



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES “ZARAGOZA”**

**Estudio de degradación forzada y estabilidad intrínseca  
para identificar la formación de productos de  
degradación de un anticuerpo monoclonal.**

**T E S I S**

**Que para obtener el título de:**

**QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

Pedro Martín Reyes

**DIRECTORA**

M en C. Vanessa Hernández Rodríguez

**ASESOR**

Dr. Vicente Jesús Hernández Abad



**Ciudad de México 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

El trabajo de tesis presentado a continuación se realizó en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, en el departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos en el laboratorio del Dr. Tonatiuh Ramírez y Dra. Laura Palomares bajo la dirección de la M. en C. Vanessa Hernández Rodríguez. Para la realización del proyecto se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) ciencia básica SEP CB-2015-01-255445 y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM clave IT200315.

Esta tesis está dedicada a mi familia, a mis abuelos y especialmente a mis hermanos, que han sido una gran motivación (aunque a veces los odie).

## Agradecimientos

A todas las personas que me apoyaron en mi vida académica.

A mi directora de tesis, M. en C. Vanessa Hernández Rodríguez por sus consejos durante la ejecución de esta tesis

A mi tutor, Dr. Vicente Jesús Hernández Abad por sus amables consejos y paciencia.

A la Dra. Laura Palomares y al Dr. Tonatiuh Ramírez por haberme aceptado en su laboratorio y la M. en C. Vanessa Hernández por el tiempo dedicado para realizar esta tesis.

Muchas gracias a la Lic. Karin Levy por su amistad y apoyo.

“El poeta procede con las palabras, como el hombre de ciencia procede con las células, los átomos y otras partículas materiales: las arranca de su medio natural, el lenguaje diario, las aísla en una suerte de cámara de vacío, las reúne o separa y, en fin, observa y aprovecha las propiedades del lenguaje como el investigador las de la materia.”

*Octavio Paz.*

# 1 TABLA DE CONTENIDO

---

<b>1</b>	<b>Tabla de contenido .....</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Nomenclatura .....</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Marco teórico.....</b>	<b>9</b>
3.1	<b>Medicamentos biotecnológicos .....</b>	<b>9</b>
3.2	<b>Anticuerpos monoclonales .....</b>	<b>11</b>
3.3	<b>Producción de anticuerpos monoclonales .....</b>	<b>13</b>
3.4	<b>Importancia de la heterogeneidad de cargas en la estabilidad de los anticuerpos monoclonales .....</b>	<b>14</b>
3.5	<b>Estabilidad de sistemas dispersos en medicamentos biotecnológicos .....</b>	<b>15</b>
3.5.1	Teoría DLVO.....	16
3.5.2	Potencial Z.....	18
3.6	<b>Estudios de degradación forzada en formulaciones de productos biotecnológicos .....</b>	<b>20</b>
3.7	<b>Truncamiento de la Lys C-terminal y la actividad de un AcM.....</b>	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>Planteamiento del problema.....</b>	<b>24</b>
<b>5</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>25</b>
<b>6</b>	<b>Hipótesis.....</b>	<b>26</b>
<b>7</b>	<b>Material y métodos .....</b>	<b>28</b>
7.1	<b>Estudio de degradación forzada .....</b>	<b>28</b>
7.2	<b>DLS .....</b>	<b>30</b>
7.3	<b>Potencial Z.....</b>	<b>31</b>
7.4	<b>Espectrofluorometría .....</b>	<b>31</b>
7.4.1	Centro de Masa espectral.....	31
7.5	<b>HPLC-WCX .....</b>	<b>32</b>
<b>8</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>33</b>
<b>9</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>58</b>
<b>10</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>62</b>
<b>11</b>	<b>Perspectivas.....</b>	<b>63</b>
<b>12</b>	<b>Referencias.....</b>	<b>64</b>

## 2 NOMENCLATURA

---

ABC	Área Bajo la Curva
AcM	Anticuerpo Monoclonal
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
CPB	Carboxipeptidasa B
COFEPRIS	Comisión Federal de Protección contra Riesgos Sanitarios
CME	Centro de Masa espectral
DLS	Dispersión Dinámica de Luz
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FI	Fuerza iónica
FL	Espectrofluorimetría
HC	Cadena Pesada
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HPLC-WCX	Cromatografía Líquida de Alta Resolución-Intercambio Catiónico Débil
ICH	Conferencia Internacional sobre armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
LC	Cadena Ligera
LGS	Ley General de Salud
Lys	Lisina
MB	Medicamento Biotecnológico
MBB	Medicamento Biotecnológico Biocomparable
NA	No Aplica
NOM	Norma Oficial Mexicana



PBS	Buffer de fosfatos-salino
Phe	Fenilalanina
REDOX	Oxidación-Reducción
RIS	Reglamento de Insumos para la Salud
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
Try	Triptófano
Tyr	Tirosina
URF	Unidades Relativas de fluorescencia
UV-VIS	Ultravioleta-visible
°C	Grados Celsius

### **3 MARCO TEÓRICO**

---

#### **3.1 MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS**

Con la tecnología del ADN recombinante, hace ya más de 30 años<sup>1</sup>, se abrió una gran puerta para el mercado de los medicamentos, surgiendo así la era moderna de los medicamentos biotecnológicos. El principio activo de un medicamento biotecnológico se llama biofármaco; y se le denomina biofármaco a toda sustancia que haya sido producida por biotecnología molecular, que tenga actividad farmacológica, que se identifique por sus propiedades físicas, químicas, biológicas y que reúna las condiciones para ser empleada como principio activo de un medicamento biotecnológico<sup>2</sup>. Dichos biofármacos se obtienen por medio de microorganismos que en su genoma contienen genes sintéticos que codifican ciertas proteínas de interés farmacéutico, eso se logra a través de la ingeniería genética, primero diseñando un microorganismo capaz de producir la proteína de interés farmacéutico en ciertas condiciones de cultivo; posteriormente ese microorganismo crece en dichas condiciones favorables y a lo largo de su crecimiento va produciendo las proteínas de interés que son producto del metabolismo de estos microorganismos.

El mercado de los medicamentos biotecnológicos está compuesto por biofármacos como proteínas recombinantes, anticuerpos monoclonales, péptidos sintéticos y ácidos nucleicos sintéticos<sup>3</sup>. Las proteínas recombinantes son aquellas producidas por cualquier ente biológico procarionte o eucarionte al que se le introduce, por técnicas de

ingeniería genética, una secuencia de ADN que las codifica. Los anticuerpos monoclonales son proteínas recombinantes, específicamente inmunoglobulinas, fragmentos de inmunoglobulinas, por otro lado, los péptidos sintéticos son aquellos péptidos que están constituidos por menos de cuarenta aminoácidos producidos por técnicas de biotecnología molecular. Por último, los ácidos nucleicos sintéticos o plásmidos que son ácidos nucleicos obtenidos de plásmidos naturales o modificados por técnicas de ingeniería genética<sup>4</sup>. De estas moléculas los que poseen más ventas en el mercado biofarmacéutico son los anticuerpos monoclonales<sup>5</sup>.

Tabla 1. Anticuerpos monoclonales que se encuentran en desarrollo como biocomparables. Modificada de Nature BioEntrepreneur<sup>3</sup>.

<i>Producto</i>	<i>Molécula</i>	<i>Número de biocomparables en desarrollo</i>	<i>Fabricantes principales</i>	<i>Ventas en 2014 (\$mil millones)</i>	<i>Desarrollado por</i>	<i>Fecha de expiración de patente en EE.UU.</i>	<i>Fecha de expiración de patente en UE</i>
<i>Enbrel</i>	Etanercept	27	Merck/Samsung Bioepis, Coherus, Sandoz	8.5	Amgen/Pfizer	2028	2015
<i>Humira</i>	Adalimumab	24	Amgen, Sandoz	12.5	AbbVie	2016	2018
<i>Remicade</i>	Infliximab	13	Celltrion, Hospira	9.2	Johnson & Johnson/Merck	2018	2015
<i>Avastin</i>	Bevacixumab	22	Amgen, Oncobiologics	7.0	Genetech/Roche	2019	2022
<i>Herceptin</i>	Trastuzumab	37	Actavis/Amgen/Synthon, Biocad, Biocon/Mylan	6.8	Genetech/Roche	2019	2014
<i>Rituxan</i>	Rituximab	44	Sandoz, Boehringer Ingelheim	8.7	Biogen/Genetech/Roche	2018	2013

En el presente trabajo la proteína de estudio fue un anticuerpo monoclonal por lo que se procederá a describir más detalladamente sus características, específicamente de las IgG.

### 3.2 ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos monoclonales pertenecen a un tipo de proteínas llamadas inmunoglobulinas que constituyen la respuesta humoral del sistema inmune y representan aproximadamente el 20% de las proteínas plasmáticas del humano. Todas las inmunoglobulinas, independientemente de su especificidad, tienen una estructura común con cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas idénticas (HC) y dos cadenas ligeras (LC) idénticas, ambas cadenas –pesada y ligera– están unidas por un enlace disulfuro. Las cadenas pesadas, entre ellas, también se unen por enlaces disulfuro y estos enlaces se encuentran en una región flexible de la cadena pesada conocida como *bisagra*, que es una región de aproximadamente 12 aminoácidos. Cada región globular formada por el plegamiento de las cadenas polipeptídicas como resultado de la unión del enlace disulfuro se denomina dominio. Las cuatro cadenas de polipéptidos contienen regiones constantes (C) y regiones variables (V), que se encuentra en las partes de carboxilo y amino terminales, respectivamente. Las cadenas pesadas y ligeras tienen una única región V. Las cadenas pesadas contienen tres regiones C, mientras que las cadenas ligeras poseen una única región C<sup>6</sup>. Las regiones V de ambas cadenas, pesada y ligera, se combinan para formar dos sitios de unión a antígeno idénticos, estos son los sitios del anticuerpo que se unen al antígeno. A continuación, en la Figura ,1 se presenta un ejemplo gráfico.

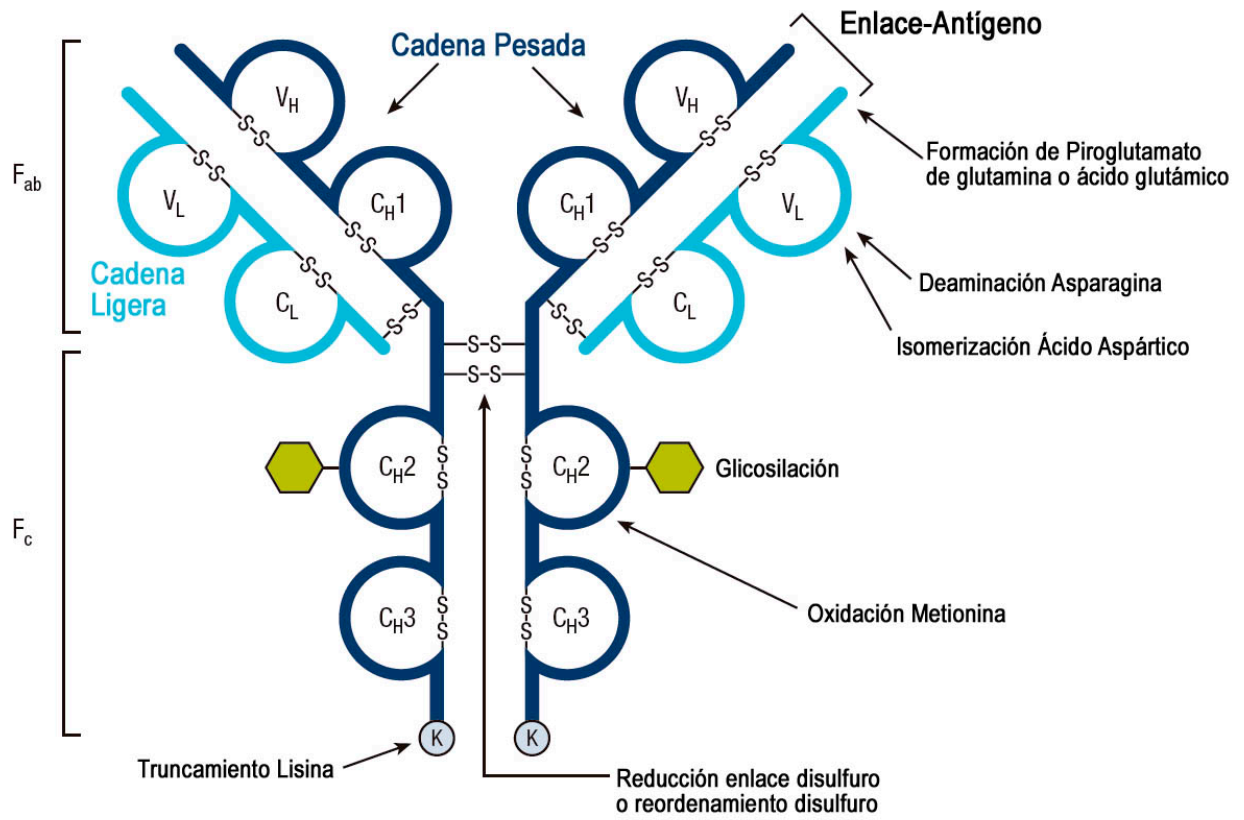


Figura 1. Estructura típica de un anticuerpo monoclonal y sitios de posibles rutas de degradación.

### 3.3 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

En su mayoría los biofármacos, como ya se ha dicho, son proteínas producto del metabolismo de ciertos microorganismos, cabe resaltar que las expresiones de estas proteínas están en función de diversos factores como el tipo y condición del microorganismo, presencia o ausencia de sustratos, actividades enzimáticas intra y extracelulares, compuestos inhibitorios, así como el estado energético celular y parámetros fisicoquímicos como el pH, temperatura y el potencial REDOX<sup>5</sup>. Por lo anteriormente mencionado, es de suma importancia el control del proceso de producción ya que de esto depende finalmente la calidad de la proteína.

Durante algunas etapas del proceso como en la purificación, formulación<sup>7</sup> o el transporte y el almacenamiento, un anticuerpo monoclonal puede estar sometido a diversas condiciones de estrés que pueden afectar la calidad de la molécula<sup>8</sup>. Por lo anterior, es de suma importancia conocer la estabilidad intrínseca de la misma, es decir, las propiedades inherentes a la molécula de mantener su integridad ante ciertas condiciones de estrés<sup>9</sup>. Dichos factores pueden ser temperaturas elevadas, cambios de pH, estrés mecánico, etcétera. Cuando una proteína es sometida a este tipo de condiciones es posible que comience a degradarse siguiendo alguna ruta de degradación. Para el caso del desplegamiento y desnaturalización de la proteína, se refiere a la pérdida de su estructura terciaria debido a diversas condiciones de estrés como la temperatura, presión, agentes químicos desnaturalizantes (SDS 1% o cloruro de guanidinio)<sup>10</sup>, o pH's muy bajos o muy altos<sup>11</sup>. Se sabe que las proteínas se pliegan de acuerdo a su entorno, de esta manera las proteínas en una solución acuosa se pliegan con sus grupos hidrofílicos hacia la parte externa y con sus grupos hidrofóbicos

hacia su parte interna para obtener mayor estabilidad<sup>12</sup>. En cuanto a la agregación que, es la auto-asociación de proteínas o unidades monoméricas, se describen dos tipos: la agregación irreversible que es atribuida a la interacción covalente y no covalente de proteínas desnaturalizadas, y la agregación reversible, que es atribuida a la fuerza iónica y cambios en el pH<sup>13</sup>.

### **3.4 IMPORTANCIA DE LA HETEROGENEIDAD DE CARGAS EN LA ESTABILIDAD DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES**

La heterogeneidad de cargas en un anticuerpo monoclonal ha adquirido especial atención en la industria farmacéutica debido al posible impacto que puede tener en la estabilidad y la actividad biológica. Dicha heterogeneidad no ha podido ser bien explicada en la actualidad, sin embargo, se sabe que se puede deber a modificaciones postraduccionales y a la estabilidad del anticuerpo. Estas variaciones en las cargas pueden ser caracterizadas por diversas técnicas analíticas<sup>14</sup> como el isoelectroenfoque, isoelectroenfoque capilar, y cromatografía de alta resolución por intercambio iónico<sup>15</sup>.

En un cromatograma obtenido por HPLC-WCX, a dicha variación de cargas, se les pueden denominar especies ácidas y especies básicas con respecto al pico correspondiente a la isoforma con dos lisinas carboxilo terminales; es decir, las isoformas que eluyen antes del pico correspondiente con dos lisinas se les considera especies ácidas y las isoformas que eluyen después del pico correspondiente a la isoforma con dos lisinas se les considera isoformas básicas. Se ha visto por medio de

técnicas de isoelectroenfoque que las especies ácidas de un AcM tienen un punto isoeléctrico bajo y las especies básicas tienen un punto isoeléctrico alto. La presencia de especies básicas se debe a que el anticuerpo posee en el extremo dos lisinas C-terminales, la ausencia de una o las dos lisinas pueden dar lugar a las especies ácidas<sup>16</sup>.

Para confirmar la presencia de especies básicas en un AcM se puede hacer una digestión con una enzima llamada carboxipeptidasa B, ésta es capaz de remover la lisina C-terminal, es decir, remover las especies básicas del anticuerpo, por lo tanto, la proporción básica de aminoácido C-terminal en un AcM se puede analizar a través de la modificación de la proporción de variantes de carga después del tratamiento con CPB.

### **3.5 ESTABILIDAD DE SISTEMAS DISPERSOS EN MEDICAMENTOS BIOTECNOLÓGICOS**

Un sistema disperso es aquel en el que una o más sustancias (fase dispersa) se encuentran distribuidas en el interior de la otra (medio dispersante) en forma de pequeñas partículas<sup>17</sup>. Debido a que, por lo general, los anticuerpos monoclonales son formulados en suspensiones y al momento de ser almacenados se encuentran suspendidos en algún buffer, a continuación, se describe con detalle a los sistemas dispersos.

Desde el punto de vista fisicoquímico estos sistemas son termodinámicamente inestables. El exceso de energía libre, asociada a la gran superficie existente entre las



partículas y el medio, da lugar a que las partículas tiendan a aglomerarse para reducir su energía libre interna<sup>18</sup>.

La estabilidad de los sistemas dispersos depende de diversos factores como la temperatura y el grado de dispersión, pero principalmente depende de estos dos factores:

- Viscosidad
- Carga eléctrica de las partículas

En el caso de la viscosidad el agregado de sustancias con propiedades reológicas a un sistema disperso favorece la estabilidad, al aumentar la viscosidad del medio dificulta la movilidad de las partículas impidiendo que se aproximen.

### 3.5.1 Teoría DLVO

La teoría DLVO (Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek) de sistemas dispersos indica que las partículas coloidales están sometidas a fuerzas de atracción y repulsión y que existe un balance entre dichas fuerzas.

Por un lado, el movimiento Browniano produce colisión entre las partículas y, si las fuerzas de atracción predominan, las partículas se aglomeran después de la colisión. En caso contrario, si las fuerzas de repulsión predominan las partículas permanecen separadas después de la colisión. Las fuerzas de atracción son las de Van der Waals, en tanto que la repulsión electrostática depende de la densidad de carga de la

superficie y del espesor de la doble capa. Es decir, si el valor absoluto del potencial Z es pequeño (más cercano a cero), la energía potencial resultante es negativa por lo tanto predominan las fuerzas de atracción de Van der Waals, en otras palabras, las partículas en suspensión tienden a agregarse con rapidez<sup>19</sup>.

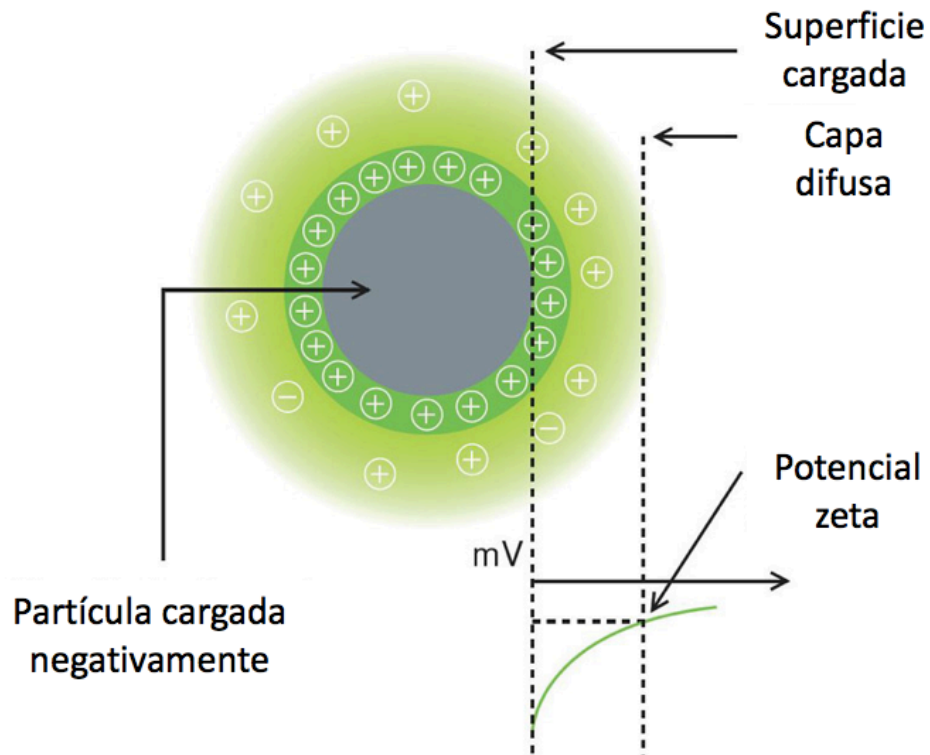
### 3.5.2 Potencial Z

Como se ha dicho anteriormente, la carga superficial de las moléculas que se encuentran en una suspensión determina el nivel de agregación de las moléculas. Con la tecnología hasta ahora disponible es imposible determinar directamente la carga de una molécula en suspensión, sin embargo, dicha carga se puede conocer de forma indirecta por medio del potencial Z.

Cuando se tiene una suspensión, la carga superficial de una partícula influye en la distribución de iones en el medio acuoso, los iones de carga contraria a la de la superficie denominados contra-iones son atraídos hacia la superficie, los iones de carga similar, denominados co-iones serán repelidos por la superficie. El resultado es la formación de una doble capa eléctrica construida por la superficie cargada y por un exceso neutralizador de contra-iones sobre co-iones distribuidos difusamente en el medio acuoso<sup>20</sup>. Esta doble capa se divide en dos partes:

- La parte interna que puede incluir iones adsorbidos.
- La parte difusa en la que los iones se distribuyen por efecto de las fuerzas eléctricas y el movimiento térmico.

Las dos partes de la capa doble están separadas por un plano, el plano de Stern. De este modo los contra-iones pueden mantenerse en la superficie gracias a la atracción electrostática y el centro de estos iones forma el plano de Stern, como se muestra en la Figura 2.



**Figura 2. Modelo de la capa de Stern**

Una vez ubicadas la capa de Stern y la capa difusa es más fácil entender el potencial Z, que se define como la diferencia de potencial entre la capa difusa y la capa de Stern. El potencial Z es de importancia práctica porque puede medirse experimentalmente y revela información acerca de que tan cargada se encuentra una molécula.

### **3.6 ESTUDIOS DE DEGRADACIÓN FORZADA EN FORMULACIONES DE PRODUCTOS BIOTECNOLÓGICOS**

Los estudios de estabilidad de fármacos y medicamentos son la evidencia científica que demuestran el periodo de vida útil asignado a éstos. Dichos estudios, permiten asignar y confirmar los periodos de caducidad o reanálisis, tiempos de permanencia a granel o productos intermedios almacenados durante el proceso, así como también establecer las condiciones de almacenamiento, transporte y seleccionar el mejor sistema contenedor-cierre<sup>8</sup>.

Antes de realizar los estudios de estabilidad es importante conocer los productos de degradación que se pueden formar durante la descomposición de una molécula. Una de las estrategias a seguir para conocer estos productos de degradación es realizar un estudio de degradación forzada<sup>11, 13</sup> en el que la molécula se somete a condiciones más severas que en condiciones de estabilidad acelerada, es decir obligar a la molécula a su degradación bajo ciertas condiciones exageradas de estrés<sup>21</sup>. Este tipo de estudio tiene varios roles dentro de las áreas de la industria biofarmacéutica<sup>11</sup> debido a que ayuda a realizar los estudios de preformulación, a obtener los productos de degradación, a proponer condiciones adecuadas de almacenamiento, a desarrollar métodos indicativos de estabilidad, a realizar estudios de biocomparabilidad y a comprender la estabilidad intrínseca de la molécula como se muestra en la Figura 3.



**Figura 3. Rol de los estudios de degradación forzada en la industria *biofarmacéutica***

En el desarrollo farmacéutico la estabilidad intrínseca y el desarrollo de la formulación son esenciales uno para el otro. Al caracterizar la molécula y saber bajo qué condiciones es más estable, se puede comenzar a realizar el desarrollo de la formulación proponiendo los excipientes de acuerdo con la forma farmacéutica deseada. Estos estudios también proporcionan información acerca del tipo de material con el que el biofármaco es más estable y ayuda a seleccionar el material de envase adecuado para la formulación.

Con el surgimiento de las tecnologías de producción de estas biomoléculas también se han desarrollado diversas técnicas analíticas (Tabla 2) para caracterizarlas y evaluar su calidad<sup>22</sup>, tales como cromatografía por exclusión de tamaño<sup>23</sup> y dispersión dinámica de

luz<sup>24</sup> que brindan información acerca del tamaño y la proporción en la que se encuentran, cromatografía de intercambio iónico<sup>25, 26, 27</sup> técnica que separa y proporciona la distribución de cargas de la molécula de interés presentes en una muestra. En el caso de la electroforesis en gel de poliacrilamida<sup>28,29</sup>, esta es una técnica cuantitativa que es utilizada para separar mezclas de proteínas, evaluar la pureza de ellas y determinar sus características como peso molecular, punto isoeléctrico, subunidades, carga, entre otras<sup>30</sup>.

Tabla 2. Algunas de las técnicas analíticas utilizadas para el análisis de un AcM

Técnica analítica	Atributo
HPLC-WCX	Isoformas (Lisina C-terminal)
Dispersión dinámica de luz	Agregados y diámetro de la molécula
Espectroscopia de fluorescencia	Plegamiento de la proteína
Potencial Z	Variación de la carga eléctrica de acuerdo al pH

### 3.7 TRUNCAMIENTO DE LA LYS C-TERMINAL Y LA ACTIVIDAD DE UN AcM

Ghali<sup>31</sup> y Jiang<sup>32</sup> junto con sus colaboradores han demostrado que la presencia o ausencia de lisina C-terminal no afecta a la potencia *in vitro* de un anticuerpo monoclonal y que en las pruebas realizadas en ratas tampoco se vio afectada la

farmacocinética, ni la afinidad por el antígeno. Sin embargo, la heterogeneidad de cargas en un anticuerpo monoclonal ha cobrado gran relevancia para demostrar la consistencia de un proceso en las buenas prácticas de manufactura y en la estabilidad de un anticuerpo<sup>33</sup>. Debido a lo anterior, se han realizado varios esfuerzos para determinar qué factores influyen sobre la formación de las mismas. En el caso de Harris<sup>34</sup>, pionero en investigar la formación de isoformas, atribuye a que uno de los posibles factores de formación de isoformas es la degradación de la proteína. Uno de los experimentos que se han hecho por Do Gyun<sup>35</sup> y colaboradores, es realizar una digestión con carboxipeptidasa B con la finalidad de obtener sólo las variantes ácidas del anticuerpo; también recolectaron muestras básicas de AcM y ambas fueron almacenadas durante 24 horas a 8°C y 37°C. Posteriormente las muestras fueron analizadas por HPLC-WCX y como resultado obtuvieron que a 37°C hubo formación de variantes ácidas, es decir anticuerpos con lisina C-Terminal truncada, por otro lado, en la muestra de AcM que fue procesado con CPB no hubo cambio significativo en alguna formación de especie ácida.



## 4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

Con el vencimiento de las patentes de los medicamentos biotecnológicos han surgido los medicamentos biocomparables, lo que abre una gran oportunidad a la industria farmacéutica para desarrollar este tipo de medicamentos a menor costo para algunas enfermedades que afectan a la población mexicana como algunos tipos de cáncer, que es la tercera causa principal de defunciones (al 26 de mayo de 2016, INEGI)<sup>21</sup>, enfermedades autoinmunes y reumáticas.

Debido a la complejidad de las moléculas producidas por procesos biotecnológicos, es de suma importancia realizar una caracterización fisicoquímica tanto de las sustancias puras, como de las formulaciones que las contienen y sus productos de degradación. Como parte de la caracterización fisicoquímica se deben analizar las isoformas de un anticuerpo monoclonal. Al analizar el AcM de referencia y el AcM de estudio se encontró que se existen diferencias en el extremo C-terminal de la cadena pesada. Estas diferencias que se han observado en las isoformas pueden ser debido al tiempo de vida en anaquel, condiciones de almacenamiento, al pH en que se encuentra la formulación y a otros excipientes en la formulación que pueden afectar el anticuerpo monoclonal, pero ¿estas isoformas realmente pueden ser productos de degradación del biofármaco o es otro factor el que influye en la formación de estas? Aquí reside el reto de esta investigación que consiste en diseñar un estudio de degradación forzada a diferentes condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica y con la formulación del producto de referencia con la finalidad de obtener los productos de degradación y así analizarlos e identificarlos.

## 5 OBJETIVOS

---

**Objetivo general:** Identificar la formación de productos de degradación de un anticuerpo monoclonal debido al efecto de diversas condiciones de estrés severas.

### **Objetivos específicos:**

- Establecer el diseño de estudio de degradación forzada.
- Determinar los cambios de isoformas en cada una de las etapas de la purificación del AcM.
- Determinar y comparar el tipo de isoformas presentes en el anticuerpo monoclonal (producto de referencia y AcM de estudio).
- Determinar la presencia de agregados en cada una de las condiciones de estudio, por medio de la técnica de DLS.
- Determinar la relación del potencial zeta de la molécula con la formación de agregados en cada una de las condiciones de estudio.
- Determinar cambios en el plegamiento de la molécula con la técnica de fluorescencia.

## 6 HIPÓTESIS

---

El tipo de isoformas presentes, agregados y el desplegamiento del AcM de estudio son productos de degradación que se deben a las diversas condiciones de estrés sometidas y a las condiciones en las que se encontró almacenado.

### Diseño Experimental

Tipo de estudio. Según la clasificación de Méndez<sup>36</sup> la investigación presentada es:

Con el periodo en que se capta la información es un estudio:

- **Prospectivo** por que se recogerá la información de acuerdo con los criterios que se establezcan en la investigación.
- De acuerdo con la evolución del fenómeno estudiado es **Transversal**, debido a que las variables se miden una sola vez a través del tiempo.
- De acuerdo con la comparación de las poblaciones, el estudio es **descriptivo**, ya que cuenta con una población misma que se pretende describir en función de un grupo de variables.
- Con respecto a la interferencia del investigador en el fenómeno que se analiza, se trata un estudio **experimental**, en el cual el investigador modifica a voluntad una o más variables del fenómeno estudiado. Generalmente, modifica las variables consideradas como causa dentro de una relación de causas y efecto.

Población de estudio: Anticuerpo monoclonal producido en el laboratorio.

Población objetivo: Lotes producidos en escala piloto y muestras de todo el tren de purificación de escala piloto.

Criterios de inclusión:

- Muestras de cada una de las etapas del proceso de purificación (cromatografía 1, cromatografía 2, cromatografía 3 y producto terminado)
- Lote no contaminado durante la producción
- Lote que cumpla con los parámetros de calidad propuestos para control interno

Criterios de exclusión:

- Muestra contaminada durante el tratamiento con algún hongo o bacteria
- Muestras no almacenadas a 2-8°C
- Muestras mal etiquetadas

Criterios de eliminación:

- Extravío de la muestra
- Derrame accidental de la muestra

Definición de variables:

- Variables dependientes: Isoformas, agregados, desnaturalización de la proteína.
- Variables independientes: Estrés térmico, fuerza iónica, tiempo y pH.

## 7 MATERIAL Y MÉTODOS

---

### 7.1 ESTUDIO DE DEGRADACIÓN FORZADA

Se realizó un estudio de degradación forzada con tres diferentes factores de estrés que fueron temperatura, fuerza iónica y pH. Como muestra control se utilizó el mismo AcM de estudio en PBS 5mg/mL almacenado a 2-8°C.

En el caso de la temperatura se alicuotaron 600µL a 5mg/mL de anticuerpo a pH 6.3 (buffer de formulación del AcM de referencia) y se sometieron a tres diferentes temperaturas 37°C, 60° y 80°C durante 2 minutos.

Para la fuerza iónica: se prepararon dos soluciones de NaCl con una fuerza iónica de 10mM y 70mM, se alicuotaron 600µL de cada uno a 5mg/mL de anticuerpo y se almacenaron durante 4 semanas a una temperatura de 37°C y se siguió el esquema de muestreo que se muestra a continuación:

*Tabla 2. Tiempos de muestreo y condiciones de estudio para estrés por fuerza iónica*

<b>Condición</b>	<b>Tiempo 0 (Día 0)</b>	<b>Tiempo 1 (Día 8)</b>	<b>Tiempo 2 (Día 16)</b>	<b>Tiempo 3 (Día 24)</b>	<b>Tiempo 4 (Día 32)</b>
Fuerza iónica 10mM	600 µL	600 µL	600 µL	600 µL	600 µL
Fuerza iónica 70mM	600 µL	600 µL	600 µL	600 µL	600 µL

La concentración de todas las alícuotas fue 5mg/mL

Para la degradación a tres diferentes pH's.

- Buffer pH 6.3 que contiene: L-Histidina, L-Histidina·HCl, sacarosa y polisorbato 20
- Buffer pH 7.3 que contiene: Ácido fosfórico y fosfato de sodio 10mM
- Buffer pH 9.3 que contiene: Ácido bórico y borato de sodio 10mM

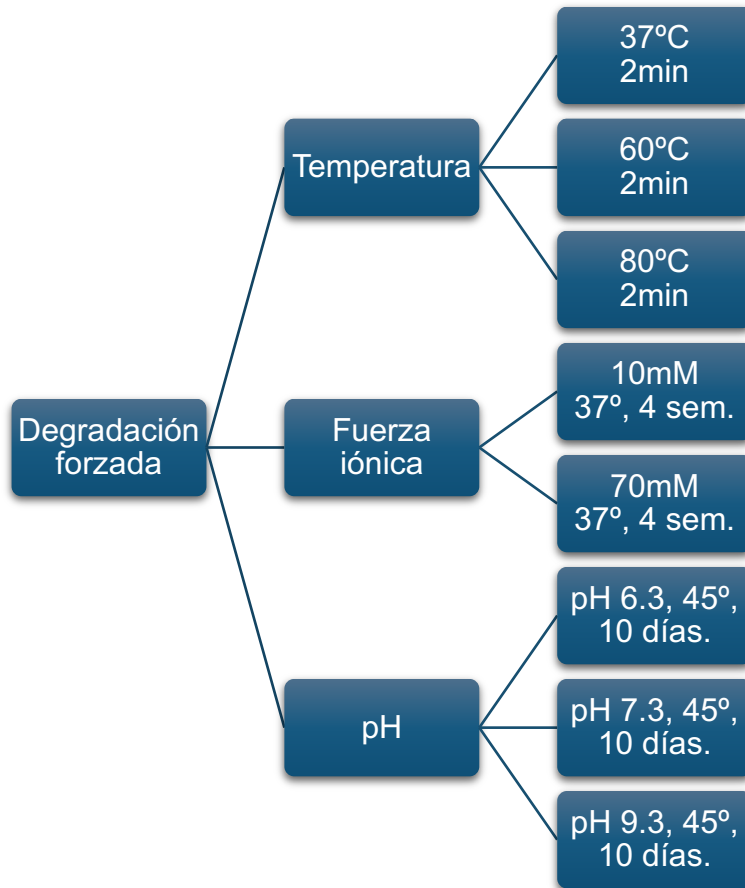
Se alicuotaron 600µL de solución de los tres diferentes pH's a una concentración de 5mg/mL y se almacenaron a 45°C durante 10 días siguiendo el esquema de muestreo que a continuación se presenta:

*Tabla 3. Condiciones de estudio y muestreo para estrés por pH*

<b>Condición</b>	<b>Tiempo 0</b>	<b>Tiempo 1 (Día 3)</b>	<b>Tiempo 2 (Día 5)</b>	<b>Tiempo 3 (Día 8)</b>	<b>Tiempo 4 (Día 10)</b>
pH 6.3	600 µL	600 µL	600 µL	600 µL	600 µL
pH 7.3	600 µL	600 µL	600 µL	600 µL	600 µL
pH 9.3	600 µL	600 µL	600 µL	600 µL	600 µL

La concentración de todas las alícuotas fue 5mg/mL

Como muestra control se utilizó una alícuota del mismo AcM de estudio 5mg/mL en buffer PBS pH 7.0



*Figura 4. Esquema del estudio de la degradación forzada*

## 7.2 DLS

Para medición de tamaño de partícula por Dispersión Dinámica de Luz se empleó el sistema de caracterización de partículas Zetasizer nano-Zs (Malvern Instruments Ltd). Las mediciones fueron realizadas utilizando una celda de cuarzo con 3 mm de longitud de paso óptico, todas las mediciones se realizaron a una temperatura constante de 25°C y un tiempo de equilibrio de temperatura de la celda de 2 minutos.

### **7.3 POTENCIAL Z**

El potencial Z de todas las muestras sometidas al estudio de estabilidad se determinó con el sistema de caracterización de partículas Zetasizer nano-Zs (Malvern Instruments Ltd) equipado con un láser de 633 nm. Las mediciones fueron realizadas utilizando una celda capilar plegada de poliestireno, todas las mediciones se realizaron a una temperatura de 25°C y un tiempo de equilibrio de temperatura de la celda de 2 minutos.

### **7.4 ESPECTROFLUOROMETRÍA**

Se determinaron los espectros de fluorescencia del anticuerpo monoclonal con el espectrofluorómetro Ls55 (Perkin Elmer Instruments) a las longitudes de onda de excitación de 295 nm sólo para triptófano y 280 nm para excitar ambos aminoácidos triptófano y tirosina. Se realizaron barridos de emisión de fluorescencia desde 280 nm a 450 nm a una velocidad de 50 nm/min. La apertura del monocromador de excitación y emisión fue de 2.5 nm en cada una de las mediciones. La temperatura de la celda se mantuvo constante en 20°C. Se analizaron todas las muestras del estudio de estabilidad y como control positivo de desplegamiento se utilizó el anticuerpo monoclonal de referencia tratado con cloruro de guanidinio 3M a 37°C durante 8 horas.

#### **7.4.1 Centro de Masa espectral**

Para cada una de las muestras sometidas a la degradación forzada se calculó el centro de masa espectral de fluorescencia. El centro de masa espectral (CME) provee información acerca de cambios en el espectro de fluorescencia<sup>37</sup> que es posible



correlacionarlos con cambios en el ambiente hidrofóbico e hidrofílico de los cromóforos de las proteínas<sup>38</sup> (Trp Tyr y Phe). El CME se calcula con la ecuación siguiente:

$$CME = \frac{\sum_{280}^{450} URF * \lambda}{\sum_{280}^{450} UF}$$

Donde:

URF: Unidades de Fluorescencia

$\lambda$ : Longitud de onda

UF: Unidades de Fluorescencia

## 7.5 HPLC-WCX

Las muestras sometidas al estudio de degradación forzada fueron analizadas por HPLC utilizando una columna de intercambio catiónico débil Dionex ProPac® WCX-10, 4.0 mmID x 250 mm (Thermo Sc.) y dos fases móviles, fase A (20 mM MES, 30 mM NaCl pH 5.6) y fase B (20 mM MES, 240 mM NaCl pH 5.6). Se utilizó el sistema cromatográfico Alliance Bio con los siguientes componentes:

- Detector de arreglo de diodos 2998 ( $\lambda$  200-800 nm)
- Software Empower Pro 2.0 (Waters Corp).

## 8 RESULTADOS

### Análisis HPLC-WCX para cuatro lotes diferentes del AcM

Con el propósito de determinar las isoformas presentes en el AcM del producto de referencia y el AcM de estudio, se analizaron las muestras por medio de la técnica de HPLC-WCX.

En el siguiente cromatograma (Figura 5 y Tabla 4) se comparan tres diferentes lotes del AcM de referencia con un lote de AcM de estudio.

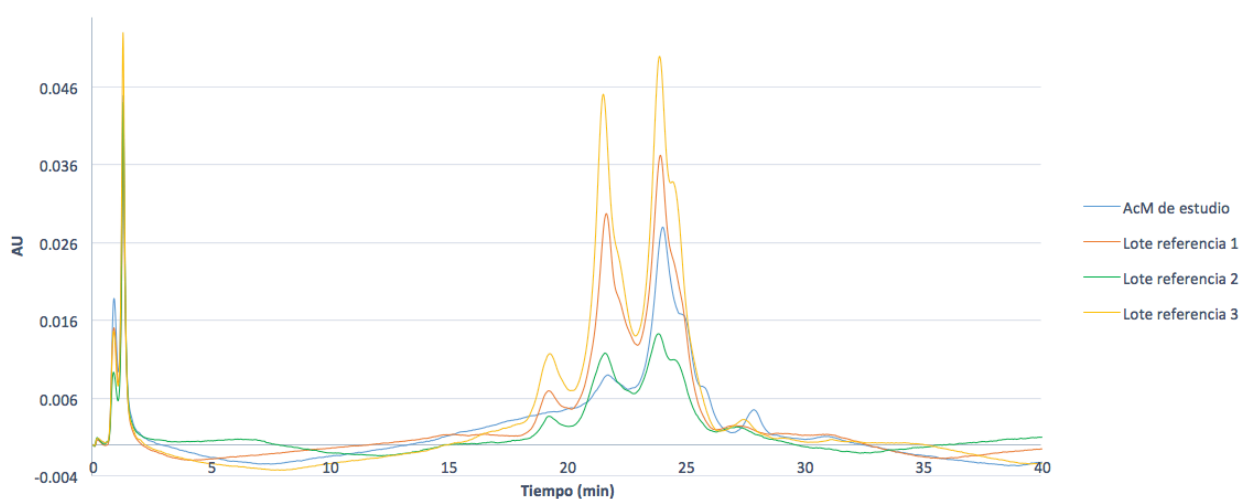


Figura 5. Cromatograma HPLC-WCX comparativo de tres diferentes lotes del AcM de referencia con un lote del AcM de estudio.

Tabla 4. Áreas bajo la curva de los tres diferentes lotes de AcM del AcM de referencia y del AcM de estudio.

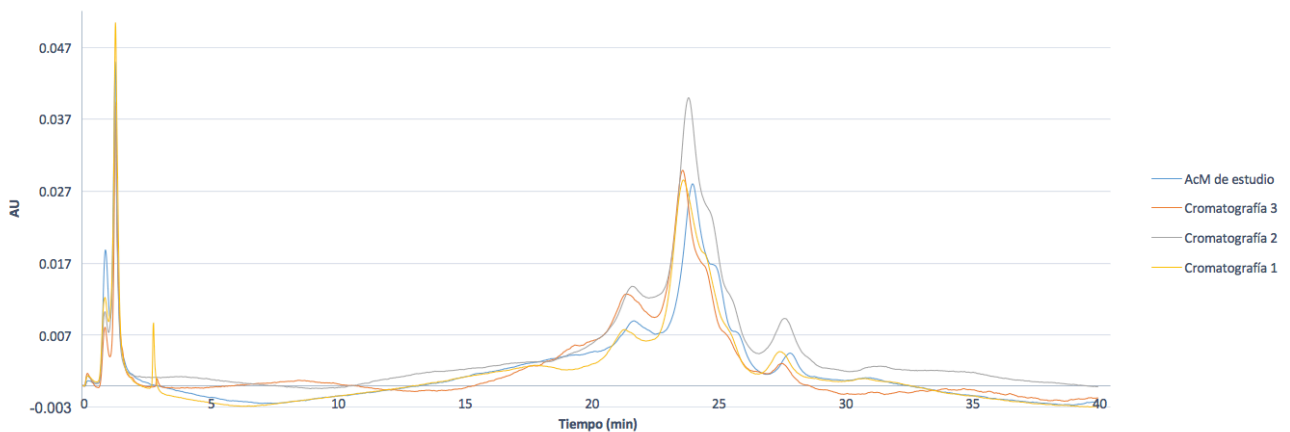
<b>Condición</b>	<b>Isoforma 1 %</b>	<b>Isoforma 2 %</b>	<b>Isoforma 3 %</b>
<i>AcM de estudio sin tratamiento</i>	0.0	13.32	81.81
<i>Lote 1</i>	7.01	42.25	50.74
<i>Lote 2</i>	6.45	40.87	52.68
<i>Lote 3</i>	7.72	38.75	53.53

Se determinó que en los distintos lotes del AcM de referencia no hay diferencias en el porcentaje en las ABC, sin embargo, comparado con el AcM de estudio existe una clara diferencia en la distribución de los tres picos de las isoformas siendo favorecidas los picos dos y tres que corresponden a las regiones básicas con una lisina C-terminal (pico 2) y dos lisinas C-terminales (pico 3).

### **Análisis HPLC-WCX para cada una de las etapas de purificación**

Debido a que en cada una de las etapas del proceso de purificación el anticuerpo está en contacto con diferentes buffers con distinto pH y distinta fuerza iónica, se propuso analizar todo el proceso de purificación por el que el anticuerpo es sometido.

Para cada una de las etapas de purificación se realizó un análisis HPLC-WCX como se describe en la sección anterior para identificar las isoformas y la posible formación de ellas durante el proceso de purificación. Los resultados se muestran a continuación en la Figura 6 y en la Tabla 5.



**Figura 6. Cromatograma HPLC-WCX donde se muestra la comparación de las isoformas en las distintas etapas de purificación del AcM de estudio.**

Tabla 5. Áreas bajo la curva de las diferentes muestras del proceso de purificación analizadas por HPLC-WCX.

<b>Condición</b>	<b>Isoforma 1 %</b>	<b>Isoforma 2 %</b>	<b>Isoforma 3 %</b>
<i>Producto final</i>	13.32	81.81	4.87
<i>Cromatografía 1</i>	10.93	80.84	8.23
<i>Cromatografía 2</i>	11.40	81.39	7.21
<i>Cromatografía 3</i>	11.51	83.19	5.30

En este cromatograma se puede observar que no hay cambios en las isoformas durante el proceso de purificación, es decir, el pico que corresponde a la isoforma con dos lisinas C-terminales (isoforma 2) se mantiene por arriba del 80% del ABC.

## Análisis HPLC-WCX para cada una de las condiciones de estrés por pH

Para cada una de las muestras sometidas a estrés por pH (Tabla 6) se realizó un análisis HPLC-WCX con el propósito de determinar las isoformas presentes en el AcM de estudio y la posible formación de ellas. Se realizó la degradación forzada a tres diferentes condiciones de pH con la finalidad de probar una condición ácida, neutra y alcalina y poder determinar los productos de degradación bajo cada una de esas condiciones de estrés. Además, que el pH 6.3, es el pH en el que se encuentra el buffer de formulación del AcM de referencia.

Tabla 6. Porcentaje del área bajo la curva por cada condición de estrés por pH

<b>Condición</b>	<b>Isoforma 1 %</b>	<b>Isoforma 2 %</b>	<b>Isoforma 3 %</b>
<i>AcM de estudio sin tratamiento</i>	17.2	72.7	10.1
<i>pH 6.3, t= 0 días</i>	11.7	77.1	11.2
<i>pH 6.3, t= 3 días</i>	0.0	0.0	0.0
<i>pH 6.3, t= 5 días</i>	0.0	0.0	0.0
<i>pH 6.3, t= 7 días</i>	0.0	0.0	0.0
<i>pH 6.3, t= 9 días</i>	0.0	0.0	0.0
<i>pH 7.3, t= 0 días</i>	18.2	70.8	10.9
<i>pH 7.3, t= 3 días</i>	33.4	66.6	0
<i>pH 7.3, t= 5 días</i>	0.0	0.0	0.0
<i>pH 7.3, t= 7 días</i>	0.0	0.0	0.0
<i>pH 7.3, t= 9 días</i>	0.0	0.0	0.0
<i>pH 9.3, t= 0 días</i>	18.4	71.6	9.9
<i>pH 9.3, t= 3 días</i>	0.0	0.0	0.0
<i>pH 9.3, t= 5 días</i>	0.0	0.0	0.0
<i>pH 9.3, t= 7 días</i>	0.0	0.0	0.0
<i>pH 9.3, t= 9 días</i>	0.0	0.0	0.0

### Formación de isoformas durante el estudio de degradación forzada a pH 6.3

A continuación (Figuras 7 y 8) se presenta un cromatograma del estudio de degradación forzada a pH 6.3, pH en el que se encuentra el buffer del AcM de referencia.

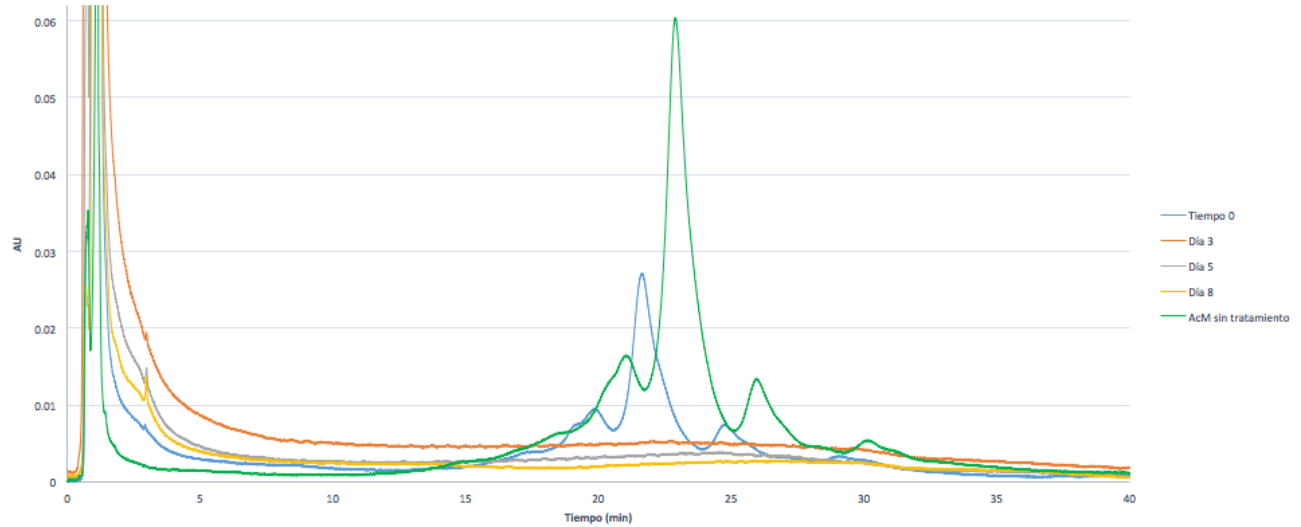


Figura 7. Cromatograma WCX de las muestras de degradación forzada pH 6.3

En la gráfica que se muestra a continuación, se puede observar los cambios en el porcentaje de ABC que hubo durante el estudio de degradación forzada a pH 6.3.

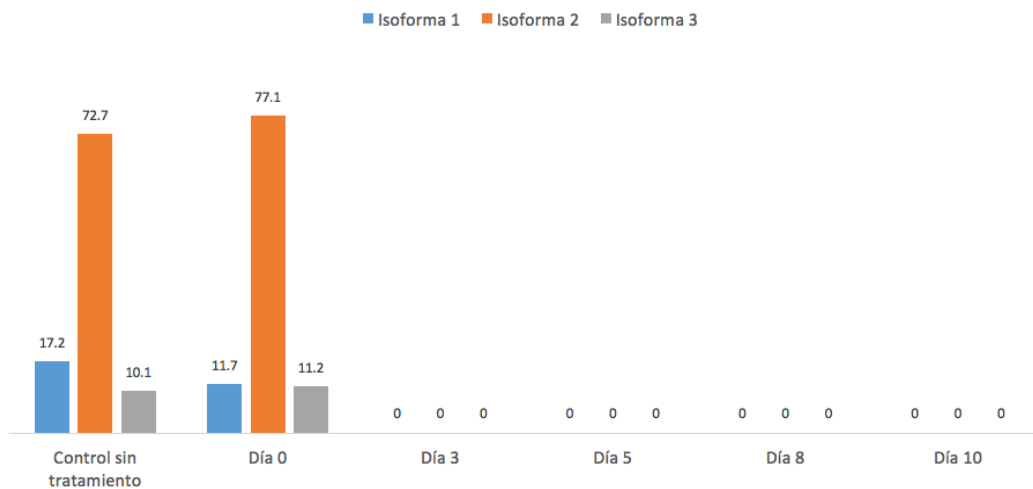


Figura 8. Porcentajes de las áreas bajo la curva para degradación por pH 6.3

### Formación de isoformas durante el estudio de degradación forzada a pH 7.3

En este cromatograma (Figura 10) se pueden observar las muestras de los diferentes tiempos de muestreo del estudio de degradación forzada a pH 7.3. Es importante destacar que a pH 7.3 es el único pH en que se puede observar área bajo la curva en el día número tres del estudio de degradación (Figura 11).

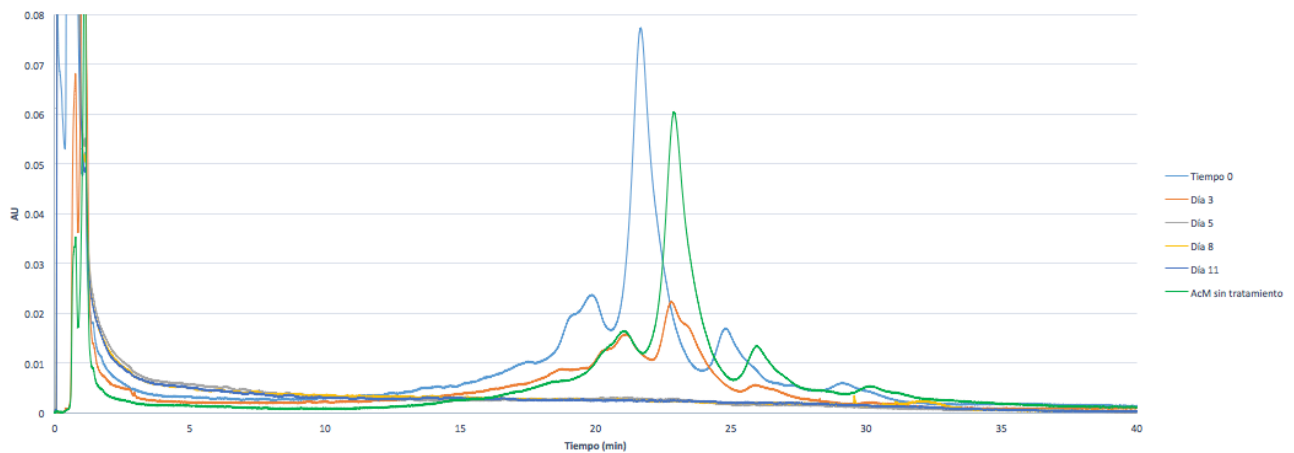


Figura 10. Cromatograma WCX de las muestras de degradación forzada pH 7.3

En la gráfica que se muestra a continuación, se puede observar los cambios en el porcentaje de ABC que hubo durante el estudio de degradación forzada a pH 7.3.

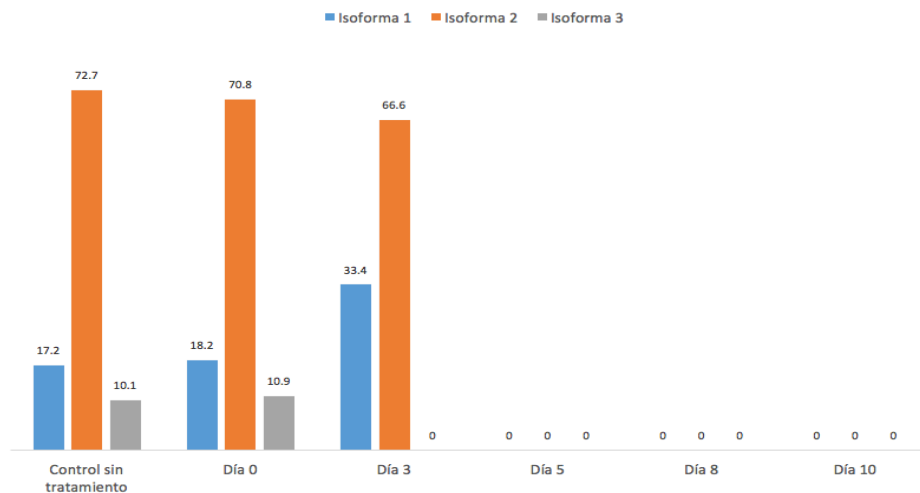


Figura 11. Porcentajes de las áreas bajo la curva para degradación por pH 7.3

### Formación de isoformas durante el estudio de degradación forzada a pH 9.3

En el cromatograma presentado a continuación (Figura 12) se observan las muestras del estudio de degradación forzada a pH 9.3.

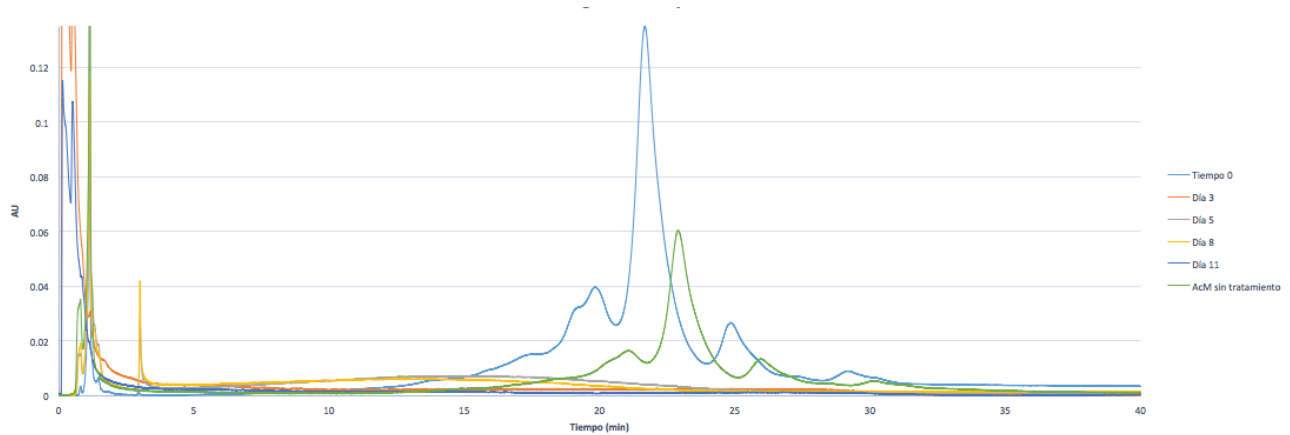


Figura 12. Cromatograma WCX de las muestras de degradación forzada pH 9.3

En la gráfica que se muestra a continuación (Figura 13) se puede observar los cambios en el porcentaje de ABC que hubo durante el estudio de degradación forzada a pH 9.3, al tiempo cero no hubo un aparente cambio, sin embargo, ya no se encontró ABC desde el día 3.

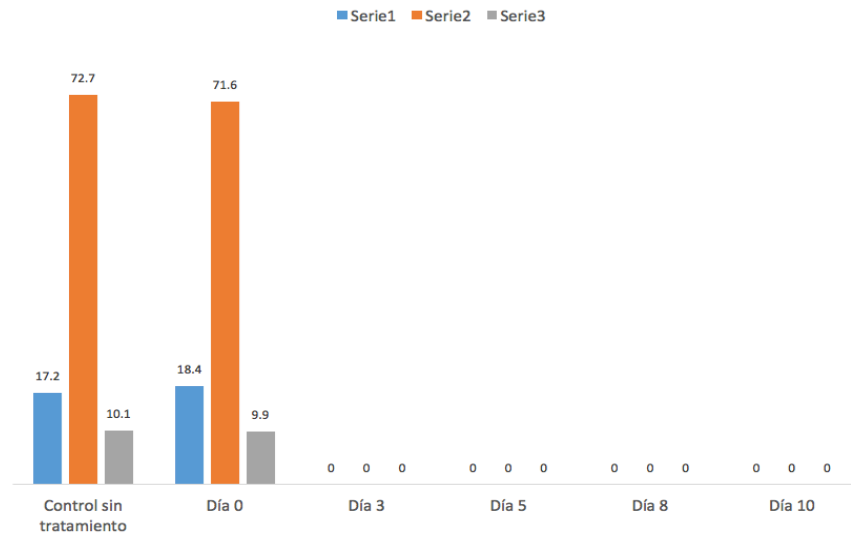


Figura 13. Porcentajes de las áreas bajo la curva para degradación por pH 9.3



Se puede observar en los cromatogramas presentados con anterioridad (Figuras 7, 10 y 12) que en los tiempos ceros no se presentan cambios mayores a pH 6.3 y 9.3, sin embargo, a partir del día 3 no se puede observar el ABC. Por otro lado, a pH 7.3 se observa que al tiempo 3 el pico 3 desaparece para dar lugar al incremento de 15.2% de ABC pico 1, que corresponde a la isoforma más ácida de los tres picos presentes.

### **Análisis HPLC-WCX para cada una de las condiciones de estrés por fuerza iónica**

Para cada una de las muestras sometidas a estrés por fuerza iónica se realizó un análisis HPLC-WCX para determinar las isoformas y la posible formación de ellas como se describe en la metodología. Se realizó la degradación forzada a diferentes fuerzas iónicas porque al variar el ambiente iónico en el que se encuentra la molécula se sospechaba que iba a favorecer los productos de degradación con diferente carga, esto significa la formación de isoformas con diferente truncamiento de lisina C-terminal; además que la adición de electrolitos a una suspensión es una estrategia de control de la carga superficial de una molécula, esto es muy relevante para la estabilidad de suspensiones.

En la tabla 7 presentada a continuación, se muestran los porcentajes de las ABC de cada una de las muestras analizadas en el estudio de degradación forzada.

Tabla 7. Porcentaje del área bajo la curva por cada condición de estrés por fuerza iónica

<b>Condición</b>	<b>Isoforma 1 %</b>	<b>Isoforma 2 %</b>	<b>Isoforma 3 %</b>
Control sin tratamiento	17.2	72.7	10.1
NaCl 10mM, t= 0 días	18.2	71.4	10.5
NaCl 10mM, t= 7 días	21.0	69.3	9.7
NaCl 10mM, t= 14 días	30.8	61.5	7.7
NaCl 10mM, t= 21 días	28.5	64.8	6.6
NaCl 10mM, t= 21 días	33.4	66.6	0.0
NaCl 70mM, t= 0 días	17.5	71.7	10.8
NaCl 70mM, t= 7 días	33.2	61.8	4.9
NaCl 70mM, t= 14 días	0.0	0.0	0.0
NaCl 70mM, t= 21 días	0.0	0.0	0.0
NaCl 70mM, t= 21 días	0.0	0.0	0.0

**Cromatograma HPLC-WCX de la formación de isoformas durante el estudio de degradación forzada por fuerza iónica 10mM a 37°C**

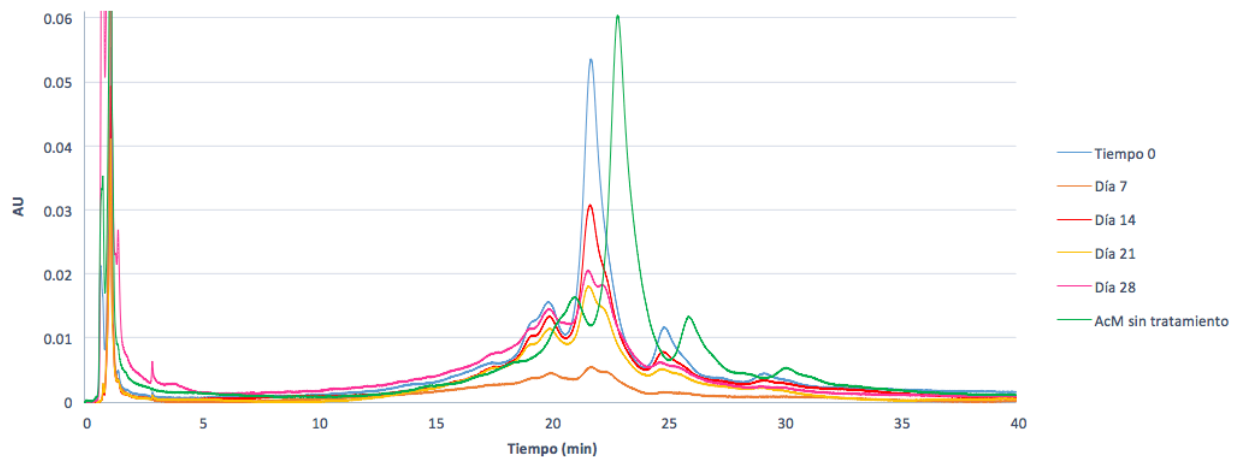
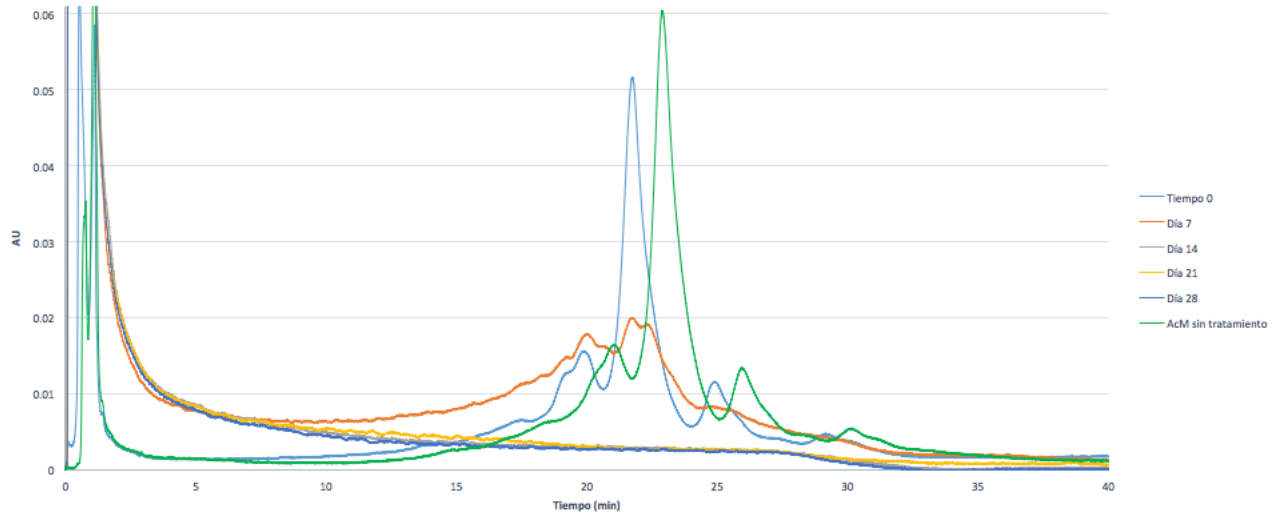


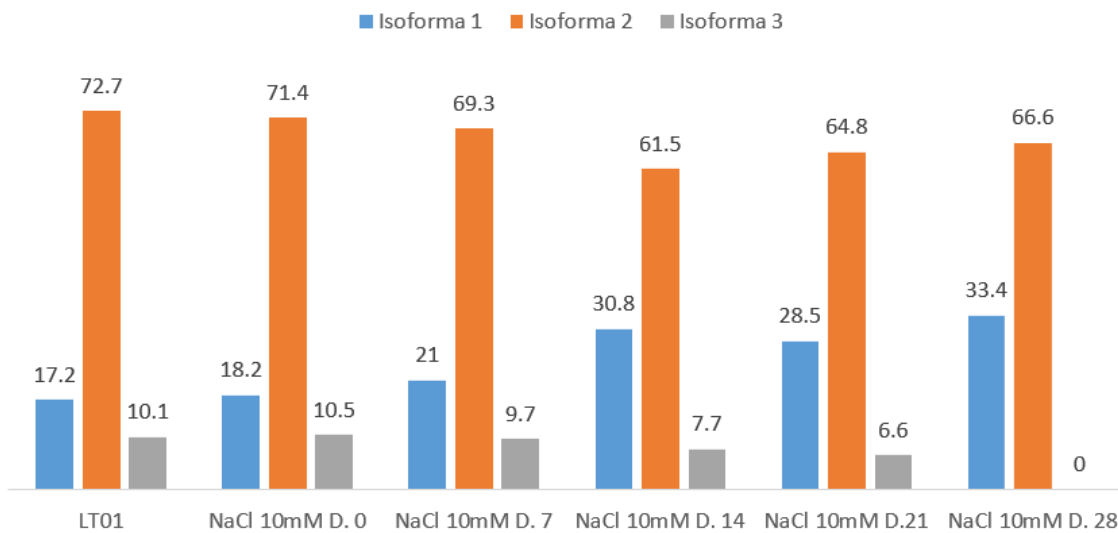
Figura 14. Cromatograma WCX de las muestras de degradación forzada por fuerza iónica 10mM a 37°C

**Cromatograma HPLC-WCX de la formación de isoformas durante el estudio de degradación forzada por fuerza iónica 70mM a 37°C**



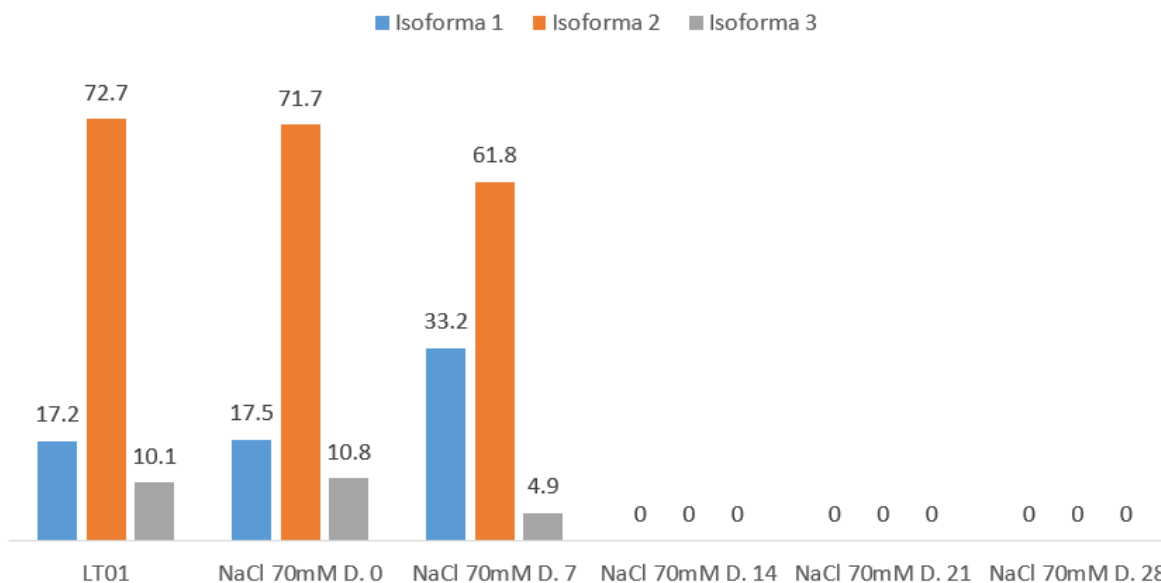
**Figura 15. Cromatograma WCX de las muestras de degradación forzada por fuerza iónica 70mM a 37°C**

Porcentajes del ABC de los diferentes picos obtenidos por HPLC-WCX para la degradación forzada con fuerza iónica 10mM de NaCl a 37°C



**Figura 16. Porcentajes de las áreas bajo la curva para degradación con fuerza iónica 10mM a 37°C**

Porcentajes del ABC de los diferentes picos obtenidos por HPLC-WCX para la degradación forzada con fuerza iónica 70mM de NaCl a 37°C



**Figura 17. Porcentajes de las áreas bajo la curva para degradación con fuerza iónica 70mM**

En este estudio de degradación forzada se puede observar a la condición de 10mM a 37°C (Figura 14) se pudo determinar el ABC durante los 28 días que duró el estudio. Se puede apreciar en las gráficas (Figura 16) que se ve una clara tendencia de disminución de los picos más básicos (picos dos y tres) y la formación de la especie más ácida (pico uno).

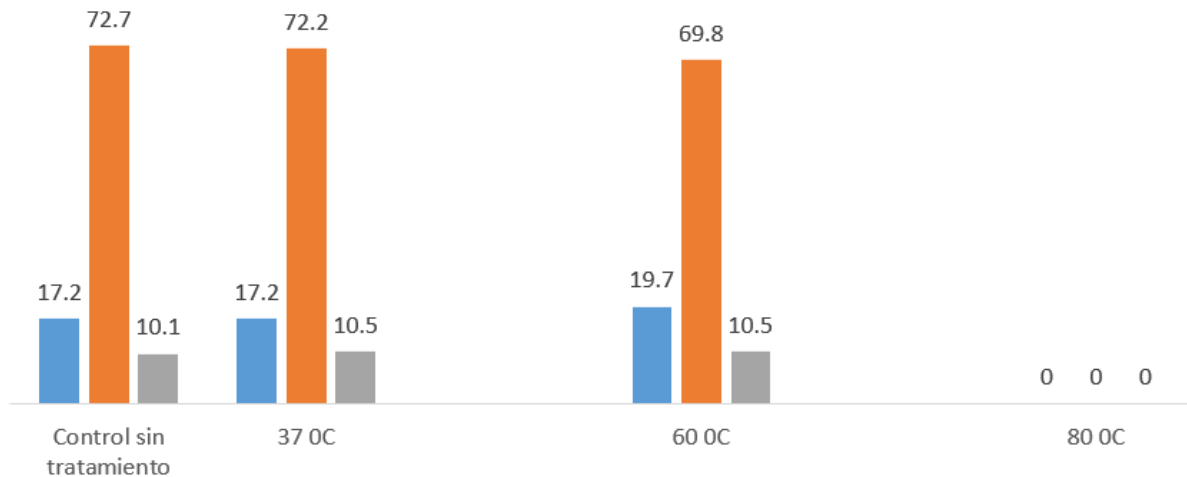
Por otro lado, en el estudio de degradación forzada en la condición de 70mM a 37°C (Figura 15) se pudo determinar el ABC solamente hasta el día 7 (figura 17) y al igual que en la condición de 10mM se observa una disminución del pico 3 y el aumento de la especie más ácida que corresponde al pico 1.

## **Análisis HPLC-WCX para cada una de las condiciones de estrés por temperatura**

Para cada una de las muestras sometidas a estrés por temperatura se realizó un análisis HPLC-WCX con el propósito de determinarlas isoformas presentes en el AcM de estudio y la posible formación de ellas. Las tres temperaturas fueron probadas con la finalidad de favorecer la degradación de la molécula y poder identificar sus productos de degradación. A continuación, en la tabla 8 y figura 18 se presentan los resultados.

*Tabla 8. Porcentaje del área bajo la curva por cada condición de estrés por temperatura*

<b>Condición</b>	<b>Isoforma 1</b> <b>%</b>	<b>Isoforma 2</b> <b>%</b>	<b>Isoforma 3</b> <b>%</b>
<i>Control sin tratamiento</i>	17.2	72.7	10.1
<i>37 °C</i>	17.2	72.2	10.5
<i>60 °C</i>	19.7	69.8	10.5
<i>80 °C</i>	0.0	0.0	0.0



**Figura 18. Porcentajes de las áreas bajo la curva para degradación por diferentes temperaturas**

Como se puede observar en la figura 18 el efecto de la temperatura a 37°C el porcentaje de las ABC se mantienen sin cambio con respecto a la muestra control, por otro lado, la muestra sometida a estrés por temperatura a 60°C fue similar a las demás condiciones de fuerza iónica y pH 7.3, donde aumenta el porcentaje del ABC de la fracción ácida (pico 1) y disminuyen los porcentajes del ABC de la fracción básica. Para el estrés por temperatura a 80°C no se pudo determinar el ABC.

## **Espectrometría de fluorescencia**

Con el propósito de observar los cambios conformacionales en la estructura terciaria del AcM a lo largo del estudio en las diferentes condiciones de estrés, se monitoreó el AcM por medio de la técnica de espectroscopía de fluorescencia. Se midió la misma muestra por triplicado y se obtuvieron los resultados que a continuación se presentan.

En la tabla 9 se muestran los dos controles utilizados en esta técnica. Como control positivo de desplegamiento se utilizó al AcM de estudio sometido a un tratamiento con cloruro de guanidinio 3M durante 8 horas a 37°C, como control de la muestra sin cambio en su plegamiento se utilizó el AcM de estudio almacenado en PBS a 2°C.

*Tabla 9. Muestras control para la técnica de fluorescencia*

<b>Longitud de onda (nm)</b>	<b>CME Guanidinio</b>	<b>CME LT01</b>
<b>280</b>	354.4 ±0.23	340.7 ±0.45
<b>295</b>	359.6 ±0.29	342.55 ±0.56

En la tabla 10 se muestran los cambios en el CME de las muestras del estudio de degradación forzada a pH 6.3 a 45°C. Como se puede observar, con el paso de los días la muestra va siguiendo una tendencia al aumentar el CME hasta el día 5, lo que sugiere que la proteína se despliega por completo hasta el día 5 bajo estas condiciones de degradación.

Tabla 10. Centros de masa espectral de la degradación por pH 6.3

**pH 6.3**

<b>Longitud de onda (nm)</b>	<b>CME Día 0</b>	<b>CME Día 3</b>	<b>CME Día 5</b>	<b>CME Día 8</b>	<b>CME Día 10</b>
<b>280</b>	340.7 ±0.23	374.1 ±0.23	386.7 ±0.24	385.5 ±0.22	386.54 ±0.15
<b>295</b>	342.0 ±0.4	383.8 ±0.13	391.8 ±0.14	393.1 ±0.18	392.4 ±0.15

En la tabla 11 se muestran los cambios en el CME de las muestras del estudio de degradación forzada a pH 7.3 a 45°C donde se observa que con el paso de los días la muestra va siguiendo una tendencia al aumentar el CME hasta el día 8. En el día 10, se obtuvo un valor muy similar al día 8 lo que puede significar que la proteína se desplegó por completo bajo estas condiciones de degradación y el valor del CME se vuelve constante.

Tabla 11. Centros de masa espectral de la degradación por pH 7.3

**pH 7.3**

<b>Longitud de onda (nm)</b>	<b>CME Día 0</b>	<b>CME Día 3</b>	<b>CME Día 5</b>	<b>CME Día 8</b>	<b>CME Día 10</b>
<b>280</b>	340.5 ±0.18	339.15 ±0.32	372.32 ±0.62	385.76 ±0.12	385.84 ±0.23
<b>295</b>	342.3 ±0.3	342.71 ±0.09	376.21 ±0.45	387.84 ±0.22	389.63 ±0.25

En la tabla 12 se muestran los cambios en el CME de las muestras del estudio de degradación forzada a pH 9.3 a 45°C donde podemos observar que a partir del día 3 se obtienen valores de CME similares al máximo valor obtenido en las otras condiciones



de degradación por pH, sin embargo, en este caso el valor del CME continúa aumentando hasta el día 8 donde a partir de este permanece constante, es decir la proteína se encuentra degradada por completo a estas condiciones de estrés.

Tabla 12. Centros de masa espectral de la degradación por pH 9.3

**pH 9.3**

<b>Longitud de onda (nm)</b>	<b>CME Día 0</b>	<b>CME Día 3</b>	<b>CME Día 5</b>	<b>CME Día 8</b>	<b>CME Día 10</b>
<b>280</b>	340.6 ±0.12	384.16 ±0.72	391.22 ±0.35	396.43 ±0.57	396.79 ±0.74
<b>295</b>	342.5 ±0.1	388.40 ±0.7	397.87 ±0.32	397.10 ±0.63	398.92 ±0.78

En la siguiente tabla (tabla 13) se muestran los cambios en el CME de las muestras del estudio de degradación forzada por fuerza iónica 10mM y 70mM de NaCl a 37°C. Para el caso de 10mM de NaCl se observa la tendencia de que CME permanece aumentando desde el tiempo 0 hasta el día 28 llegando a un punto máximo de  $\lambda_{280}=345.9$  y  $\lambda_{295}=347.1$ , que comparado con el control de desplegamiento positivo la proteína aún no está completamente desplegada. En el caso de 70mM de NaCl a 37°C el CME tiende a aumentar conforme pasan los días de estudio, esto se debe a la desnaturalización de la proteína bajo estas condiciones de estrés. Se puede observar que para esta condición de degradación el CME aumentó más que en la condición de 10mM de NaCl.

Tabla 13. Centros de masa espectral obtenidos por espectroscopía de fluorescencia para las muestras degradadas con fuerza iónica 10mM y 70mM de NaCl a 37°C.

<b>Condición</b>	<b>CME Tiempo 0</b>	<b>CME Tiempo 7</b>	<b>CME Día 14</b>	<b>CME Día 21</b>	<b>CME Día 28</b>
<b>Fuerza iónica 10mM <math>\lambda=280</math></b>	340.6 $\pm 0.19$	340.6 $\pm 0.51$	343.2 $\pm 0.72$	345.1 $\pm 0.39$	345.9 $\pm 0.23$
<b>Fuerza iónica 10mM <math>\lambda=295</math></b>	343.7 $\pm 0.29$	342.83 $\pm 0.35$	345.1 $\pm 0.63$	347.3 $\pm 0.56$	347.1 $\pm 0.14$
<b>Fuerza iónica 70mM <math>\lambda=280</math></b>	340.8 $\pm 0.18$	346.7 $\pm 0.66$	347.4 $\pm 0.13$	348.8 $\pm 0.11$	349.3 $\pm 0.73$
<b>Fuerza iónica 70mM <math>\lambda=295</math></b>	342.6 $\pm 0.23$	348.9 $\pm 0.42$	349.3 $\pm 0.17$	350.2 $\pm 0.12$	350.7 $\pm 0.42$

En la Tabla 14 se presentan los cambios en el CME de las muestras sometidas a degradación forzada durante 2 minutos a las temperaturas de 37°C, 60°C y 60°C. Como se puede ver la temperatura de 80°C fue en la que más aumentó el CME lo que sugiere que fue la condición en la que más desplegó la proteína debido a su degradación.

Tabla 14. Centros de masa espectral obtenidos por espectroscopía de fluorescencia para muestras sometidas a diferentes temperaturas de estrés.

	<b>Temperaturas de estrés</b>			
	<b>CME Tiempo 0</b>	<b>CME 37°C</b>	<b>CME 60°C</b>	<b>CME 80°C</b>
<b><math>\lambda= 280</math></b>	340.7 $\pm 0.43$	340.8 $\pm 0.35$	346 $\pm 0.27$	385 $\pm 0.45$
<b><math>\lambda= 295</math></b>	342.55 $\pm 0.45$	342.57 $\pm 0.27$	348 $\pm 0.32$	387 $\pm 0.39$

## Dispersión Dinámica de Luz

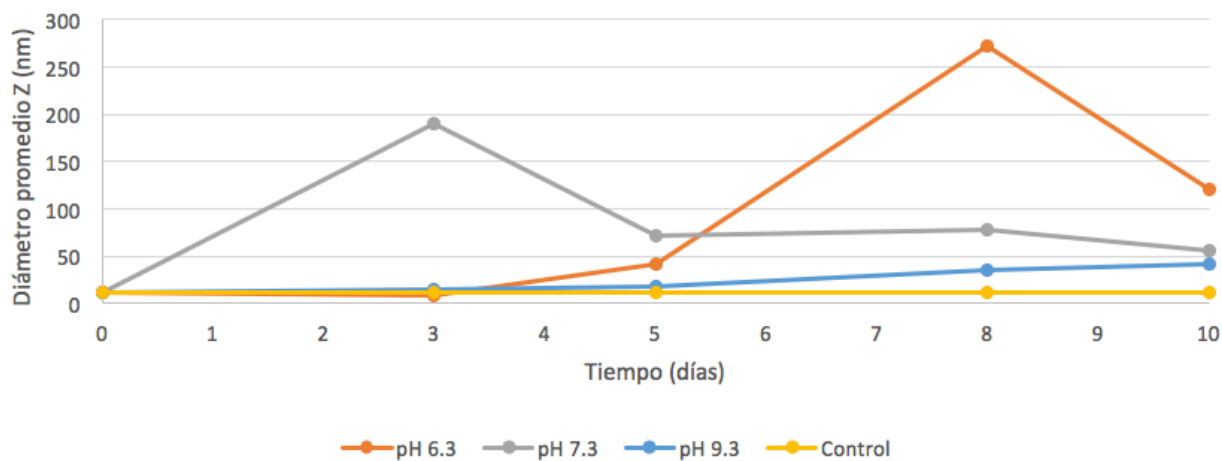
El diámetro promedio Z es el tamaño promedio de la partícula ponderado por la intensidad de la señal que recibe el equipo de los picos generados por los diferentes tamaños de partícula presentes en la muestra. Este parámetro es altamente sensible a la presencia de agregados ya que toma en cuenta la señal de todos los picos presentes en la muestra<sup>39</sup>. En la tabla 15 se muestran los diámetros promedio Z obtenidos del estudio de degradación forzada con pH, fuerza iónica y temperatura donde se encuentra la relación de la formación de agregados en función de estas condiciones de degradación.

Tabla 15. Tamaño de partícula medido por DLS para muestras de degradación por pH

<b>Muestra</b>	<b>Diámetro promedio Z (nm)</b> Día 0	<b>Diámetro promedio Z (nm)</b> Día 3	<b>Diámetro promedio Z (nm)</b> Día 5	<b>Diámetro promedio Z (nm)</b> Día 8	<b>Diámetro promedio Z (nm)</b> Día 10
<b>pH 6.3</b>	11.27	8.61	41.16	273	120
<b>pH 7.3</b>	11.27	190.6	72.31	78.16	56.03
<b>pH 9.3</b>	11.27	14.35	17.78	33.47	37.75

En la siguiente gráfica (figura 19) se muestra la variación del diámetro promedio Z con respecto al tiempo a diferente pH, donde se puede observar que en la muestra control se mantiene el diámetro promedio Z de 11.27nm durante todo el estudio, por otro lado,

a pH 9.3 se presentan agregados de menor tamaño (37.75nm) con respecto a los que se presentaron el día 3 a pH 6.3 (273nm) y el día 8 a pH 7.3 (190.6nm). En la figura 17 se puede observar que hay un aumento en el tamaño de los agregados a pH 6.3 y 7.3 y posteriormente vuelve a disminuir el diámetro promedio Z, esto se explica debido a que al preparar la muestra para poder ser leída en el Zetaziser es necesario resuspender la alícuota de la muestra estresada en un buffer de PBS filtrado y posteriormente agitar para homogeneizar el contenido de la muestra. Lo anterior puede favorecer que los multímeros que conforman los agregados comiencen a separarse para formar agregados de menor tamaño.



**Figura 19. Formación de agregados por degradación con diferente pH**

En el caso del aumento del diámetro promedio Z de las muestras degradadas por fuerza iónica (Tabla 16 y Figura 20) se observan diferentes tendencias de los agregados en las dos diferentes condiciones probadas durante 28 días. En la condición de 10mM de NaCl se tiene que el AcM de estudio se mantiene el diámetro de la molécula hasta el día 7 (11.13-11.14nm de diámetro), a partir de este día el diámetro de la molécula continúa aumentando con un diámetro máximo de 55.9nm para el día 28.

Por otro lado, se tiene la condición de 70mM de NaCl en donde de igual manera el diámetro promedio Z tiende a permanecer sin cambio hasta el día 7 (11.13-11.15 nm de diámetro) y posterior a este día el diámetro se mantiene aumentando. Para el día 21 el diámetro llega a los 52.9nm de diámetro lo que representa el máximo valor para la condición de 10mM y 28 llega hasta un máximo de 120.4nm de diámetro.

Tabla16. Tamaño de partícula medido por DLS para muestras de degradación por fuerza iónica

<b>Muestra</b>	<b>Diámetro promedio Z (nm)</b> Día 0	<b>Diámetro promedio Z (nm)</b> Día 7	<b>Diámetro promedio Z (nm)</b> Día 14	<b>Diámetro promedio Z (nm)</b> Día 21	<b>Diámetro promedio Z (nm)</b> Día 28
<b>FI 10mM</b>	11.13	11.14	14.90	40.7	55.9
<b>FI 70mM</b>	11.13	11.15	37.78	52.9	120.4

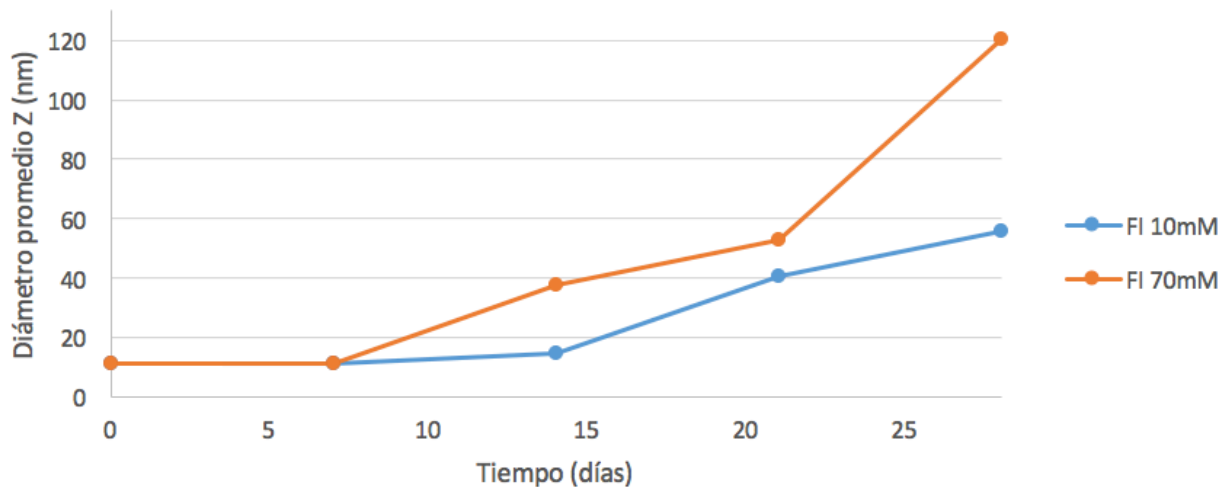


Figura20. Formación de agregados en el estudio de degradación forzada con fuerza iónica 10mM y 70mM de NaCl

Para el caso de las muestras degradadas con diferentes temperaturas (Tabla 17 y Figura 21) se tiene que conforme se aumenta la temperatura aumenta el diámetro promedio Z, lo que indica una posible relación directamente proporcional entre el aumento de temperatura y la formación de agregados, esto debido al posible plegamiento de la proteína<sup>40</sup>.

Tabla 17. Tamaño de partícula medido por DLS para muestras de degradación por temperatura

<b>Muestra</b>	<b>Diámetro promedio Z (nm)</b>
<b>37°C</b>	11.16
<b>60°C</b>	78.14
<b>80°C</b>	114.6

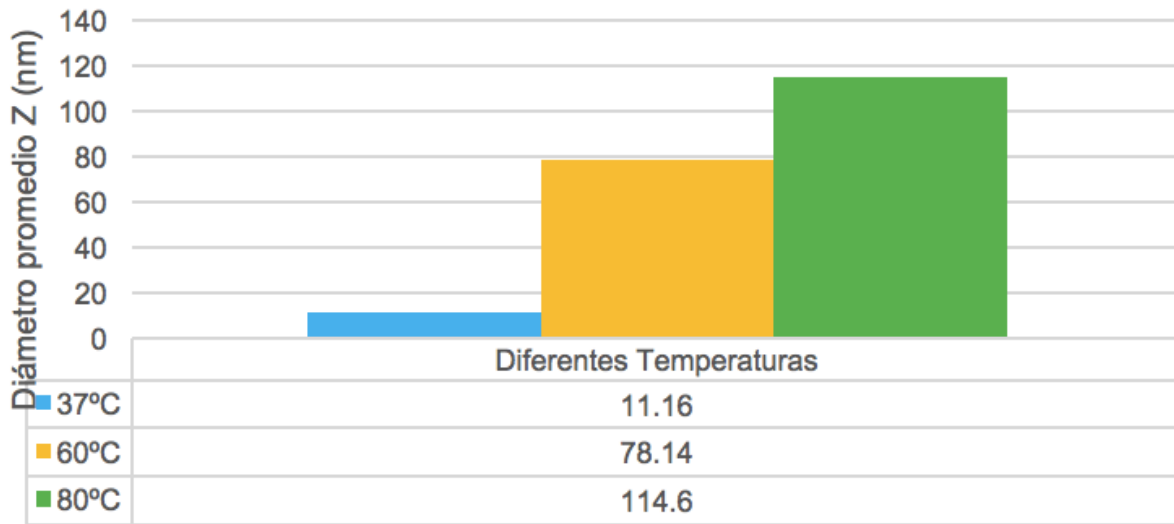


Figura 21. Formación de agregados en el estudio de degradación forzada con tres diferentes temperaturas

## Potencial Z

La carga superficial de las moléculas que se encuentran en una suspensión determina el nivel de agregación de las moléculas. Debido a que el anticuerpo se encuentra en suspendido en un buffer, las partículas coloidales están sometidas a fuerzas de atracción y repulsión y que existe un balance entre dichas fuerzas, si las fuerzas de atracción predominan, las partículas se aglomeran después de la colisión. En caso contrario, si las fuerzas de repulsión predominan las partículas permanecen separadas después de la colisión, en otras palabras, si el valor absoluto del potencial Z es pequeño (más cercano a cero) la energía potencial resultante es negativa tienden a agregarse con mayor rapidez las partículas en suspensión.

En la tabla 18, que se presenta a continuación, se observa la variación del potencial Z en función del pH. Es importante recordar que entre más cercano a cero se encuentre el valor absoluto del potencial Z, las moléculas presentes en la suspensión o coloide van a tender a agregarse más. Esta relación entre potencial Z y la formación de agregados se puede observar comparando los resultados del aumento del diámetro promedio Z con la variación del potencial Z a lo largo del estudio.

Tabla 18. Variación de carga de superficie debido a degradación con diferente pH

<b>Muestra</b>	<b>Potencial Z</b> Día 3	<b>Potencial Z</b> Día 5	<b>Potencial Z</b> Día 8	<b>Potencial Z</b> Día 10
<b>pH 6.3</b>	-13.7	-14.4	-13.4	-18.7
<b>pH 7.3</b>	-0.288	-0.170	-0.610	-0.703
<b>pH 9.3</b>	-11.9	-7.01	-13.2	-13.3

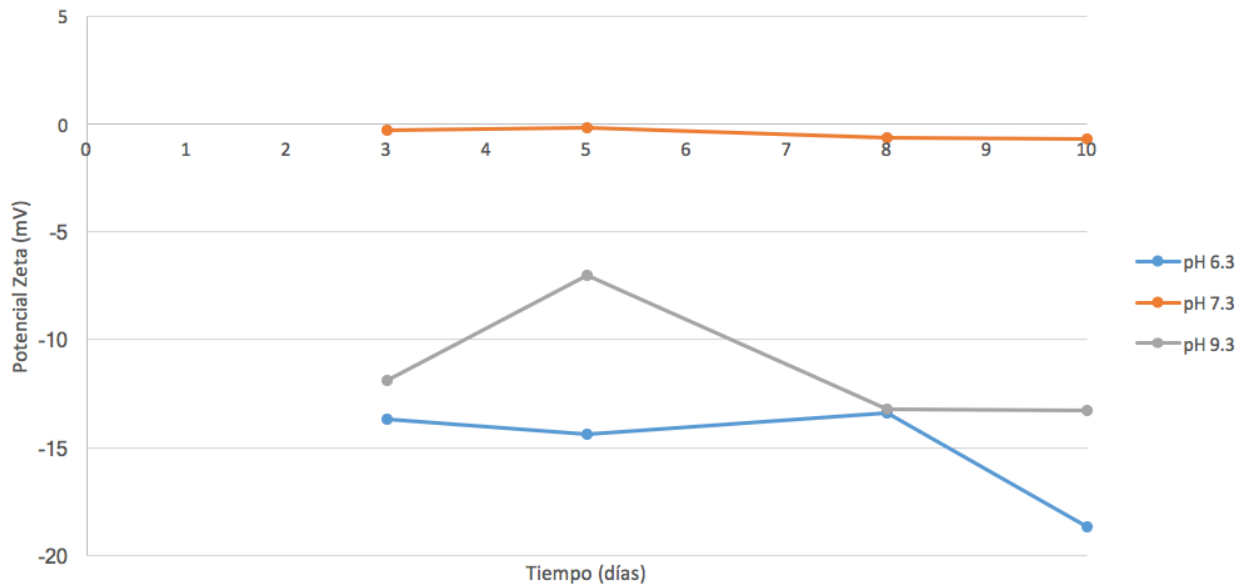


Figura22. Medición del potencial Z para las muestras de degradación por diferente pH

En el caso del estudio de degradación forzada con fuerza iónica y temperatura de 37°C (Figura 23) se obtuvo como resultado que con una fuerza iónica de 10mM de NaCl el valor absoluto del potencial Z es más grande que la condición de 70mM, es decir, que según la teoría de DLVO los agregados van a tender a formarse en menor proporción a



la condición de 10mM de NaCl. Este comportamiento de la formación de los agregados se puede corroborar observando la Tabla 19. Formación de agregados en el estudio de degradación forzada con fuerza iónica 10mM y 70mM de NaCl.

Tabla 19. Variación de carga de superficie debido a degradación con diferente fuerza iónica

<b>Muestra</b>	<b>Potencial Z</b> Día 7	<b>Potencial Z</b> Día 14	<b>Potencial Z</b> Día 21	<b>Potencial Z</b> Día 28
<b>FI 10mM</b>	-18.7	-15.9	-15.9	-14.9
<b>FI 70mM</b>	-9.64	-7.56	-8.29	-5.96

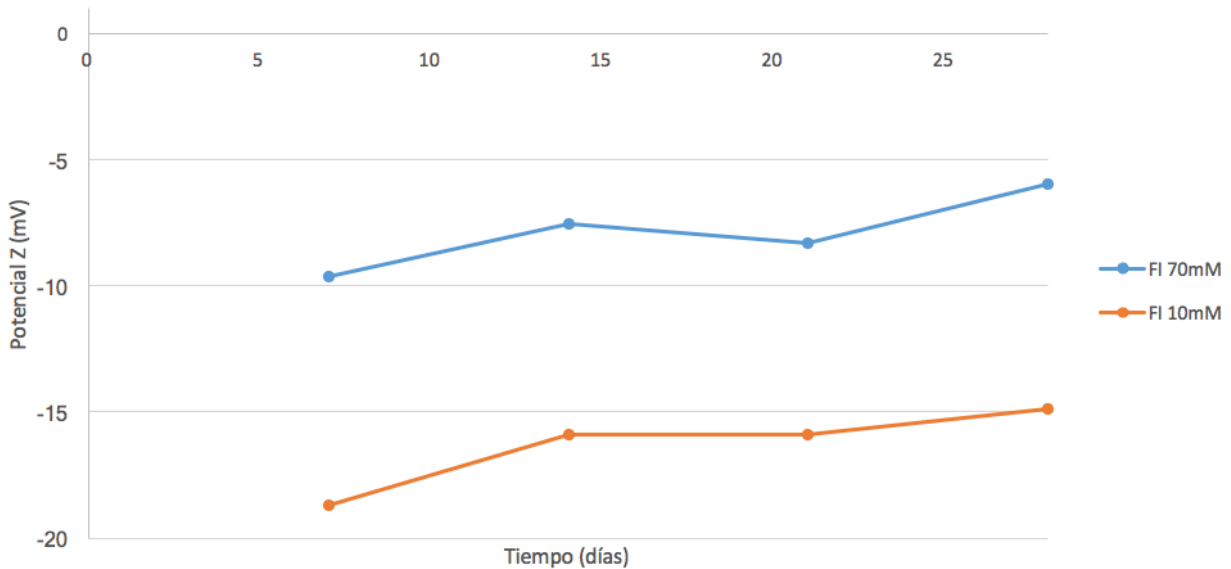


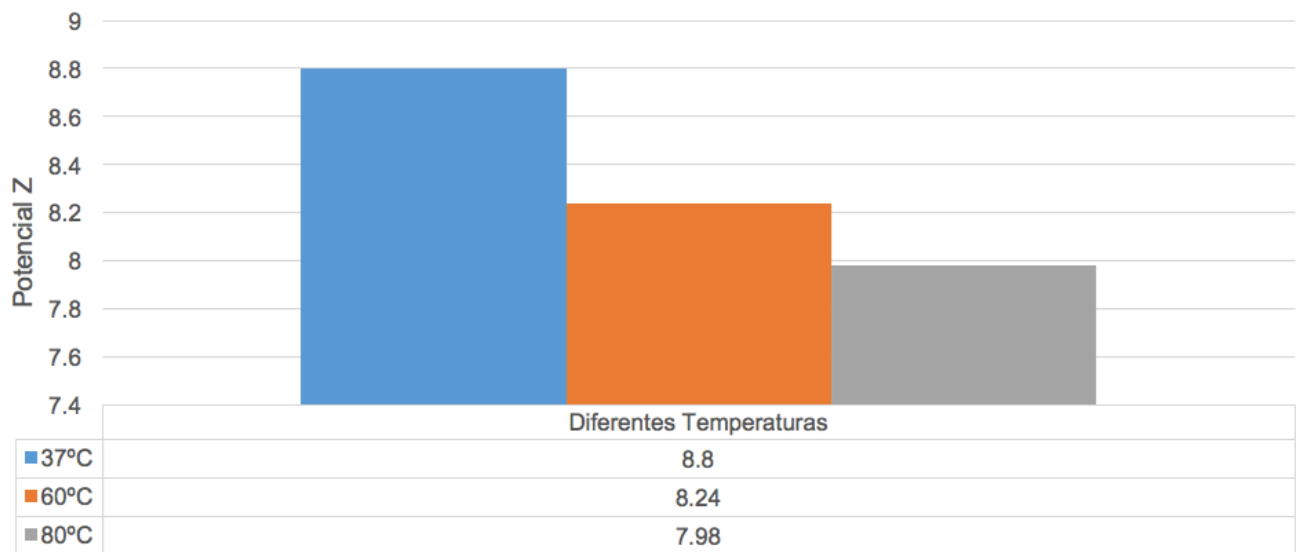
Figura 23. Potencial Z de las muestras degradadas por fuerza iónica a 10 y 70mM a 37°C donde se observa que el potencial Z en la condición de 10mM es más negativo, por lo que se espera menos formación de agregados.

En el estudio de degradación forzada con diferentes temperaturas (Figura 24) se observa una relación directamente proporcional entre el aumento de temperatura y la

disminución del potencial Z, lo que sugiere que a temperaturas más altas el AcM tiende a perder su carga y por lo tanto a agregarse. La gráfica de los diámetros promedio Z donde podemos ver el comportamiento de la formación de agregados es la Tabla 20. Formación de agregados en el estudio de degradación forzada con tres diferentes temperaturas.

Tabla 20. Variación de carga de superficie debido a degradación con diferentes temperaturas

<b>Muestra</b>	<b>Potencial Z</b>
<b>37°C</b>	-8.8
<b>60°C</b>	-8.24
<b>80°C</b>	-7.98



**Figura 24. Potencial Z de las muestras estresadas con diferentes temperaturas donde se puede observar una disminución del potencial cuando se aumenta la temperatura. Se tomaron los valores absolutos obtenidos en las mediciones del potencial Z.**

## 9 DISCUSIÓN

---

En cada una de las etapas del proceso de purificación fue analizado el AcM por HPLC-WCX, con la finalidad de detectar cambios en la proporción de las isoformas. Es importante analizar esto debido a que a lo largo de todo el proceso de purificación el AcM se somete a diferentes procesos de cromatografía, donde se encuentra en contacto con diferentes condiciones de pH, fuerza iónica y temperatura que pueden afectar en la pérdida de Lys C-terminal o inducir otras rutas de degradación<sup>41</sup>.

Una vez realizado el análisis HPLC-WCX de cada una de las etapas que conforman del proceso de purificación se encontró que, bajo las condiciones en las que se realiza la purificación, no se afecta la formación de isoformas, es decir, se mantiene estable durante este proceso.

Lo que respecta al estudio de degradación forzada a diferente pH, se observó que bajo las condiciones de degradación de pH a 7.3 y 45°C el porcentaje de las isoformas en el anticuerpo monoclonal de estudio cambió, aumentando las isoformas ácidas y disminuyendo las isoformas básicas. Asimismo, a diferencia de las condiciones de pH 6.3 y pH 9.3 a 45°C, se logró determinar el ABC hasta el día tres del estudio, lo que sugiere que, en estas condiciones, el AcM se degrada menos con respecto a las otras condiciones estudiadas (pH 6.3 y 9.3 a 45°) debido a que la estructura del AcM se conservó hasta el día tres y pudieron ser determinadas las proporciones de las isoformas.

Por otro lado, en el estudio de degradación por estrés con fuerza iónica, la mayor formación de especies ácidas se obtuvo con la condición de estrés por fuerza iónica a 10mM de NaCl, ya que al cambiar la fuerza iónica del medio donde se encuentra el anticuerpo las proporciones de las ABC comienzan a variar también como resultado de rutas de degradación que favorecen la formación de isoformas ácidas. Esto podría deberse a que existen en el ambiente las cargas necesarias para favorecer el truncamiento de la lisina C-terminal del AcM, lo explicaría en el caso de la degradación por fuerza iónica a 70mM, ya que al tener una fuerza iónica más alta se favorece el desprendimiento de la lisina C-terminal de una forma más rápida, y esto se puede observar en los cromatogramas, ya que al día 21 ya no se pudo determinar el área bajo la curva en el cromatograma.

En el caso del estrés por temperatura, se observó que también es un factor que favorece la formación de especies ácidas, ya que a la temperatura de 37°C se observó un cambio mínimo en la proporción de los porcentajes de las ABC; en contraste con la temperatura de 60°C, donde se determinó que la proporción de los porcentajes de la ABC cambió, dando lugar a la formación de isoformas ácidas. En el caso de la temperatura de 80°C no se pudo determinar el área bajo la curva debido a que, a esta temperatura, el AcM se encuentra ya totalmente desnaturalizado.

Con la finalidad observar cambios conformacionales en la estructura terciaria del AcM, las muestras fueron analizadas por la técnica de espectroscopía de fluorescencia. Se tomaron como controles una muestra del AcM de estudio sin tratamiento (control negativo de desplegamiento) y una muestra del AcM de estudio en una solución de cloruro de guanidinio 8M a 37°C durante 8 horas (control positivo de desplegamiento).

Como resultado se observó que en el estudio de degradación a diferente pH a 45°C la condición que más se desplegó el AcM fue a pH 9.3, seguida de pH 6.3 y finalmente 7.3, condición en la que también se pudo determinar por más días el ABC por la técnica de HPLC-WCX.

Para el estudio de degradación forzada con fuerza iónica a 10mM y 70mM de NaCl a 37°C se observó que en la condición de fuerza iónica a 70mM se vio favorecida la formación de variantes ácidas del AcM. Sin embargo, al momento de realizar el análisis por HPLC-WCX no se pudo cuantificar el ABC después del día 14, lo que sugiere que para este tiempo de muestreo el AcM está degradado de tal manera que no pudieron unirse los grupos funcionales que permiten hacer el intercambio catiónico en la columna.

En el caso de la degradación a diferentes temperaturas se determinó que a la temperatura de 37°C se mantiene sin cambio el CME y a la temperatura de 60°C el anticuerpo monoclonal comienza a desplegarse, pero aun conservando su estructura ya que al realizar el análisis HPLC-WCX se puede determinar el ABC. Sin embargo, en la temperatura de 80°C el anticuerpo se encuentra totalmente desplegado y no se pudo determinar el ABC en el análisis HPLC-WCX.

Las muestras sometidas a las diferentes condiciones de degradación también se les determinó el potencial Z con la finalidad de observar los agregados que se forman por medio de esta medición indirecta. Para el caso de la degradación a diferentes condiciones de pH a 45°C se obtuvo que a pH 6.3 y pH 9.3 el anticuerpo está más cargado y se pensaría que a estas condiciones el anticuerpo tiende a agregarse menos, sin embargo cabe destacar que el buffer donde se llevó a cabo la degradación a pH 6.3

es el buffer de formulación del AcM de referencia, por lo tanto tiene excipientes que aumentan la viscosidad y ayudan a que las moléculas que se encuentren en suspensión no tengan mucho contacto entre sí. Por otro lado, se tiene que a pH 7.3 la carga del AcM tiende a ser cero, ya que al estar cerca de su punto isoeléctrico, naturalmente, la carga de la proteína tiende a ser cero y agregarse más como se muestra en los resultados de los análisis hechos con la técnica de DLS.

## 10 CONCLUSIONES

---

- No se observaron cambios en el porcentaje de isoformas durante el proceso de purificación.
- Las isoformas ácidas parecen ser productos de degradación del AcM.
- Se determinó que a pH 6.3, el AcM se degrada más rápido que a pH 7.3 y pH 9.3.
- En las condiciones de pH 7.3 y 45<sup>0</sup>C el porcentaje de las isoformas en el AcM estudiado cambió, aumentando la isoforma 1 y disminuyendo las isoformas 2 y 3 variantes.
- A la condición de 70mM de NaCl y 37<sup>0</sup>C aumenta el porcentaje de la isoforma 1 y disminuye la isoforma 2.
- Se observó que a pH 9.3 el AcM estudiado se plegó más con respecto a las otras condiciones estudiadas.
- De acuerdo con la gráfica de DLS la formulación del producto de referencia ayuda a disminuir la formación de agregados.
- De acuerdo con el  $\zeta$  a pH 6.3 y 7.3 el anticuerpo tiende a agregarse menos.
- El anticuerpo tarda más en degradarse en las condiciones de pH 7.3 y a fuerza iónica de 10mM de NaCl.

## 11 PERSPECTIVAS

---

Realizar un estudio de degradación forzada evaluando el estrés por oxidación.



## 12 REFERENCIAS

---

- <sup>1</sup> Palomares L.A, Ramírez O.T. Glicosilación de las proteínas recombinantes: Importancia y relación con las condiciones de bioproceso. En. Juaristi E. Diseño y producción de fármacos. México, El Colegio Nacional. (2007). p. 95-123.
- <sup>2</sup> Decreto por el que se reforman y adicionan diversas disposiciones del Reglamento de Insumos para la Salud. Diario Oficial de la Federación. 19 octubre 2011.
- <sup>3</sup> Jeffrey J. Stewart. Putting a price on biotechnology. Nature Bioentrepreneur. (2001). 19: 813 – 817.
- <sup>4</sup> Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de fármacos y medicamentos así como de remedios herbolarios. Diario Oficial de la Federación. México 07 de junio de 2016.
- <sup>5</sup> Udpa, N. Monoclonal antibody biosimilars. Nature Drug Discovery. (2015). 15: 13-14.
- <sup>6</sup> Lonberg, N. Human antibodies from transgenic animals. Nature Biotechnology. (2005). 23,1117–1125.
- <sup>7</sup> Wang W, Wang Y, Wang D. Dual effects of Tween 80 on protein stability. International Journal of Pharmaceutics. (2008). 347,31–38.
- <sup>8</sup> Haimanti Dorai and Subinay Ganguly. Mammalian cell-produced therapeutic proteins: heterogeneity derived from protein degradation. Current Opinion in Biotechnology. (2014) 30:198–204
- <sup>9</sup> Hawe, et. al. Forced Degradation of Therapeutic Proteins, Journal of Pharmaceutical Sciences. (2012). 101: 895-913.
- <sup>10</sup> D.J. Kroon, A. Baldwin-Ferro, P. Lalan, Identification of sites of degradation in a therapeutic monoclonal antibody by peptide mapping, Pharmaceutical Research. 9 (1992) 1386–1393.
- <sup>11</sup> Pain H.R. Determining the fluorescence Spectrum of a Protein. Current Protocols in Protein Science. (2005). B: B3-B3.6.

---

<sup>12</sup> Tamizi, E. y Jouyban, A. Forced Degradation Forced degradation studies of biopharmaceuticals: Selection of stress conditions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. (2016). 98: 26-46.

<sup>13</sup> Karin Ahner et. al. Thermodynamic stability and formation of aggregates of human immunoglobulin G characterised by differential scanning calorimetry and dynamic light scattering. *Journal of biochemical and biophysical methods*. (2006). 66: 73-86.

<sup>14</sup> Kang Xuezheng, et al. Monoclonal antibody heterogeneity analysis and deamidation monitoring with high-performance cation-exchange chromatofocusing using simple, two component buffer systems. *Journal of Chromatography A*. (2013). 1283: 89-97

<sup>15</sup> Harris Reed J. Processing of C-terminal lysine and arginine residues of proteins isolated from mammalian cell culture. *Journal of Chromatography A*. (1995). 705. 129-134.

<sup>16</sup> Du et al. Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies. *mAbs*. (2012). 4:5, 578-585.

<sup>17</sup> Kleman M., Lavrentovich O.D. *Stability of Colloidal Systems. Soft Matter Physics: An Introduction. Partially Ordered Systems*. Springer, New York, NY. (2003).

<sup>18</sup> Remington, Farmacia, Tomo I, 19<sup>a</sup> ed. Editorial Médica Panamericana Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. (1998). pp: 837-873.

<sup>19</sup> Vincent Brian. Early (pre-DLVO) studies of particle aggregation. *Advances in Colloid and Interface Science* (2012) 170. 56-67

<sup>20</sup> Malvern Instrument, Inc. 2004. Potencial Zeta. Un curso completo en cinco minutos. Ed. Malver Inst. Catálogo Zeta-Meter. Westborough, MA 01581-1042, USA

<sup>21</sup> Blessy M, Ruchi D, Prajesh N. et al. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. (2014) 4(3):159-165.

<sup>22</sup> Parr, M. et al. Physicochemical characterization of biopharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. (2016). 130: 366-389.

<sup>23</sup> Krayukhina E, Uchiyama S, Nojima K, et al. Aggregation analysis of pharmaceutical human immunoglobulin preparations using size-exclusion chromatography and

---

analytical ultracentrifugation sedimentation velocity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. (2013) 115:104–110.

<sup>24</sup> Lorber. *Protein Analysis by Dynamic Light Scattering: Methods and Techniques for Students*. *Biochemistry and molecular biology education*. (2012). 40:372–382.

<sup>25</sup> Rao S, Woodruff A, Rey M, Flook K, Thayer J and Pohl C. DIONEX Thermo Sc. Separation of monoclonal antibodies by weak cation-exchange chromatography using ProPac and ProSwift columns. CA USA. (2010).

<sup>26</sup> Rea, JC, Wang, YJ, Moreno TG, Parikh, R, Lou Y and Farnan D. Monoclonal antibody development and physicochemical characterization by high performance ion exchange chromatography. *Innovations in Biotechnology*. (2012). 439-464.

<sup>27</sup> DIONEX Thermo Sc. Monitoring monoclonal antibody stability by cation-exchange chromatography. CA USA. (2016). Application Note 128.

<sup>28</sup> Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. (1970). 227: 680-685.

<sup>29</sup> Rustandi, Richard. Applications of CE SDS gel in development of biopharmaceutical antibody-based products. *Electrophoresis*. (2008). 29: 3612–3620.

<sup>30</sup> Fekete et. al. Analytical strategies for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies. *Trends in Analytical Chemistry*. (2013). 42: 74-83.

<sup>31</sup> Khawli et al. Charge in Variants in IgG1. *mAbs*. (2010). 2:6, 613–624.

<sup>32</sup> Jiang et al. Evaluation of Heavy-Chain C-Terminal Deletion on Product Quality and Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. (2016). 105:7, 2066-2071.

- 
- <sup>33</sup> Zhang LY et al. Use of chelating agents to improve the resolution and consistency of cation-exchange chromatography of monoclonal antibodies. *Journal of Chromatography A*. (2014). 1367:109–117.
- <sup>34</sup> Harris Reed J. et al. Identification of multiple sources of charge heterogeneity in a recombinant antibody. *Journal of Chromatography B*. (2001). 752. 233–245.
- <sup>35</sup> Do Guyn et al. Effects of carboxypeptidase B treatment and elevated temperature on recombinant monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography analysis. *Archives of Pharmaceutical Research*. (2016). 39:1472.
- <sup>36</sup> Sampieri, Roberto et al. *Metodología de la investigación*. 4<sup>a</sup> ed, México. Ed. Mc Graw Hill. México. (2006).
- <sup>37</sup> Herron, James N., Herron, James Ed., Crommelin, D. J. A. *Physical Methods to Characterize Pharmaceutical Proteins*. Springer. Pharmaceutical biotechnology. (1995)
- <sup>38</sup> Chen, Y., and Barkley, M. D. (1998) Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. *Biochemistry* 37, 9976–9982.
- <sup>39</sup> Lowe D, Dugeon K, Rouet R. Et al. Aggregation, Stability, and Formulation of Human Antibody Therapeutics. *Advances in protein chemistry and structural biology*. (2011) 84:41–6.
- <sup>40</sup> Sahin E, Adeola O, et al. Comparative Effects of pH and Ionic Strength on Protein–Protein Interactions, Unfolding, and Aggregation for IgG1 Antibodies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. (2010). 99:4830–4848.
- <sup>41</sup> Lou J, et al. Probing of C-Terminal Lysine Variation in a Recombinant Monoclonal Antibody Production Using Chinese Hamster Ovary Cells with Chemically Defined Media. *Biotechnology and Bioengineering*. (2012). 109: 2306-2315