

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FCA
Facultad de
Ciencias Agropecuarias

Departamento

TRABAJO DE DIPLOMA

Título: Influencia de los parámetros de purificación por cromatografía de afinidad en Proteína A en los atributos críticos de calidad del anticuerpo monoclonal anti-CD20

Autor : Elizabeth Pargas Ferrer

Tutores del trabajo: MSc. Anelis Quintana Cantillo

Dr. C. Katia Oiito Ramos

Santa Clara , junio 2019
Copyright©UCLV

UCLV
Universidad Central
"Marta Abreu" de Las Villas



FCA
Facultad de
Ciencias Agropecuarias

Academic Department

DIPLOMA THESIS

Title: Influence of purification parameters by affinity chromatography
on Protein A on the critical quality attributes of the anti-CD20
monoclonal antibody

Author: Elizabeth Pargas Ferrer

Thesis Director: MSc. Anelis Quintana Cantillo

Dr. C. Katia Ojito Ramos

Santa Clara, junio 2019
Copyright©UCLV

Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, y se encuentra depositado en los fondos de la Biblioteca Universitaria “Chiqui Gómez Lubian” subordinada a la Dirección de Información Científico Técnica de la mencionada casa de altos estudios.

Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

Atribución- No Comercial- Compartir Igual



Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830

Teléfonos.: +53 01 42281503-1419

UNIVERSIDAD CENTRAL “MARTA ABREU” DE LAS VILLAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



TESIS DE DIPLOMA

Influencia de los parámetros de purificación por cromatografía de
afinidad en Proteína A en los atributos críticos de calidad del
anticuerpo monoclonal anti-CD20

Autor: Elizabeth Pargas Ferrer

Tutor: MSc. Anelis Quintana Cantillo

Asesor: Dr. C. Katia Ojito Ramos

Anelis Quintana Cantillo: Centro de Inmunología Molecular / Departamento de Desarrollo
de Procesos / anelis@cim.sld.cu

Santa Clara, 2019

***“En la ciencia, no es la velocidad lo más importante. Es la dedicación,
el compromiso, el interés y la voluntad de saber algo y entenderlo”.***

Eugene Paul Wigner

A mis padres Elizabeth y Rogelio, por su magnífica educación, por sus sacrificios y consejos, por cultivar en mí el deseo de superación y la capacidad de soñar.

Agradezco a Dios que es el pilar de mi vida, por guiar mis pasos, por oír mis súplicas, porque todo lo que tengo y lo que soy lo debo a Él.

A mis padres por enseñarme a ser una mujer de bien, por mostrarme el valor del sacrificio, la responsabilidad y el estudio, por sus oraciones.

A mi hermano, Papo, por ser mi compañía, mi seguridad, mi mejor amigo.

A mi novio, Tilly, por apoyarme siempre, por consolarme en los momentos de angustia, por sus amorosos consejos, por ser el más cercano revisor de esta tesis, por sufrir junto a mí el tortuoso camino de la investigación.

A mis abuelos Finita, Ferrer y Rogelio por su preocupación y apoyo constante. En especial a mi abuela Antonia que hoy es su cumpleaños y aunque me dejó demasiado pronto sé que intercede por mí.

A mis suegros, que son los mejores, por confiar en mí.

A mi tutora Anelis, por dedicarme su tiempo, por regalarme sus conocimientos, porque sin ella esta investigación hubiese sido imposible.

A mi asesora Katia, por tanta dedicación, por invertir su tiempo en mí, por enseñarme a sembrar mis sacrificios, aún con lágrimas y sin alarde, porque todo sacrificio requiere una cuota de dolor y de sangre, pero toda sangre es redentora y toda lágrima es purificadora (Los cinco minutos de Dios)

A Idania y Adolfo, por abrirme las puertas del CIM y de su familia aún sin conocerme y sin recomendaciones, por confiar en mí, por tratarme como a una hija, no tengo cómo agradecerles la oportunidad que me han brindado.

A los trabajadores del Departamento de Desarrollo de Procesos y del Laboratorio de Analítica del CIM, por acogerme y responder atentamente a mis dudas. En especial a Leina y Betty por sacrificar su tiempo en los experimentos de mi tesis.

A los profesores de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, por contribuir a mi formación profesional.

A mi prima Lisset y su familia, por acogerme en su casa con tanto amor, por estar siempre dispuesta a ayudarme y por ser la más severa de las juezas con el Power Point.

A mi tía Nancy, por sus consejos siempre oportunos, por su preocupación constante.

A mis amigas (hermanas) de la beca: Celia, Jessy, Luidy, Elizabeth, Liana, Dary y Gissell: porque de ustedes aprendí a reír y llorar juntas, a que la amistad depende de la aceptación de las virtudes y carencias de los otros, porque junto a ustedes viví mis mejores años.

A mi familia de Camajuaní, en especial a Ernestina por sus atenciones y por tratarme como a una nieta más.

A todos los que me ayudaron con su trabajo o estuvieron orando para que esta investigación llegara a su fin con resultados satisfactorios.

Muchas gracias...

Resumen

El anticuerpo monoclonal anti-CD20 se utiliza para tratar enfermedades oncogénicas y autoinmunes con proliferación patológica de linfocitos B. El Centro de Inmunología Molecular obtuvo el biosimilar anti-CD20 1B8 (CimaBior®), pero se produjeron cambios aminoacídicos respecto al producto de referencia, esto lo invalidó para su comercialización. Por tanto, se desarrolló un nuevo biosimilar con el error corregido. Como parte del nuevo desarrollo, se determinó la influencia del pH y la molaridad de las soluciones de equilibrio y elución de la purificación por cromatografía de afinidad en Proteína A: a escala micro analítica en el recobrado y a escala de laboratorio en las propiedades físico-químicas como heterogeneidad de talla y cargas, estructura secundaria y terciaria. Se varió el pH y la conductividad de acuerdo a un diseño factorial para la purificación a escala micro analítica y a escala de laboratorio. Las propiedades físico-químicas se evaluaron mediante técnicas analíticas. Resultó que los rangos de estos parámetros que garantizan los atributos críticos de calidad del nuevo biosimilar fueron: pH 6,8–7,4 y molaridad 150 mM de la solución de equilibrio, y pH 3,25 para la de elución. A escala micro analítica, solo el pH de la solución de elución influyó significativamente en el recobrado. A escala de laboratorio, se determinó que a pH de elución inferior a 3,0 se formaron agregados de alto peso molecular y productos de degradación. El pH de la solución de elución influyó significativamente en el porcentaje de isoformas ácidas y en la estructura secundaria y terciaria del anticuerpo.

Palabras claves: anticuerpo monoclonal, biosimilar, Rituximab, CimaBior®

Abstract

Monoclonal antibody anti-CD20 is used to treat B-cell malignancies and B-cell mediated autoimmune diseases. The Center of Molecular Immunology obtained the biosimilar anti-CD20 1B8 (CimaBior®), but there were amino acid changes with respect to reference product; invalidating 1B8 (CimaBior®) for its marketing. Therefore, a new biosimilar was developed with the error corrected. As part of the process, the influence of pH and molarity of equilibrium and elution solutions of the purification by Protein A affinity chromatography, were determined. The influence on recovery was determined at the micro-analytical scale; whereas the influence on physico-chemical properties such as height and charge heterogeneity, secondary and tertiary structure, were determined at the laboratory scale. The pH and conductivity were varied according to a factorial design for purification at micro-analytical and laboratory scales. The physico-chemical properties were evaluated by analytical techniques. The ranges of these parameters, that guarantee the critical quality attributes of the new biosimilar, were: pH 6,8-7,4 and molarity 150 mM for the equilibrium solution, and pH 3,25 for the elution solution. At micro-analytical scale, only the pH of elution influenced significantly in the recovery. At laboratory scale, high molecular weight aggregates and degradation products were formed with the pH of elution lower than 3,0. The pH of elution influenced significantly in the percentage of acid isoforms and the antibody secondary and tertiary structures.

Keywords: monoclonal antibody, biosimilar, Rituximab, CimaBior®