1:1 to 50                   | QVQLQPGAE  | LVKPGASVKM            | SCKASGYTFT | SYNMHWVKQT                  | PGRGLEWIGA |  |
| 1:51 to 100                 | IYPGNGDTSY | NQKFKGKATL            | TADKSSSTAY | MQLSSTLSED                  | SAVYYCARST |  |
| 1:101 to 150                | YYGGDWYFNV | WGAGTTVTVS            | AASTKGPSVF | PLAPSSKSTS                  | GGTAALGCLV |  |
| 1:151 to 200                | KDYFPEPVTV | SWNSGALTSG            | VHTFPAVLQS | SGLYSLSSVV                  | TVPSSSLGTQ |  |
| 1:201 to 250                | TYICNVNHKP | SNTKVDKKA             | PKSCDKTHTC | PPCPAPELLG                  | GPSVFLFPPK |  |
| 1:251 to 300                | PKDTLMISRT | PEVTCVVVDV            | SHEDPEVKFN | WYVDGVEVHN                  | AKTKPREEQY |  |
| 1:301 to 350                | NSTYRVVSVL | TVLHQDWLNG            | KEYCKVSNK  | ALPAPIEKTI                  | SKAKGQPREP |  |
| 1:351 to 400                | QVYTLPPSRD | ELTKNQVSLT            | CLVKGFYPSD | IAVEWESNGQ                  | PENNYKTPPP |  |
| 1:401 to 450                | VLDSGGSFFL | YSKLTVDKSR            | WQQGNVFSCS | VMHEALHNHY                  | TQKSLSLSPG |  |
| 1:451 to 451                | K          |                       |            |                             |            |  |
| LC                          |            |                       |            |                             |            |  |
| Control coverage (%)        | 98.6       | Combined coverage (%) | 98.6       | Analyte coverage (%)        | 0.0        |  |
| Control unique coverage (%) | 98.6       | Common coverage (%)   | 0.0        | Analyte unique coverage (%) | 0.0        |  |
| 1:1 to 50                   | QIVLSQSPAI | LSASPGEKVT            | MTRASSSVS  | YIHWFQQKPG                  | SSPKPWIYAT |  |
| 1:51 to 100                 | SNLASGVPVR | FSGSGSGTSY            | SLTISRVEAE | DAATYCYQQW                  | TSNPPTFGGG |  |
| 1:101 to 150                | TKLEIKRTVA | APSVFIFPPS            | DEQLKSGTAS | VVCLLNFPYP                  | REAKVQWKVD |  |
| 1:151 to 200                | NALQSGNSQE | SVTEQDSKDS            | TYSLSSLTL  | SKADYEKHKV                  | YACEVTHQGL |  |
| 1:201 to 213                | SSPVTKSFNR | GEC                   |            |                             |            |  |

FIGURE 2: Sequence coverage of the heavy and light chain of Kikuzubam.

| HC                          |            |                       |            |                             |            |  |
|-----------------------------|------------|-----------------------|------------|-----------------------------|------------|--|
| Control coverage (%)        | 98.7       | Combined coverage (%) | 98.7       | Analyte coverage (%)        | 0.0        |  |
| Control unique coverage (%) | 98.7       | Common coverage (%)   | 0.0        | Analyte unique coverage (%) | 0.0        |  |
| 1:1 to 50                   | QVQLQPGAE  | LVKPGASVKM            | SCKASGYTFT | SYNMHWVKQT                  | PGRGLEWIGA |  |
| 1:51 to 100                 | IYPGNGDTSY | NQKFKGKATL            | TADKSSSTAY | MQLSSTLSED                  | SAVYYCARST |  |
| 1:101 to 150                | YYGGDWYFNV | WGAGTTVTVS            | AASTKGPSVF | PLAPSSKSTS                  | GGTAALGCLV |  |
| 1:151 to 200                | KDYFPEPVTV | SWNSGALTSG            | VHTFPAVLQS | SGLYSLSSVV                  | TVPSSSLGTQ |  |
| 1:201 to 250                | TYICNVNHKP | SNTKVDKKA             | PKSCDKTHTC | PPCPAPELLG                  | GPSVFLFPPK |  |
| 1:251 to 300                | PKDTLMISRT | PEVTCVVVDV            | SHEDPEVKFN | WYVDGVEVHN                  | AKTKPREEQY |  |
| 1:301 to 350                | NSTYRVVSVL | TVLHQDWLNG            | KEYCKVSNK  | ALPAPIEKTI                  | SKAKGQPREP |  |
| 1:351 to 400                | QVYTLPPSRD | ELTKNQVSLT            | CLVKGFYPSD | IAVEWESNGQ                  | PENNYKTPPP |  |
| 1:401 to 450                | VLDSGGSFFL | YSKLTVDKSR            | WQQGNVFSCS | VMHEALHNHY                  | TQKSLSLSPG |  |
| 1:451 to 451                | K          |                       |            |                             |            |  |
| LC                          |            |                       |            |                             |            |  |
| Control coverage (%)        | 97.2       | Combined coverage (%) | 97.2       | Analyte coverage (%)        | 0.0        |  |
| Control unique coverage (%) | 97.2       | Common coverage (%)   | 0.0        | Analyte unique coverage (%) | 0.0        |  |
| 1:1 to 50                   | QIVLSQSPAI | LSASPGEKVT            | MTRASSSVS  | YIHWFQQKPG                  | SSPKPWIYAT |  |
| 1:51 to 100                 | SNLASGVPVR | FSGSGSGTSY            | SLTISRVEAE | DAATYCYQQW                  | TSNPPTFGGG |  |
| 1:101 to 150                | TKLEIKRTVA | APSVFIFPPS            | DEQLKSGTAS | VVCLLNFPYP                  | REAKVQWKVD |  |
| 1:151 to 200                | NALQSGNSQE | SVTEQDSKDS            | TYSLSSLTL  | SKADYEKHKV                  | YACEVTHQGL |  |
| 1:201 to 213                | SSPVTKSFNR | GEC                   |            |                             |            |  |

FIGURE 3: Sequence coverage of the heavy and light chain of the reference product.

TABLE 2: Glycosylation microheterogeneity obtained by HILI-UPLC. Variation is presented as confidence interval at 95% ( $n = 3$ ).

| Product   | Batch      | Nonfucosylated (%) | Hybrid (%)  | Sialylated (%) | Galactosylated (%) | High mannose (%) |
|-----------|------------|--------------------|-------------|----------------|--------------------|------------------|
| MabThera  | H0605      | 1.81 ± 0.04        | 5.00 ± 0.32 | 0.72 ± 0.08    | 43.34 ± 1.42       | 4.37 ± 0.42      |
|           | N3518      | 1.69 ± 0.11        | 3.48 ± 0.24 | 0.98 ± 0.22    | 46.21 ± 1.54       | 3.19 ± 0.54      |
|           | B62222     | 1.89 ± 0.11        | 2.91 ± 0.18 | 0.82 ± 0.12    | 45.58 ± 0.47       | 3.03 ± 0.17      |
| Kikuzubam | 5445130608 | 0.65 ± 0.21        | 2.72 ± 0.39 | 0.80 ± 0.21    | 57.08 ± 8.52       | 3.25 ± 0.43      |
|           | 5445131216 | 0.65 ± 0.21        | 2.80 ± 0.08 | 0.71 ± 0.13    | 56.35 ± 0.64       | 3.31 ± 0.16      |
|           | 5445131015 | 0.67 ± 0.05        | 3.19 ± 0.25 | 0.77 ± 0.13    | 54.26 ± 3.02       | 3.51 ± 0.23      |

TABLE 3: Isoelectric point by cIEF. Variation is presented as confidence interval at 95% ( $n = 3$ ).

| Product   | Batch      | Main isoform (pI units) | Most acidic variant (pI units) | Most basic variant (pI units) | Global pI (pI units) |
|-----------|------------|-------------------------|--------------------------------|-------------------------------|----------------------|
| MabThera  | M0605      | 9.31 ± 0.00             | 8.68 ± 0.00                    | 9.49 ± 0.00                   | 9.07 ± 0.06          |
|           | N3518      | 9.31 ± 0.00             | 8.68 ± 0.00                    | 9.49 ± 0.00                   | 9.09 ± 0.06          |
|           | B62222     | 9.31 ± 0.00             | 8.68 ± 0.00                    | 9.49 ± 0.00                   | 9.09 ± 0.06          |
| Kikuzubam | 5445130608 | 9.30 ± 0.00             | 8.64 ± 0.00                    | 9.42 ± 0.00                   | 9.03 ± 0.07          |
|           | 5445131015 | 9.30 ± 0.01             | 8.64 ± 0.01                    | 9.42 ± 0.00                   | 9.02 ± 0.08          |
|           | 5445131216 | 9.29 ± 0.01             | 8.63 ± 0.01                    | 9.42 ± 0.00                   | 9.01 ± 0.08          |

consistent with the presence of the same glycoforms observed by the MS analyses of the whole molecule [18]. Although minor differences were found in the nonfucosylated and hybrid glycan content between products, no impact was observed on the potency or the efficacy of the ADCC assay afterwards (Figure5) [14, 27, 28].

Regarding charge heterogeneity, changes higher than 1.0 units in the isoelectric point (pI) of a mAb could affect its therapeutic activity [13, 29], with the common pI variation observed during manufacturing being from 0.1 to 0.2 pI units the common pI variation observed during manufacturing [30]. On Table3, we show the pI range, main isoform, and overall calculated pI values of Kikuzubam and the reference product. The observed differences were lower than 0.1 pI units confirming comparability of charge heterogeneity among the products.

Another relevant CQA related to the immunomodulatory activity of rituximab is the aggregation level, which involves the irreversible interaction of two or more denatured protein molecules revealing new epitopes that could stimulate the immune system. A positive correlation between protein aggregation and immunogenicity has been reported for therapeutic proteins, as well as affectations on the biological activity, either directly or indirectly through the formation of neutralizing or binding antibodies. Thus, the evaluation of aggregates is an important component of the analytical comparability assessment of therapeutic proteins. The aggregates content of Kikuzubam was comparable to the reference product (Table4), which in both cases complied with the pharmacopeial established limit [25].

**3.2. Biological Characterization.** In addition to the physicochemical analyses, an extensive biological characterization to assess comparability of the functions (mechanisms of action) described for the reference product and Kikuzubam was performed through *in vitro* assays. These studies were designed taking into account the interactions of the Fab and Fc domains and their associated biological activities described in the literature (affinity to CD20, FcγRIIa, and FcγRIIIa).

The main mechanism of action of rituximab is binding to CD20 [4, 6] whose interaction affinity is related to the structure of complementary domain regions (CDRs) of the Fab fragment, and this reveals the presence of the appropriate chemical and structural properties of this fragment. Our results showed that Kikuzubam and the reference product have comparable affinities to CD20 (Figure4).

TABLE 4: Aggregates content obtained by SE-UPLC. Variation is presented as confidence interval at 95% ( $n = 3$ ).

| Product   | Batch      | Aggregates (%) |
|-----------|------------|----------------|
| MabThera  | B62222     | 0.11 ± 0.01    |
|           | H0605      | 0.07 ± 0.01    |
|           | N3518      | 0.09 ± 0.02    |
| Kikuzubam | 5445131015 | 0.13 ± 0.03    |
|           | 5445130608 | 0.10 ± 0.05    |
|           | 5445131216 | 0.25 ± 0.03    |

Rituximab also can induce the death of CD20+ B-cells by activating effector cells such as natural killer cells (NK), monocytes, and macrophages through the binding of the FcγR receptors to its Fc domain [31]. Clinical studies have shown that the affinity to FcγRIIa and FcγRIIIa receptors is associated with a better response to rituximab in patients with follicular lymphoma [32]. ITC results of affinity to FcγRIIa and FcγRIIIa of Kikuzubam and the reference product were within the same order of magnitude (Figure4); thus, the modulatory functions that lead to B-cell depletion in both products are assumed to follow the same molecular basis.

The described Fc and Fab affinities further modulate CDC and ADCC mechanisms of rituximab [5, 6] and both were evaluated comparatively for Kikuzubam against the reference product (Figure5). These analyses also confirmed that the physicochemical characteristics of the Fc domain of Kikuzubam are capable of achieving the same biological functions with comparable potency as the reference product.

**3.3. Pharmacodynamics.** An abbreviated study conducted on CD20+ non-Hodgkin's lymphoma patients was designed to confirm that the physicochemical and functional characteristics of Kikuzubam are adequate to exhibit the same PD profile as the reference product.

CD20 was used as the main endpoint. During the treatment, CD20 B-cells were depleted to serum levels lower than 20 cell/mL in the three arms of the study (Figure6). This is explained by the effect of both rituximab products since the levels of other blood components were recovered within 7 days after the completion of concomitant CHOP chemotherapy regimen and the application of granulocyte colony stimulating factor (Filgrastim, G-CSF). CD20 was the only component with no recovery in serum, despite the stimulation after the completion of chemotherapy. Once the six cycles of rituximab-CHOP were completed, a recovery

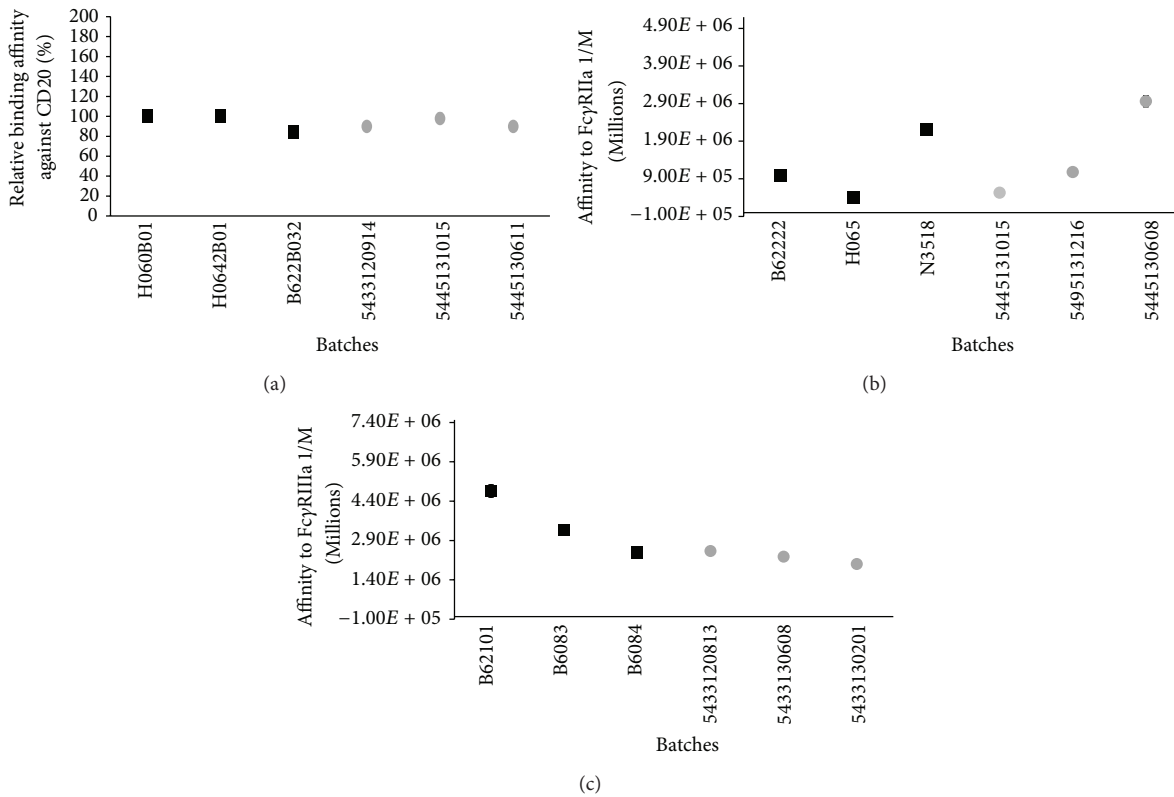


FIGURE 4: (a) Relative binding affinity against CD20 and (b) affinity constants towards FcγRIIa and (c) FcγRIIIa. Square marks represent the batches evaluated of reference product and circle marks represent the evaluated batches of Kikuzubam.

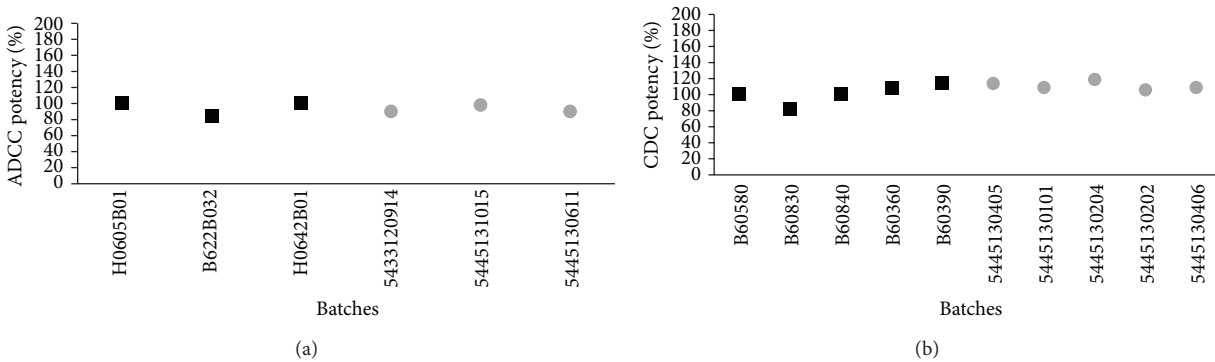


FIGURE 5: (a) ADCC and (b) CDC *in vitro* potency assays. Square marks represent the batches evaluated of reference product and circle marks represent the evaluated batches of Kikuzubam.

in the serum levels of CD20+ B-cells for the three groups of the study was observed. Nonmalignant recovery was demonstrated by PET images as the absence of neoplasms (data not shown).

In order to determine the comparability of the primary endpoint, statistical analyses for the three arms before crossing were performed. Shapiro-Wilk test revealed departures from normality of the data ( $P < 0.05$ ). However, homoscedasticity was demonstrated through a Levene test ( $P > 0.05$ ).

Mean comparison among the groups was performed by Student's *t*-test and Wilcoxon tests, revealing no significant differences in CD20+ depletion between Kikuzubam and the reference product ( $P > 0.05$ ) (Table 5). Combined groups were also analysed using data from arms 1 and 3 to compare all patients treated with Kikuzubam against the reference product, one outlier was excluded. The results obtained from this exercise also revealed no meaningful differences among treatments (Figure 6).

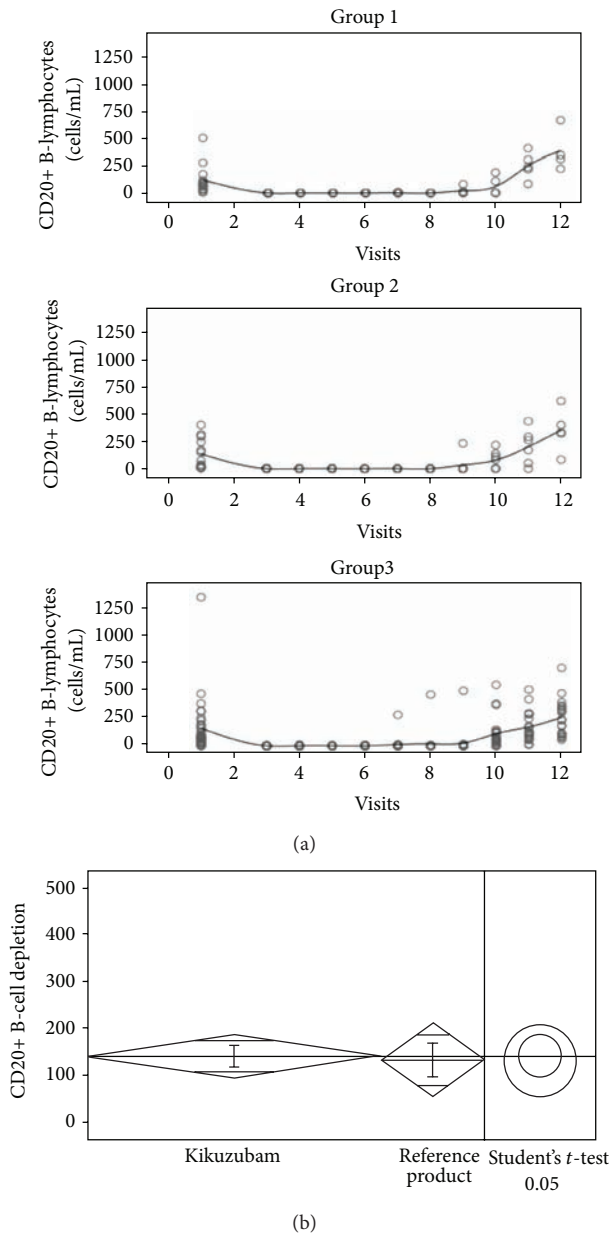


FIGURE 6: (a) Serum concentrations of CD20+ B-Lymphocytes measured along the PD study from patients of all groups. (b) Comparison of mean serum concentrations of CD20+ B-lymphocytes from all patients treated with Kikuzubam against the reference product.

**3.4. Immunogenicity.** The production of antichimeric human antibodies (HACAs) as a result of the loss of tolerance to rituximab by the immune system was evaluated on the three study arms.

On arm1, two patients showed positive results for the screening test of HACAs right after the shift from Kikuzubam to the reference product on visit 5 (Table 6). Thus, the immunogenic response had to be triggered before the medication shifting, since the first humoral immunogenic response is the production of IgM antibodies, which

TABLE 5: Comparability of the primary endpoint between treatments.

| Patients<br><i>n</i> | Arms              | Student's<br><i>t</i> -test<br><i>P</i> | Wilcoxon<br><i>P</i> |
|----------------------|-------------------|---|----------------------|
| 10 versus 13         | 1 versus 2        | 0.5114                                  | 0.5558               |
| 38 versus 13         | 1 and 3 versus 2  | 0.5742                                  | 0.6421               |
| 37 versus 13         | 1 and 3* versus 2 | 0.8603                                  | 0.7401               |

\*Exclusion of one outlier.

TABLE 6: HACAs determination in the immunogenicity study.

| Arm | Number of patients | Positive HACAs<br>patients | Positive HACAs<br>patients (%) |
|-----|--------------------|----------------------------|--------------------------------|
| 1   | 15                 | 2                          | 13                             |
| 2   | 13                 | 2                          | 15                             |
| 3   | 31                 | 3                          | 10                             |

half-life in plasma is approximately four weeks, followed by isotype switching to IgG, if loss of tolerance with the consequent HACAs production is presented. Also, on arm2, the presence of HACAs in two patients was detected before the shift of treatment (Table 6). The immunogenic response produced in 4 out of 28 patients from the first two groups cannot be considered as a consequence of the drug shifting. The immunogenic response was analogous between Kikuzubam and reference product; therefore, no differential immunogenicity was observed.

Likewise, three patients from arm 3 presented positive results for the screening HACAs test (Table 6). These data suggest that the proportion of patients positive to HACAs was comparable between all study arms. The presence of these antibodies did not represent a risk to the patient safety and did not justify abandoning the study. Overall, the biological effect was comparable to HACAs-negative patients between both products.

The hematologic recovery after R-CHOP cycles, even in patients positive to HACAs screening test for both Kikuzubam and the reference product, was accomplished within the expected period reported in studies with chemotherapy; thus, it can be inferred that neither the HACAs developed by Kikuzubam nor the reference product had a negative effect on the hematologic recovery of patients included in the study.

## 4. Conclusions

The comprehensive physicochemical, biological, and *in vitro* characterization studies, including the verification of amino acid sequence, glycosylation and charge heterogeneity, aggregates content, and affinity to CD20, FcγIIa, and FcγIIIa receptors, provided valuable information to demonstrate comparability between Kikuzubam and the reference product. The information provided by these analyses supported the design of a rational clinical evaluation to demonstrate similar immunomodulatory response through the pharmacodynamics and immunogenicity profiles. Physicochemical

along with biological comparability resulted in a similar immunomodulatory activity between the evaluated products.

### Conflict of Interests

The authors are employees of Probiomed S.A. de C.V., which is developing, manufacturing, and marketing biosimilar products. All authors are involved in the development of biosimilar products for Probiomed.

### Acknowledgments

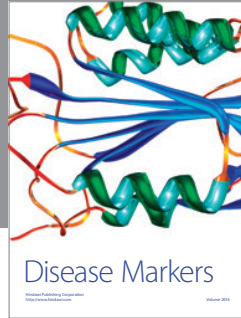
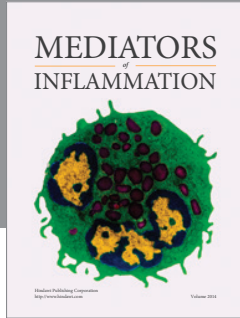
This work was supported by CONACYT, Mexico, Grant PEI-CONACYTC 134016. The authors thank José Luis Olguín-García for his valuable contribution in the statistical analyses for this paper.

### References

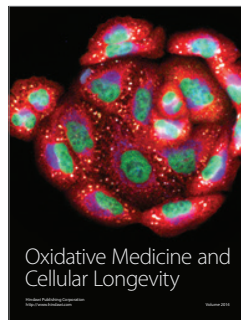
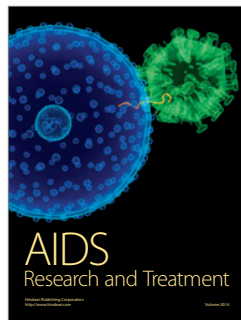
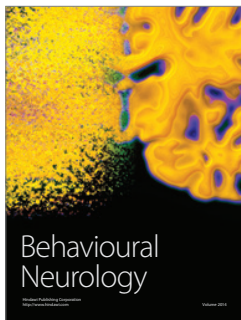
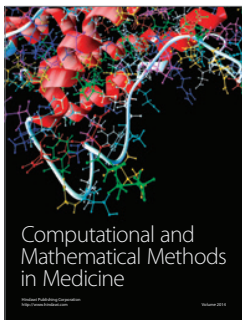
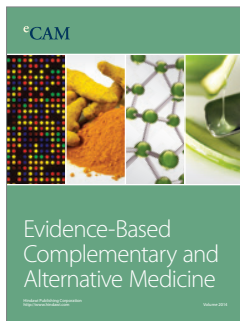
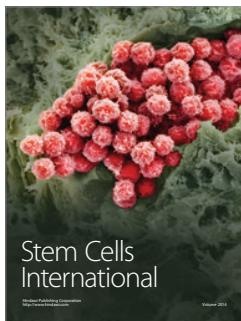
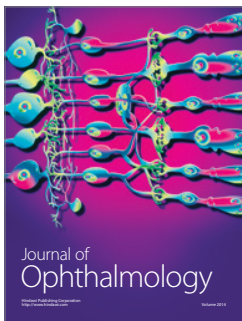
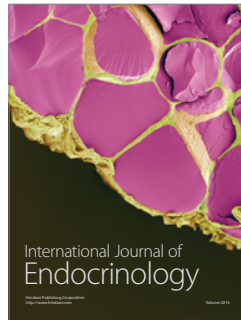
- [1] Combination chemotherapy with or without rituximab in treating patients with Non-Hodkin's Lymphoma, (Identification No. NCT00064116), 2003, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00064116>.
- [2] "Combination chemotherapy with or without monoclonal antibody therapy in treating older patients with Non-Hodkin's Lymphoma," (Identification No. NCT00003150), 1999, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00003150>.
- [3] European Medicines Agency, *MabThera: EPAR—Scientific Discussion*, European Medicines Agency, 2005, [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Scientific\\_Discussion/human/000165/WC500025817.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000165/WC500025817.pdf).
- [4] D. G. Maloney, "Anti-CD20 antibody therapy for B-cell lymphomas," *The New England Journal of Medicine*, vol. 366, no. 21, pp. 2008–2016, 2012.
- [5] E. Oflazoglu and L. P. Audoly, "Evolution of anti-CD20 monoclonal antibody therapeutics in oncology," *mAbs*, vol. 2, no. 1, pp. 14–19, 2010.
- [6] M. E. Reff, K. Carner, K. S. Chambers et al., "Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20," *Blood*, vol. 83, no. 2, pp. 435–445, 1994.
- [7] M. Federici, A. Lubiniecki, P. Manikwar, and D. B. Volkin, "Analytical lessons learned from selected therapeutic protein drug comparability studies," *Biologicals*, vol. 41, no. 3, pp. 131–147, 2013.
- [8] H. Liu, G. Caza-Bulseco, D. Faldu, C. Chumsae, and J. Sun, "Heterogeneity of monoclonal antibodies," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 97, no. 7, pp. 2426–2447, 2008.
- [9] M. Schiestl, T. Stangler, C. Torella, T. Čepeljnik, H. Toll, and R. Grau, "Acceptable changes in quality attributes of glycosylated biopharmaceuticals," *Nature Biotechnology*, vol. 29, no. 4, pp. 310–312, 2011.
- [10] Food and Drug Administration, *Guidance for Industry: Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product*, 2012, <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM291128.pdf>.
- [11] Food and Drug Administration, *Guidance for Industry: Quality Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Protein Product*, Food and Drug Administration, 2012, <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM291134.pdf>.
- [12] Food and Drug Administration, Draft: guidance for industry: clinical pharmacology data to support a demonstration of biosimilarity to a reference product, 2014, <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM397017.pdf>.
- [13] L. A. Khawli, S. Goswami, R. Hutchinson et al., "Charge variants in IgG1. Isolation, characterization, in vitro binding properties and pharmacokinetics in rats," *MAbs*, vol. 2, no. 6, pp. 613–624, 2010.
- [14] H. Li and M. d'Anjou, "Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 20, no. 6, pp. 678–684, 2009.
- [15] G. Shankar, C. Pendley, and K. E. Stein, "A risk-based bioanalytical strategy for the assessment of antibody immune responses against biological drugs," *Nature Biotechnology*, vol. 25, no. 5, pp. 555–561, 2007.
- [16] H. Schellekens, "Factors influencing the immunogenicity of therapeutic proteins," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 20, no. 6, pp. vi3–vi9, 2005.
- [17] 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 in Biotechnology*, vol. 28, no. 10, pp. 509–516, 2010.
- [18] L. F. Flores-Ortiz, V. R. Campos-García, F. C. Perdomo-Abúndez, N. O. Pérez, and E. Medina-Rivero, "Physicochemical properties of Rituximab," *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 37, no. 10, pp. 1438–1452, 2014.
- [19] C. E. Espinosa-de la Garza, F. C. Perdomo-Abúndez, J. Padilla-Calderón et al., "Analysis of recombinant monoclonal antibodies by capillary zone electrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 34, no. 8, pp. 1133–1140, 2013.
- [20] S. Mittermayr, J. Bones, M. Doherty, A. Guttman, and P. M. Rudd, "Multiplexed analytical glycomics: rapid and confident IgG N-glycan structural elucidation," *Journal of Proteome Research*, vol. 10, no. 8, pp. 3820–3829, 2011.
- [21] D. R. Anderson, "Anti-cd20 derived from transfectoma having atcc deposit numbers 69119 and hbe 1388 respectively; depletion of peripheral blood b cells," US Patent no. 6682734, 2004.
- [22] D. R. Anderson, N. Hanna, J. E. Leonard, R. A. Newman, M. E. Reff, and W. H. Rastetter, "Anticarcinogenic agents," US Patent 5736137, 1998.
- [23] J. Du, H. Wang, C. Zhong et al., "Structural basis for recognition of CD20 by therapeutic antibody rituximab," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 20, pp. 15073–15080, 2007.
- [24] A. Beck, H. Diemer, D. Ayoub et al., "Analytical characterization of biosimilar antibodies and Fc-fusion proteins," *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 43, pp. 81–95, 2013.
- [25] The United States Pharmacopeia/Medicines compendium, "Rituximab version 1.0," 2013, <https://mc.usp.org/monographs/rituximab-1-0>.
- [26] S. Sibérl, C.-A. Dutertre, C. Boix et al., "Molecular aspects of human FcγR interactions with IgG: functional and therapeutic consequences," *Immunology Letters*, vol. 106, no. 2, pp. 111–118, 2006.
- [27] J. Davies, L. Jiang, L.-Z. Pan, M. J. Labarre, D. Anderson, and M. Reff, "Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FcγRIII," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 74, no. 4, pp. 288–294, 2001.

- [28] R. L. Shields, J. Lai, R. Keck et al., "Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 30, pp. 26733–26740, 2002 .
- [29] T. Igawa, H. Tsunoda, T. Tachibana et al., "Reduced elimination of IgG antibodies by engineering the variable region," *Protein Engineering, Design & Selection*, vol. 23, no. 5, pp. 385–392, 2010 .
- [30] R. J. Harris, "Heterogeneity of recombinant antibodies: linking structure to function," *Developments in Biologicals*, vol. 122, pp. 117–127, 2005.
- [31] M. R. Smith, "Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance," *Oncogene*, vol. 22, no. 47 , pp. 7359–7368, 2003.
- [32] S. Veeramani, S.-Y. Wang, C. Dahle et al., "Rituximab infusion induces NK activation in lymphoma patients with the high-affinity CD16 polymorphism," *Blood*, vol. 118, no. 12, pp. 3347 – 3349, 2011.





**Hindawi**  
Submit your manuscripts at  
<http://www.hindawi.com>



# Theoretical approximations and experimental extinction coefficients of biopharmaceuticals

Mariana P. Miranda-Hernández<sup>1</sup> · Elba R. Valle-González<sup>1</sup> · David Ferreira-Gómez<sup>1</sup> · Néstor O. Pérez<sup>1</sup> · Luis F. Flores-Ortiz<sup>1</sup> · Emilio Medina-Rivero<sup>1</sup>

Received: 18 September 2015 / Revised: 2 December 2015 / Accepted: 8 December 2015  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

**Abstract** UV spectrophotometric measurement is a widely accepted and standardized routine analysis for quantitation of highly purified proteins; however, the reliability of the results strictly depends on the accuracy of the employed extinction coefficients. In this work, an experimental estimation of the differential refractive index ( $dn/dc$ ), based on dry weight measurements, was performed in order to determine accurate extinction coefficients for four biotherapeutic proteins and one synthetic copolymer after separation in a size-exclusion ultra-performance liquid chromatograph coupled to an ultraviolet, multiangle light scattering and refractive index (SE-UPLC-UV-MALS-RI) multidetection system. The results showed small deviations with respect to theoretical values, calculated from the specific amino acid sequences, for all the studied immunoglobulins. Nevertheless, for proteins like etanercept and glatiramer acetate, several considerations, such as glycan content, partial specific volume, polarizability, and higher order structure, should be considered to properly calculate theoretical extinction coefficient values. Herein, these values were assessed with simple approximations. The precision of the experimentally obtained extinction coefficients, and its convergence towards the theoretical values, makes them useful for characterization and comparability exercises. Also, these values provide insight into the absorbance and scattering properties of the evaluated proteins. Overall, this

methodology is capable of providing accurate extinction coefficients useful for development studies.

**Keywords** Refractive index increment · Extinction coefficient · Protein quantitation · Biopharmaceuticals · Dry weight

## Introduction

Despite its obviousness, the determination of protein quantity remains as a challenging task because of the drawbacks and uncertainties inherent to each of the methodologies used for this purpose [1–5]. Furthermore, the accuracy of the outcome is affected by common issues such as the composition and complexity of the protein under study that frequently lacks adequate reference correction values or protein standards for quantity estimation, interference derived from matrix components that cannot be removed without compromising protein stability, or the low amount of the protein of interest present in a sample. For instance, even for highly purified proteins, such as biopharmaceuticals, whose quantity can be determined by ultraviolet absorption with minimum sample preparation and without a protein standard, the accurate determination of the absorption coefficient ( $\epsilon$ ) is necessary to obtain a reliable quantitation.

For proteins whose  $\epsilon$  is unknown, a common practice is to calculate it either theoretically from their amino acid sequence [6, 7], or experimentally from absorbance values and absorption coefficients of specific residues or averaged constants. However, these estimations do not always consider the spatial disposition of aromatic residues, which is influenced by the matrix, and their impact on the protein absorption properties, thus compromising protein quantitation results [8, 9].

Therefore, an accurate determination of  $\epsilon$  is a crucial task for the estimation of protein quantity during development,

✉ Luis F. Flores-Ortiz  
luis.flores@probiomed.com.mx

✉ Emilio Medina-Rivero  
emilio.medina@probiomed.com.mx

<sup>1</sup> Unidad de Investigación y Desarrollo, Probiomed S.A. de C.V.,  
Cruce de carreteras Acatzingo-Zumpahuacán,  
52400 Tenancingo, Mexico

manufacturing, and usage of purified proteins such as biopharmaceutical products. Also, in some cases protein quantity can be used as an alternative to the measurement of biological activity during the manufacturing processes of those products [10], thus reflecting the close relationship between the physicochemical measurement of protein quantity and the safety and efficacy of a drug product. On the other hand,  $\epsilon$  is also necessary in many analytical techniques used for the characterization of extensive (optical, electrical, and thermal) and biological properties under specific environments.

In this study, the dry weight method, a well-established technique to determine the concentration of protein solutions, was used in combination with an ultraviolet, multiangle light scattering and refractive index (UV-MALS-RI) multidetection system coupled to size-exclusion ultra-performance liquid chromatography (SE-UPLC) to properly characterize the mass absorption coefficient or extinction coefficient of purified proteins. This assessment was performed to determine extinction coefficients of four widely used biopharmaceutical proteins, prescribed for the treatment of chronic and degenerative diseases, namely rituximab, trastuzumab, infliximab, and etanercept, along with one synthetic copolymer, glatiramer acetate. The obtained results provide valuable information that can be used as extinction coefficient values in further characterization and comparability exercises during development studies.

## Materials and methods

### Materials

Sodium chloride (NaCl), sodium phosphate dibasic heptahydrate ( $\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), and sodium phosphate monobasic monohydrate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) were obtained from J.T. Baker (Avantor Performance Materials, Inc., Center Valley, PA) and Tris buffer at pH 8.0 (part no. 477427) was obtained from Beckman Coulter Inc. (Brea, CA). Water was obtained from a Milli-Q Biocel system (EMD Millipore Corp., Billerica, MA). Bovine serum albumin (part no. 23209) was obtained from Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, MA). Gel filtration standard was obtained from Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA). All UPLC running solutions were filtered through a 0.2- $\mu\text{m}$  hydrophilic polypropylene membrane from EMD Millipore Corp. Recombinant proteins used for this study were MabThera<sup>®</sup> (rituximab 100 mg in 10 mL concentrate for solution for infusion) and Herceptin<sup>®</sup> (trastuzumab 440 mg powder for concentrate for solution for infusion) from F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland; rituximab biosimilar drug product (rituximab 100 mg in 10 mL concentrate for solution for infusion), Infitam<sup>®</sup> (etanercept 50 mg powder for solution for subcutaneous use), infliximab biosimilar drug product (infliximab 100 mg powder for concentrate for solution for infusion), and trastuzumab biosimilar

drug product (trastuzumab 440 mg powder for concentrate for solution for infusion) from Probiomed S.A de C.V., Mexico City, Mexico; Enbrel<sup>®</sup> (etanercept 50 mg/mL solution for subcutaneous use) from Amgen Inc., California, USA; and Remicade<sup>®</sup> (infliximab 100 mg powder for concentrate for solution for infusion) from Centocor Inc., Pennsylvania, USA. The synthetic copolymers used for this study were Copaxone<sup>®</sup> (glatiramer acetate 20 mg/mL solution for subcutaneous use) from Teva Pharmaceutical Industries Ltd., Central District, Israel; and Probioglat<sup>®</sup> (glatiramer acetate 20 mg/mL solution for subcutaneous use) from Probiomed S.A. de C.V., Mexico City, Mexico.

### Experimental determination of $dn/dc$

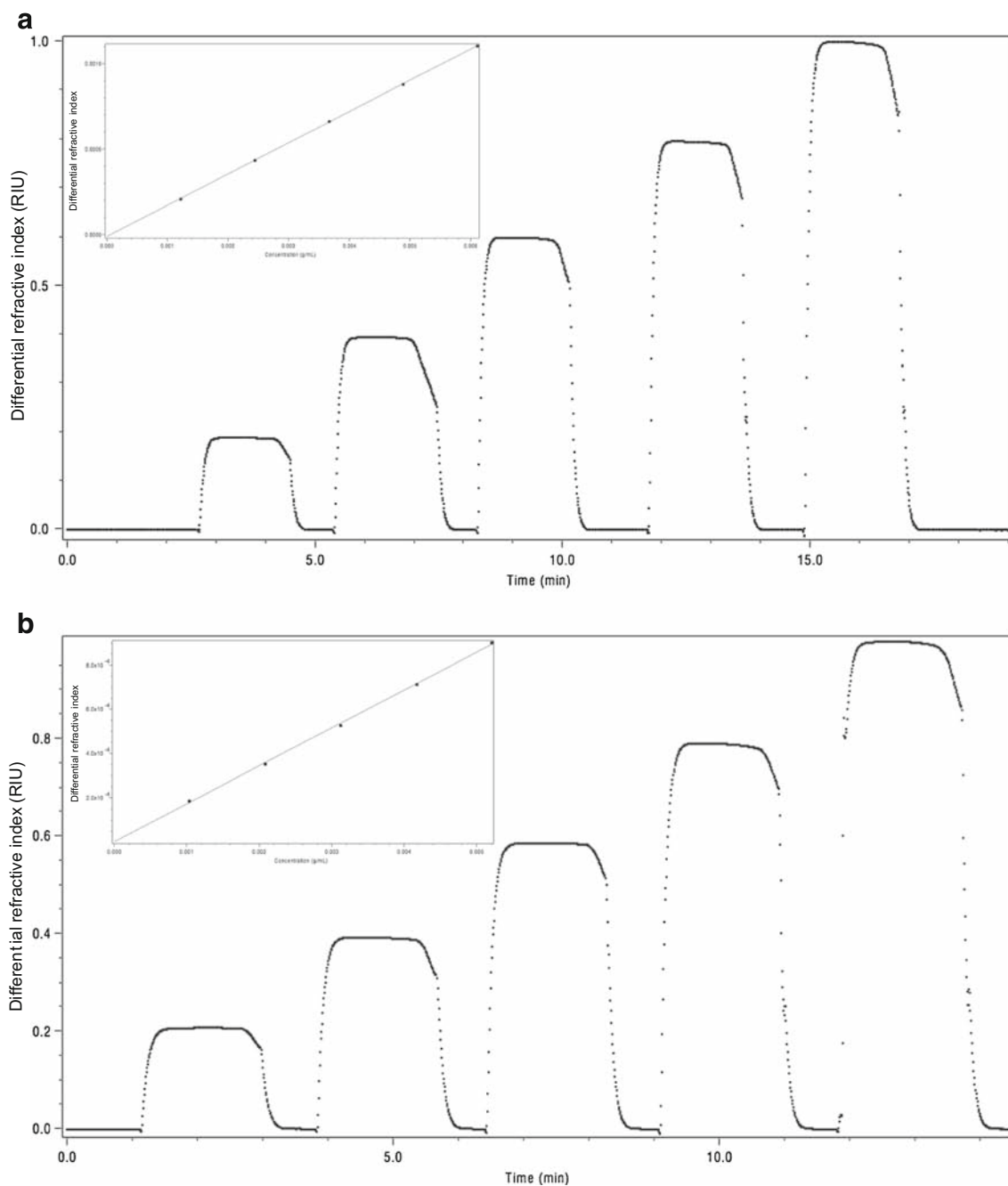
Recombinant proteins were exhaustively dialyzed against a 150 mM sodium chloride, 20 mM sodium phosphate buffer solution at pH 6.8 using 3 kDa Slide-A-Lyzer cassettes from Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, MA). Dialyzed protein and buffer solutions were independently placed (triplicates) into preweighed vials and heated at 50 °C in a CentriVap centrifugal vacuum concentrator from Labconco Corp. (Kansas City, MO), cooled in a desiccator, and weighed. A CP224S balance from Sartorius Intec. (Goettingen, Germany), protected against drafts and vibrations, was used to determine the mass of the reservoir and the combined masses with buffer salts and recombinant proteins. In order to assure the specified sensitivity for the balance of 100  $\mu\text{g}$  with a repeatability of 0.1 mg, measurements were performed in a room at 25 °C and 44 % humidity. Vials were heated and weighed until constant weight ( $\pm 0.1$  mg) was achieved (ca. 200 h). The mass from the recovered recombinant proteins was no less than 30 mg in all cases.

Afterwards, the dialyzed recombinant protein solutions were diluted to obtain a concentration curve ranging from 1 to 6 mg/mL. The refractive index ( $n$ ) of each curve level was measured in an Optilab-rEX RI detector from Wyatt Technologies, Inc. (Santa Barbara, CA.). The refractive index increment ( $dn/dc$ ) was calculated from the slope of the concentration versus the refractive index curve obtained with ASTRA 6.0.2.9 software from Wyatt Technologies Inc.

For glatiramer acetate, a stock solution at 25 mg/mL was prepared from the lyophilized powder of the purified active pharmaceutical ingredient (API) of Probioglat<sup>®</sup>. A concentration curve ranging from 5 to 20 mg/mL was analyzed as described above in the Optilab-rEX RI detector.

### Experimental determination of extinction coefficient

The extinction coefficients for all the evaluated proteins and the synthetic copolymer were experimentally calculated using SE-UPLC coupled to a UV, MALS, and RI multidetector

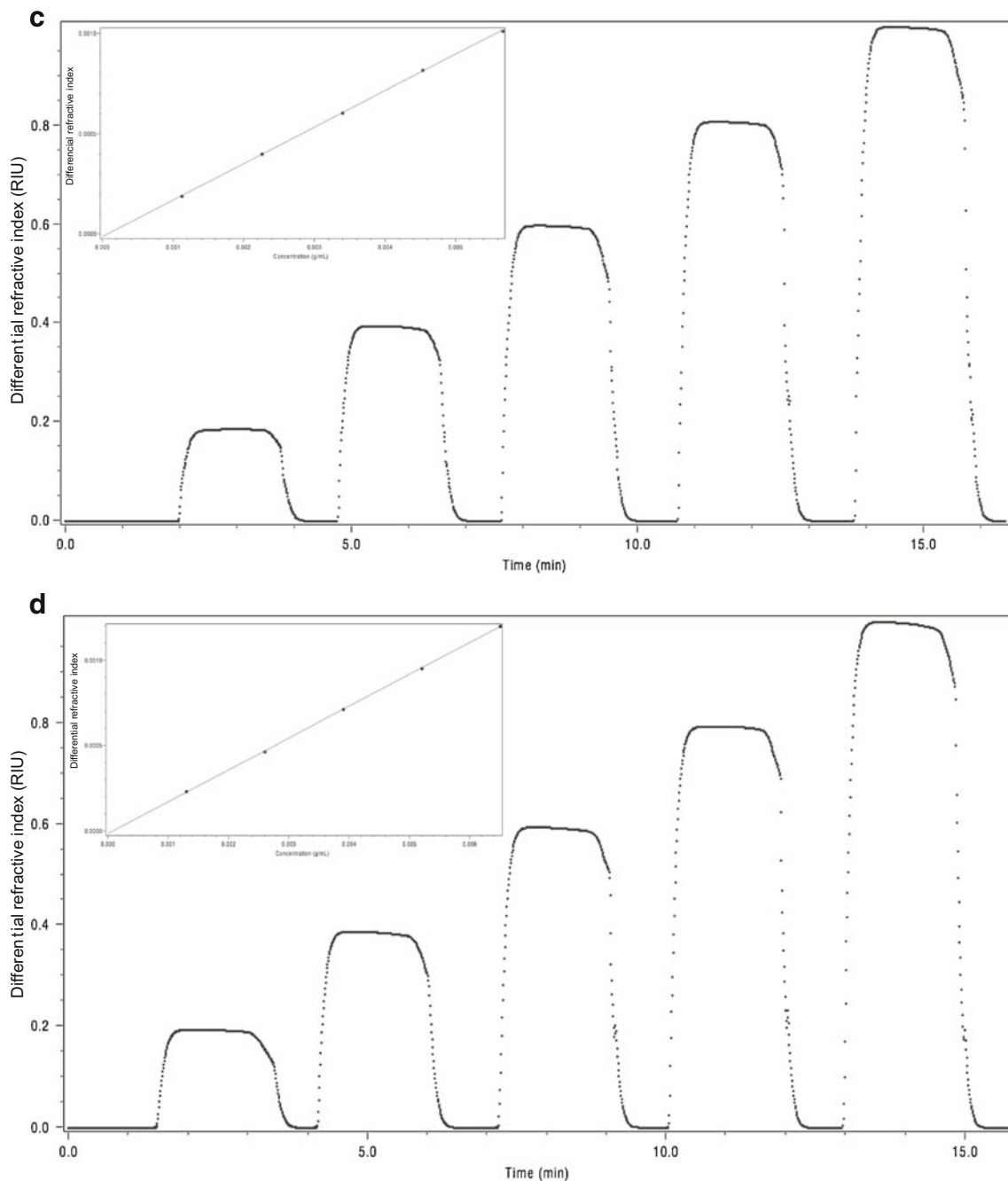


**Fig. 1** Differential refractive index analysis at different protein concentrations. Each plateau represents a solution of known concentration for the analyzed biopharmaceuticals. The *inset* shows the

linear regression analysis. **a** Rituximab ( $R^2=0.9999$ ), **b** etanercept ( $R^2=0.9993$ ), **c** trastuzumab ( $R^2=0.9998$ ), **d** infliximab ( $R^2=0.9999$ ), and **e** glatiramer acetate ( $R^2=0.9997$ )

system, comprised of an Acquity UPLC H-Class Bio instrument equipped with an Acquity UPLC tunable UV detector and Empower chromatography data collection system from Waters Corp. (Milford, MA) coupled to a MALS instrument (DAWN HELEOS-II) and an RI detector (Optilab T-rEX) from Wyatt Technologies Inc. [11]. Recombinant protein solutions were analyzed at 3 mg/mL while the synthetic copolymer solution was analyzed at 20 mg/mL. For experiments

conducted under denaturing conditions samples were diluted with 7 M urea to 3 mg/mL. The sample temperature was set at 10 °C, while the column temperature was set at 35 °C and 30 °C for recombinant proteins synthetic copolymer analyses, respectively. UV detection was performed using a 500-nL analytical flow cell of 10-mm path length calibrated by the manufacturer (Waters Corp.) using a caffeine solution. UV detector was set at a wavelength of 280 nm for the

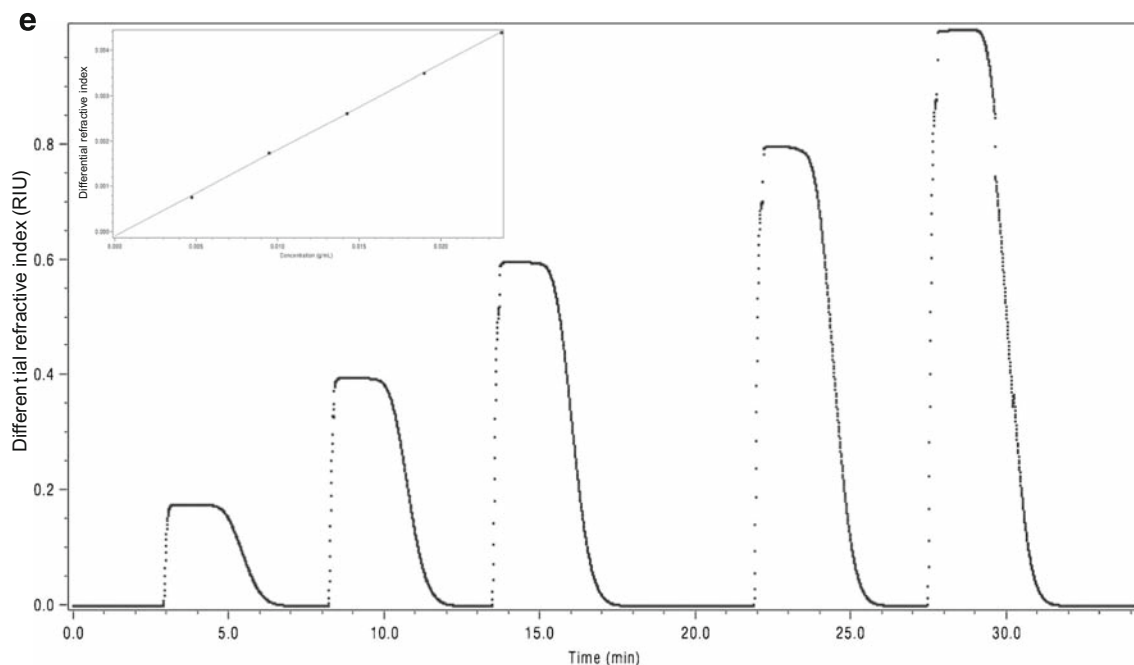


**Fig. 1** (continued)

recombinant proteins and 275 nm for the synthetic copolymer. Separation was carried out, after injection of 10  $\mu$ L of sample, on a 4.6  $\times$  300 mm Acquity Ethylene Bridged Hybrid 200 analytical column from Waters Corp. Isocratic elution was carried out using a mobile phase composed of 150 mM sodium chloride, 20 mM sodium phosphate, pH 6.8, at 0.40 mL/min for the recombinant proteins and 0.35 mL/min for the synthetic copolymer. For experiments conducted under denaturing conditions isocratic elution was carried out using a

mobile phase composed of 2 M urea, 150 mM sodium chloride, 20 mM sodium phosphate, pH 6.8, at 0.35 mL/min.

The wavelength of MALS and RI instruments was set at 658 nm. Before the analyses, both detectors were calibrated using toluene or sodium chloride, respectively, following the manufacturer's procedures (Wyatt Technologies Inc.). Bovine serum albumin was employed for the normalization of MALS detectors, and the interdetector alignment and band-broadening corrections of UV, MALS, and RI signals. The



**Fig. 1** (continued)

RI detector was used to determine the concentration of each protein monomer, assessing any potential loss after being eluted from the SEC column. For this purpose, the voltage response of the RI detector is converted, through its calibration constant, to refractive index units, thus maintaining a proportional relationship with concentration, when divided by the protein's  $dn/dc$  value [12]. Extinction coefficients were obtained from the UV extinction from the RI peak method of ASTRA 6.0.2.9 software (Wyatt Technologies Inc.).

### Mass spectrometry analyses

The exact masses of the immunoglobulins were determined as previously described [13]. Briefly, samples were analyzed on a SYNAPT G2 HDMS coupled to an Acquity UPLC (Waters Corp., Milford, MA) using an electrospray ionization source (ESI). Samples were diluted to 1.0 mg/mL with 50 mM Tris buffer solution at pH 8.0 and injected into a  $C_{18}$  BEH 300,  $2.1 \times 150$  mm UPLC column using a linear gradient (1 % to 99 % acetonitrile, with 0.1 % formic acid). The acquisition range was set from 500 to 4000  $m/z$ . Data processing was performed with BiopharmaLynx software v1.3.1 from Waters Corp.

### Theoretical determination of absorption coefficient

Theoretical absorption coefficients were calculated according to Pace et al. [7] and Edelhoch [14] using the ProtParam

protein identification and analysis tool on the Swiss Institute of Bioinformatics resource portal ExpASY [15], with the confirmed amino acid sequence for each recombinant protein.

### Results and discussion

The dry weight has been a well-established methodology for protein quantification since the 1970s [16, 17]. However, it has not been widely used because it requires large amounts of purified protein and is time-consuming; hence, it can be hardly implemented as a routine test. Nonetheless, the dry weight approach remains an accurate method to determine the quantity of highly purified proteins contained in a known matrix. Besides, thermogravimetric techniques allow one to obtain highly precise and accurate dry weight measurements.

In this study, we employed the dry weight method to calculate extinction coefficients that will permit the proper quantitation of biopharmaceutical proteins using UV spectrophotometric measurement, a widely accepted and standardized routine analysis. The extinction coefficients for each of the evaluated biopharmaceutical proteins were obtained exclusively for the monomers after separation and detection in an SE-UPLC-UV-MALS-RI system [11]. The RI detector, located at the end of the system, assessed any potential protein loss during SEC separation of each biopharmaceutical product, avoiding the necessity to inaccurately assume that 100 % of the injected protein mass reaches the detectors. For this purpose,  $dn/dc$  values were also calculated, using the prepared solutions of known concentration (Fig. 1).

**Table 1** Theoretical and experimental  $dn/dc$  values of the evaluated biopharmaceuticals

| Product            | Theoretical $dn/dc$ (mL/mg)   | Experimental $dn/dc$ (mL/mg)     |
|--------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| Rituximab          | 0.1898                        | 0.1910 ± 0.0074                  |
| Trastuzumab        | 0.1899                        | 0.1820 ± 0.0004                  |
| Infliximab         | 0.1900                        | 0.1850 ± 0.0014                  |
| Etanercept         | 0.1900<br>0.1710 <sup>a</sup> | 0.1716 ± 0.0004                  |
| Glatiramer acetate | 0.1849–0.1867                 | 0.1798–0.1987<br>(median 0.1906) |

Variation is presented as 95 % confidence interval (rituximab  $n=6$ , trastuzumab  $n=3$ , infliximab  $n=6$ , etanercept  $n=6$ , and glatiramer acetate  $n=10$ )

<sup>a</sup> According to Ye [22] assuming 30 % of glycan content

Table 1 summarizes the experimentally determined  $dn/dc$  values for the evaluated proteins and their comparison against the theoretical prediction according to McMeekin et al. [18] and Zhao et al. [19] using the SEDFIT software v 14.4d [20] to verify the reliability of the dry weight determination. The differences between the predicted and the experimental values observed for recombinant immunoglobulins (rituximab, trastuzumab, and infliximab) were lower than 4.5 %. These values (0.187 mL/g on average) also correspond to the theoretical consensus of 0.186 mL/g (at 633 nm) for proteins [21].

However, a larger deviation from their predicted  $dn/dc$  was observed for etanercept and glatiramer acetate. For etanercept the deviation between the experimental and the predicted value was 10.7 %, which can be explained by the high content (up to 30 % of the total mass) of *N*- and *O*-glycans that influence its refractive properties. Considering this glycan content, and following the approach proposed by Ye [22] and Fedosov et al. [23], we calculated corrected theoretical  $dn/dc$  values of 0.171 and 0.176 mL/g by the weighted sum of the  $dn/dc$  values for the mass fraction of the oligosaccharides and the protein. This approach provided a better correspondence with the experimental result, reducing the observed difference to less than 1 %.

On the other hand, the synthetic peptide glatiramer acetate composed of L-lysine, L-alanine, L-tyrosine, and L-glutamic acid, whose content varies within known ranges, revealed

experimental  $dn/dc$  values ranging from 0.1798 to 0.1987 mL/g, representing a dispersion of 10.5 %. This dispersion is the result of the wide distribution of peptide sequences and sizes that are inherent to this molecule. Accordingly, theoretical values were calculated considering both their expected amino acid molar fractions and molecular mass ranges. However, the lowest predicted value was 0.1849 mL/g while the highest was 0.1867 mL/g, giving a dispersion of 1 %. Table 2 summarizes the predicted  $dn/dc$  values for the lower and upper limits and the mean values for each range.

The theoretical  $dn/dc$  of glatiramer acetate decreases as the molar fractions of each amino acid increase to their defined limits and vice versa. This expected trend comes from the higher relative increase of L-glutamic acid and L-lysine (characterized by lower individual  $dn/dc$  values of 0.1825 and 0.1811 mL/g) with respect to tyrosine (characterized by a higher  $dn/dc$  value of 0.2388 mL/g). Additionally, a second trend revealed the proportional relationship of  $dn/dc$  with respect to the peptide size, as a consequence of the partial specific volume of the whole molecule.

It is noteworthy that the equations used to obtain the theoretical values [19] do not consider the specific residue polarizabilities within glatiramer acetate or its aggregation and solvation state. Glatiramer acetate is known for its high propensity to form aggregate moieties up to 600 nm, in addition to a molar mass distribution of its monomers ranging from 3 to 45 kDa (molar-mass-dispersity,  $D_M$ , of 1.304) [11]; these features provide specific characteristics that influence its refractive properties. Similar findings have been reported for crystalline isoforms, whose particular higher-order arrangements explain their  $dn/dc$  variability, as they modify protein packing [24], specific polarizabilities, and the structured hydration layer around the protein's surface. Similar phenomena have been described in lysozymes as a result of pressure effects [25].

These findings give some explanation to the higher variability of the experimental  $dn/dc$  values in glatiramer acetate with respect to the theoretical values. Further determinations of the extinction coefficient of this peptide were performed using the experimental value of 0.1906 mL/g, as the median of the observed range.

Table 3 shows the experimental extinction coefficients of glatiramer acetate and the monomeric species of rituximab,

**Table 2** Theoretical  $dn/dc$  values calculated for different peptide sizes and molar fractions of glatiramer acetate

| Peptide size | $dn/dc$ of distinct molar fractions  |                                      |                                      |
|--------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
|              | (E 0.129, A 0.392, Y 0.086, K 0.300) | (E 0.141, A 0.427, Y 0.093, K 0.337) | (E 0.153, A 0.462, Y 0.100, K 0.374) |
| 50 aa        | 0.1861                               | 0.1856                               | 0.1849                               |
| 100 aa       | 0.1853                               | 0.1859                               | 0.1856                               |
| 500 aa       | 0.1867                               | 0.1862                               | 0.1854                               |

aa amino acid, E glutamic acid, A alanine, Y tyrosine, K lysine

**Table 3** Theoretical and experimental extinction coefficient values of the evaluated biopharmaceuticals

| Biopharmaceutical product | Experimental abundance-weighted exact molar mass (Da) | Theoretical molar absorption coefficient ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) | Theoretical extinction coefficient ( $\text{mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) | Experimental extinction coefficient ( $\text{mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) |
|---------------------------|---|---|--|---|
| Rituximab                 | 147,322   | 248,380   | 1.686  | $1.694 \pm 0.002$   |
| Trastuzumab               | 148,218   | 215,380   | 1.453  | $1.446 \pm 0.002$   |
| Infliximab                | 148,804   | 217,440   | 1.461  | $1.450 \pm 0.006$   |
| Etanercept                | $134,136^a$   | 122,345   | 0.912  | $0.930 \pm 0.007$   |
| Glatiramer acetate        | $9935^a$<br>$12,911^b$                                | $13,410^c$  | 1.350<br>1.039   | $1.026 \pm 0.010$   |

Variation is presented as 95 % confidence interval (rituximab  $n = 18$ , trastuzumab  $n = 18$ , infliximab  $n = 27$ , etanercept  $n = 18$ , and glatiramer acetate  $n = 18$ )

<sup>a</sup> Mass-average molar mass

<sup>b</sup> Z-average molar mass

<sup>c</sup> Assuming a mean molar fraction of tyrosine of 0.093

trastuzumab, infliximab, and etanercept using their respective experimental  $dn/dc$  values. It must be acknowledged that for glatiramer acetate the extinction coefficient was obtained for the whole size distribution of its peptides, as it is composed of different monomeric species. The obtained results were compared against the theoretical molar absorption coefficients that were converted into extinction coefficients using the abundance-weighted exact molar masses. These masses were obtained from mass spectrometry (MS) analyses for immunoglobulins, or, as a result of their complex heterogeneity, as mass-average molar masses ( $M_w$ ) from SE-UPLC-UV-MALS-RI analyses for etanercept and glatiramer acetate.

Differences between the theoretical and experimental extinction coefficients of less than 2 % were observed for each immunoglobulin and etanercept, highlighting the necessity of accurate molar mass determinations to obtain adequate theoretical approximations. Moreover, differences lower than 2.5 % were also observed between the different evaluated brands of each molecule, as can be observed by the small confidence intervals determined for each biopharmaceutical protein. This was confirmed by the absence of statistically significant differences by  $t$  test ( $p > 0.05$  in all cases at  $\alpha = 0.05$ ) among products (data not shown), which suggests the usefulness of this determination for comparability and characterization purposes. In this regard, experiments conducted under denaturing conditions revealed the sensitivity of this methodology towards the spatial disposition of the aromatic residues within the molecules, presenting an increment of up to 12 % when compared with native extinction coefficients. The determined extinction coefficients under denaturing conditions were 1.889, 1.521, 1.606, and 1.037 for rituximab, trastuzumab, infliximab, and etanercept, respectively.

On the other hand, for glatiramer acetate different theoretical values were predicted depending on the used average content of L-tyrosine, within the expected molar fractions for

this amino acid [7]. Note that an  $M_w$  value of 9935 Da was used, despite its inability to represent the molar mass dispersity of glatiramer acetate. As a result a larger deviation (up to 31.6 %) between the theoretical and the experimental value was observed.

It must be considered that this theoretical approximation cannot take into account several phenomena, including the dynamic aggregation of glatiramer acetate and the subsequent change in the spatial configuration of tyrosine residues or the attenuation of light due to scattering.

For this purpose, the  $z$ -average molar mass of 12,911 Da was used instead because of its sensitivity towards larger peptides, resulting in a theoretical extinction coefficient of  $1.039 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  and a reduced difference from the experimental value of 1.3 %. Also, this theoretical approximation lies within the expected range of extinction coefficients from 0.968 to  $1.070 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , calculated using the lower and upper limits of the experimental  $dn/dc$  values of  $0.1798$  and  $0.1987 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , respectively.

The use of a higher-degree average for glatiramer acetate distribution constitutes a better fit for the square dependence of the scattered intensity regarding the particle (molecule) volume, which is expected to be higher due to its aggregates or larger monomeric peptides, thus explaining the measured extinction values.

Finally, the higher-order structure dependence on the extinction coefficient of glatiramer acetate makes this a valuable determination in characterization studies, able to assess the size, mass, and sequence heterogeneity of the resulting product, hence useful for comparability purposes. For instance the two tested products containing glatiramer acetate revealed mean extinction coefficient values of 1.036 and  $1.018 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  for Copaxone® and Probioglat®, respectively. These values showed differences lower than 2 % as a result of the similar molar mass distributions and amino acid compositions in both products.



## Conclusions

In this work extinction coefficients for relevant biopharmaceutical products were determined, using well-established techniques such as the dry weight and UV-RI detection. This method allowed a simplified determination of these values, in contrast with other techniques that require an accurate molar mass measurement, which is especially difficult for highly modified proteins and polypeptide samples.

The accuracy of the obtained results was demonstrated by their comparison with the theoretical predicted values, resulting in differences up to 2 %. It was shown that unique features within the evaluated biopharmaceuticals are responsible for their optical properties, whose proper characterization will contribute to a better understanding of these molecules and their mechanisms of action.

The obtained extinction coefficients can be further used for other characterization and comparability exercises during development studies.

**Acknowledgments** This work was supported by the National Council of Science and Technology CONACYT, Mexico grant FINNOVA 174102; without participation in the design of the study.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors are employees of Probiomed S.A. de C.V., which is developing, manufacturing, and marketing biosimilar products. All authors are involved in the development of biosimilar products for Probiomed.

The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265–75.
- Layne E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods Enzymol.* 1957;3:447–55.
- Scopes RK. Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. *Anal Biochem.* 1974;59:277–82.
- Gorball AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem.* 1949;177:751–66.
- Gill SC, von Hippel PH. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem.* 1989;182:319–26.
- Pace CN, Vajdos F, Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 1995;4:2411–23.
- Noble JE, Knight AE, Reason AJ, Di Matola A, Bailey MJ. A comparison of protein quantitation assays for biopharmaceutical applications. *Mol Biotechnol.* 2007;37:99–111.
- Stoscheck CM. Quantitation of protein. *Methods Enzymol.* 1990;182:50–68.
- ICH (1999) International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Q6B: Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products.
- Espinosa-de la-Garza CE, Miranda-Hernández MP, Acosta-Flores L, Pérez NO, Flores-Ortiz LF, Medina-Rivero E. Analysis of therapeutic proteins and peptides using multiangle light scattering coupled to ultra high performance liquid chromatography. *J Sep Sci.* 2015;38:1537–43.
- Podzimek S. Light scattering, size exclusion chromatography and asymmetric flow field fractionation. New Jersey: Wiley; 2011.
- Flores-Ortiz LF, Campos-García VR, Perdomo-Abúndez FC, Pérez NO, Medina-Rivero E. Physicochemical properties of rituximab. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2014;37:1438–52.
- Edelhoc H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry.* 1967;6:1948–54.
- Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baatin D, Csardi G, de Castro E, et al. ExpASY: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(W1):W597–603.
- Nozaki Y. Determination of the concentration of protein by dry-weight, a comparison with spectroscopic methods. *Arch Biochem Biophys.* 1986;249:437–46.
- Kupke DW, Dorrier TE. Protein concentration measurements: the dry weight. *Methods Enzymol.* 1978;48:155–62.
- McMeekin TL, Wilensky M, Groves ML. Refractive indices of proteins in relation to amino acid composition and specific volume. *Biochem Biophys.* 1962;7:151–6.
- Zhao H, Brown PH, Schuck P. On the distribution of protein refractive index increments. *Biophys J.* 2011;100:2309–17.
- Schuck P. Size distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling. *Biophys J.* 2000;78:1606–19.
- Wen J, Arakawa T. Refractive index of proteins in aqueous sodium chloride. *Anal Biochem.* 2000;280:327–9.
- Ye H. Simultaneous determination of protein aggregation, degradation, and absolute molecular weight by size exclusion chromatography-multiangle light scattering. *Anal Biochem.* 2006;356:76–85.
- Fedosov SN, Fedosova NU, Berglund L, Moestrup SK, Nexø E, Petersen TE. Assembly of the intrinsic factor domains and oligomerization of the protein in the presence of cobalamin. *Biochemistry.* 2004;43:15095–102.
- Mahendiran K, Elie C, Nebel JC, Ryan A, Pierscionek BK. Primary sequence contribution to the optical function of the eye lens. *Sci Rep.* 2014;4:5195.
- Crisman RL, Randolph TW. Refolding of proteins from inclusion bodies is favored by a diminished hydrophobic effect at elevated pressures. *Biotechnol Bioeng.* 2008;102:483–92.