

**Caracterización de la Degradación de
Rituximab por Efecto de la Luz**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

Maestría en Farmacia

PRESENTA:

QBP. Miriam Silvia Cedillo Robles

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Angélica Meneses Acosta

CODIRECTOR DE TESIS

Dr. Néstor Octavio Pérez Ramírez

CUERNAVACA, MORELOS Noviembre de 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

Cuernavaca, Morelos a 8 de septiembre de 2022
Folio: FF/M/SI/ CIP /MF/108/2022

**M. C. MIRIAM SILVIA CEDILLO ROBLES
ALUMNA DE MAESTRÍA EN FARMACIA**

PRESENTE

Por este medio le informo que el Consejo Interno de Posgrado (CIP), en su Sesión Ordinaria del 7 de septiembre de 2022, designó a los siguientes sinodales como integrantes de la Comisión Revisora y Jurado para la tesis titulada “**Caracterización de la degradación de Rituximab por efecto de la luz**”:

Sinodal

Presidente	Dr. Jesús Rivera Islas	Facultad de Farmacia-UAEM
Secretario	Dr. Erick Ayala Calvillo	Facultad de Farmacia-UAEM
Vocal 1	M. C. Liliana Joachín Rodríguez	PROBIOMED S.A. de C.V.
Suplente 1	Dr. Sergio Alcalá Alcalá	Facultad de Farmacia-UAEM
Suplente 2	Dr. Néstor Octavio Pérez Ramírez	PROBIOMED S.A. de C.V.

Se le solicita entregar el manuscrito de tesis para revisión a esta comisión y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Nota (Art. 74 RGEP-UAEM): Los sinodales tendrán un plazo máximo de 20 días hábiles contados a partir de la recepción del documento para entregar los comentarios de la revisión y para emitir un voto aprobatorio o negatorio. En caso de condicionar el voto a la entrega de un documento en el que el tesista deberá solventar lo revisado, este contará con un plazo no mayor a 20 días hábiles, contados a partir de la notificación del primer dictamen emitido, para integrar las correcciones señaladas, una vez fenecido dicho plazo el sinodal emitirá el voto aprobatorio o negatorio que corresponda.

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Por una humanidad culta

Una universidad de excelencia

Dr. Sergio Alcalá Alcalá

Jefe del Posgrado en Farmacia

ccp: archivo.

Dr. Jesús Rivera Islas; Dr. Erick Ayala Calvillo; M. C. Liliana Joachín Rodríguez; Dr. Sergio Alcalá Alcalá; Dr. Néstor Octavio Pérez Ramírez

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México. C.P. 62209, Edificio 61, ala C, 2° piso.
Tel. (777) 329 7000, Ext. 7986 Jefatura de Posgrado en Farmacia, posgrado_ff@uaem.mx



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del laboratorio de Investigación y Desarrollo de Probiomed, S.A. de C.V, bajo la codirección del Dr. Néstor Octavio Pérez Ramírez y de la Dra. Angélica Meneses Acosta.

La parte académica se desarrolló bajo el programa de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos con vinculación a la Industria Farmacéutica.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Angélica Meneses Acosta porque nunca dejó que mi ánimo decayera, porque sus palabras de aliento incentivaron mis ganas de llegar al objetivo.

Al Dr. Néstor O. Pérez por darme la oportunidad de realizar este proyecto en su laboratorio, por su apoyo y consejos en el trayecto de estos dos años.

A mis sinodales por el tiempo que han invertido, observaciones y correcciones que me han realizado para enriquecer el proyecto.

Al Ing. Jaime Uribe Wiechers por su confianza y apoyo para hacer uso de las instalaciones de Probiomed, agradecida por el impulso a mi carrera profesional y proyecto de vida personal.

Al Dr. Víctor Pérez porque con su apoyo y consejos es que puedo concluir este proyecto.

A mis compañeros de maestría (Juan José, Dulce, Carlos, Diana y Apolo) y de **Laboratorio AMA**, que me apoyaron a lo largo de este tiempo, dándome consejos y motivándome para continuar siempre hacia adelante. Con ustedes como inspiración, fue más sencillo.

DEDICATORIA

A mi mamá, Martha Robles Escobar, a quien Dios llamó a su encuentro. Su luz, consejos y ejemplo me acompañan, cuando he sentido flaquear, sus recuerdos me fortalecen. Por siempre en mi corazón.

A mi papá, Julián Cedillo, su fortaleza de espíritu, disciplina y trabajo han sido mi ejemplo y guía.

A mi hijo. Josué Karim, me inspiras más de lo que imaginas, tu alegría, capacidad de asombro y esfuerzo, son un motor en mi vida y mi bendición.

A ti Octavio Escamilla, por tu apoyo incondicional, por tolerar mis momentos difíciles y por compartir los alegres. Los retos son más llevaderos a tu lado.

A mi amada familia, cuyo cobijo me protege. Han sido y son, fuente de amor, energía y de recordarme lo que es importante en la vida; y sin duda ustedes los son.

A mis amigos Margarita Campos, Oscar Sánchez, Alberto Díaz, Olga Flores, Luis Vázquez, Mariana Bolívar y Socorro Durán, los quiero.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	14
1. ABSTRACT.....	16
2. INTRODUCCIÓN.....	18
2.1. MEDICAMENTOS BIOTECNOLOGICOS.....	19
2.1.1. Definición	19
2.1.2. Características de los medicamentos biotecnológicos	20
2.1.3 Marco legal: la regulación de los medicamentos biotecnológicos	22
2.2. ANTICUERPOS MONOCLONALES	23
2.2.1. Definición	23
2.2.2. Estructura.....	24
2.2.3. Nomenclatura.....	27
2.2.4. Obtención	28
2.2.5. Tecnologías para la producción de anticuerpos monoclonales por medio de hibridomas	29
2.2.6. Producción de anticuerpos terapéuticos por ingeniería genética	30
2.3. DESCRIPCIÓN DE RITUXIMAB	30
2.3.1. Procedimiento de obtención y características	30
2.3.2. Mecanismo de acción	35
2.3.3. Aplicaciones.....	36
2.3.4. Efectos adversos	37
2.3.5. Forma farmacéutica. Composición y excipientes.....	37
2.4. ESTABILIDAD EN MEDICAMENTOS DE USO HUMANO.....	38
2.4.1. Definición	38
2.4.2. Tipos de estudio	38
2.4.3. Regulación	39
2.5. FOTOESTABILIDAD	41
2.5.1. Luz Solar.....	43
2.5.2. Luz Visible	43
2.5.3. Luz Ultravioleta	45
2.6. TÉCNICAS PARA EVALUACIÓN DE MOLÉCULAS FOTOSENSIBLES RESULTANTES	47

2.6.1. Abs ₃₂₀ nm.....	47
2.6.2. Potencial zeta.....	47
2.6.3. Fluorimetría diferencial de barrido (DSF).....	48
2.6.4. Cromatografía CEX-UPLC.....	49
2.6.5. Potencia Biológica por Citólisis Dependiente de Complemento (CDC)...	49
2.6.6. Dispersión de luz dinámica (DLS).....	49
3. ANTECEDENTES.....	50
3.1. FOTOESTABILIDAD EN PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS.....	50
4. JUSTIFICACIÓN.....	52
5. HIPÓTESIS.....	52
6. OBJETIVOS.....	52
6.1. General.....	52
6.2. Objetivos específicos.....	52
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	53
7.1. EXPOSICIÓN DE RITUXIMAB A LA LUZ SOLAR DIRECTA A TRAVÉS DE VENTANA.....	54
7.2. EXPOSICIÓN DE RITUXIMAB A LA LUZ SOLAR DIFUSA A TRAVÉS DE UNA VENTANA.....	54
7.3. EXPOSICIÓN DE RITUXIMAB A LA LUZ EN CONDICIONES ICH.....	55
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
8.1. Reactivos y materiales usados.....	57
8.2. Métodos.....	58
8.2.1. Absorbancia a 320 nm.....	58
8.2.2. Potencial Zeta.....	59
8.2.3. Fluorimetría de barrido diferencial (DSF).....	59
8.2.4. Cromatografía de intercambio iónico (CEX-UPLC-FLR).....	60
8.2.5. Actividad CDC.....	61
8.2.6. Dispersión de luz dinámica.....	63
9. RESULTADOS.....	64
9.1. Absorbancia a 320 nm.....	65
9.2. Potencial Zeta.....	68
9.3. Fluorimetría diferencial de barrido (DSF).....	72
9.4. Cromatografía de intercambio iónico (CEX-UPLC-FLR).....	76

9.5. Actividad CDC	81
9.6. Dispersión de luz dinámica	85
10. DISCUSIÓN.....	88
11. CONCLUSIONES	91
12. PERSPECTIVAS	91
13. REFERENCIAS	93
14. ANEXO	101
14.1. Artículo: Photodegradation of Rituximab and Critical Evaluation of Its Sensibility to Electromagnetic Radiation	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Molécula de Inmunoglobulina.....	26
Figura 2. Tipos de anticuerpos e inmunoglobulinas	27
Figura 3. Nomenclatura de anticuerpos monoclonales.....	28
Figura 4. Modelo molecular del fármaco Rituximab	31
Figura 5. Rituximab 3D	32
Figura 6. Diagrama de estructura de rituximab	¡Error! Marcador no definido.
Figura 7. Rituximab es el anticuerpo monoclonal anti-CD20 de los linfocitos B.....	35
Figura 8. Etapas en el desarrollo de un producto farmacéutico en que se realizan pruebas de estabilidad	39
Figura 9. El Espectro electromagnético	44
Figura 10. Fotooxidaciones, fotodregadaciones en proteínas. Sun Protection in Man, P.U. Giacomoni, 2001 Elsevier Science B.V	50
Figura 11. Estrategia de fotoexposición de las muestras de rituximab	53
Figura 12. Luxómetro digital Benentech. Mod. Gm1020 Rango 0~200,000 Lux.....	54
Figura 13. Medidas del módulo de fotoestabilidad	56
Figura 14. Fotoexposición de muestras de rituximab en condiciones mencionadas en la ICH	56
Figura 15. Espectrofotómetro Beckman.....	58
Figura 16. Analizador de potencial Z Mobius	59
Figura 17. Perfiles de radiación solar indirecta.....	64
Figura 18. Resultados de Abs 320 en muestras de Rituximab fotoexpuestas	66
Figura 19. Gráfico de caja y bigotes, resultados de absorbancia a 320 nm.....	67
Figura 20. Gráfico de Potencial Z en muestras de Rituximab fotoexpuestas con envase secundario	70
Figura 21. Gráfico de Potencial Z en muestras de Rituximab fotoexpuestas.....	70
Figura 22. Gráfico de Potencial Z en muestras control.....	71

Figura 23. Resultados de potencial Z en muestras de Rituximab fotoexpuestas.....	71
Figura 24. Gráfico de DSF en muestras de Rituximab fotoexpuestas con envase secundario	72
Figura 25. Gráfica de DSF en muestras de Rituximab fotoexpuestas	72
Figura 26. Gráfica de DSF en muestras control	73
Figura 27. Resultados de la Fluorometría diferencial de barrido en muestras de Rituximab fotoexpuestas	74
Figura 28. Gráfico de caja y bigotes, resultados de la Fluorometría diferencial de barrido	75
<i>Figura 29. Respuesta del blanco en la Cromatografía de intercambio iónico en muestras de Rituximab fotoexpuestas.....</i>	<i>76</i>
Figura 30. Muestras de rituximab estresadas con Luz	77
Figura 31. Muestras de rituximab sin Luz.....	79
Figura 32. Dos horas en luz solar directa (peor caso)	81
Figura 33. Dos horas en luz solar difusa	82
Figura 34. Control	82
Figura 35. Resultados de potencia biológica en muestras de Rituximab fotoexpuestas ...	83
Figura 36. Gráfico de caja y bigotes, resultados de actividad biológica por CDC	84
Figura 37. Gráfico de DLS en muestras de Rituximab fotoexpuestas con envase secundario	86
Figura 38. Gráfico de DLS en muestras de Rituximab fotoexpuestas	87
Figura 39. Gráfico de DLS en muestras control	87
Figura 40. Resultados de Mediciones de DLS de muestras de Rituximab irradiado.....	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características técnicas	34
Tabla 2. Antecedentes de Rituximab	34
Tabla 3. Relación de aplicaciones de Rituximab	36
Tabla 4. Subtipos de rayos ultravioleta según su longitud de onda	46
Tabla 5. Datos del producto fotoexpuesto	55
Tabla 6. Condiciones de exposición de rituximab a la luz solar directa y difusa a través de ventana	65
Tabla 7. Resultados de Abs _{320 nm} en muestras de Rituximab fotoexpuestas	66
Tabla 8. Resultados de Abs ₃₂₀ en muestras de Rituximab fotoexpuestas	67
Tabla 9. Resultados de potencial Z en muestras de Rituximab fotoexpuestas con envase secundario	69
Tabla 10. Resultados de potencial Z en muestras de Rituximab fotoexpuestas	69
Tabla 11. Resultados de potencial Z en muestras control	69
Tabla 12. Resultados de la Fluorimetría diferencial de barrido en muestras de Rituximab fotoexpuestas	73
Tabla 13. Resultados de la Fluorimetría diferencial de barrido en muestras de Rituximab fotoexpuestas	74
Tabla 14. Adecuabilidad en la Cromatografía de intercambio iónico en muestras de Rituximab fotoexpuestas	76
Tabla 15. Determinación de isoformas en muestras de Rituximab estresadas con luz	78
Tabla 16. Determinación de isoformas en muestras de Rituximab sin luz	80
Tabla 17. Resultados de potencia biológica en muestras de Rituximab fotoexpuestas	83
Tabla 18. Resultados de potencia biológica en muestras de Rituximab fotoexpuestas	84
Tabla 19. Resultados de DLS en muestras de Rituximab fotoexpuestas con envase secundario	85
Tabla 20. Resultados de DLS en muestras de Rituximab fotoexpuestas	85
Tabla 21. Resultados de DLS en muestras control	86
Tabla 22. Resultados de mediciones de DLS de muestras de Rituximab irradiado	86

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo grado analítico
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de células
ADPC	Citotoxicidad celular inductora de fagocitosis
CD20	Grupo de diferenciación para unir linfocito número 20
CDC	Citotoxicidad celular dependiente del complemento
CDR	Regiones determinantes de complementaridad
CEX	Cromatografía de intercambio iónico
CHMP	Comité de Medicamentos para Uso Humano
CHO	Células de ovario de hámster chino
DLBCL	Linfoma difuso de linfocitos B grandes
DLS	Dispersión de luz dinámica
DSF	Fluorimetría diferencial de barrido
DTT	Ditiotreitol
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
FDA	Agencia Federal para Administración de Medicamentos y Alimentos.
ICH	Conferencia Internacional sobre Armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano
Ig	Inmunoglobulinas
kDA	Kilodaltones
mAB	Anticuerpo monoclonal
MES	Etanosulfónico
NOM	Norma Oficial Mexicana

PEG	Polietilenglicol
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
RTX	Rituximab
SDL	Radiación solar directa
T_m	Temperatura media
UPLC	Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento
UV	Ultravioleta

1. RESUMEN

El Rituximab administrado por vía intravenosa fue el primer mAb terapéutico que se utilizó contra el cáncer. Este anticuerpo monoclonal tiene actividad para unir linfocitos a través de su grupo de diferenciación número 20 (por sus siglas en inglés CD20), el cual se usa actualmente para tratar casi todos los tipos de linfomas no Hodgkin. Al unirse, Rituximab induce la muerte de los linfocitos B, activando los mecanismos de defensa del sistema inmunitario, como la citotoxicidad celular dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés), dependiente de células (ADCC, por sus siglas en inglés) e inductora de fagocitosis (ADPC, por sus siglas en inglés).

La conservación adecuada de los medicamentos es un requisito imprescindible para que estos mantengan sus propiedades físico-químicas y farmacológicas. Los biofármacos fotosensibles son un grupo de sustancias biológicas que por sus características fisicoquímicas necesitan conservarse protegidas de la luz. Se puede decir que el envase primario y secundario desempeña un papel importante en la protección de los biofármacos además de ser la forma farmacéutica la que se somete a dicho estrés radiativo.

En particular para Rituximab se sabe que dentro de su envase secundario es estable durante 24 meses a temperatura de 2-8 °C; que las soluciones diluidas son estables a 2-8 °C durante 24 horas y a temperatura ambiente durante 24 horas adicionales si no se ha roto la esterilidad del producto.

En este trabajo caracterizamos algunas foto-degradaciones del Rituximab por efecto de la radiación UV y visible. Las cuales nos pueden proporcionar información para optimizar las fórmulas para el medicamento, mejorando los esquemas inmunoterapéuticos y superar las reacciones observadas en algunos pacientes, finalmente optimizando su seguridad y eficacia.

Para ello se realizó la fotoexposición de Rituximab formulado en tres condiciones que incluyeron:

- Exposición de Rituximab a la luz solar directa, a través de ventana A una iluminación con exposición directa al sol con una irradiación de 280-400 nm (UVB 280-320 y UVA 320-400), por un tiempo de 1 y 2 h, de 8°C a aprox. 37.5 - 39 °C. Se expuso un control obscuro (protegido con envase secundario).

- Exposición de Rituximab a la luz solar difusa a través de una ventana, A una iluminación con exposición indirecta al sol a 10 cm y 1 m de distancia de una ventana, con una irradiación de 300-800 nm (UVB y UVA), por un tiempo de 1 y 2 h, de 8°C a aprox. 1 y 2 h, 8 °C a aprox. 23 - 24°C.
- Exposición de Rituximab a la luz en condiciones ICH, exponiendo Rituximab formulado en un medicamento, a una iluminación total de 1.2×10^6 lux-hora de luz en el rango visible y a una irradiación integrada de energía en ultravioleta cercano de 200 watts-h/m², manteniendo la cámara de fotoestabilidad permanentemente dentro de una cámara fría a $5 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$.

Una vez realizadas las fotoexposiciones se hicieron mediciones fisicoquímicas (Abs_{320} nm, Potencial zeta, Fluorimetría Diferencial de Barrido (DSF), Cromatografía de intercambio iónico (CEX-UPLC-FLR), Dispersión de Luz Dinámica (DLS) y biológicas (Potencia biológica por Citólisis dependiente de complemento (CDC) que permitieron dilucidar el efecto provocado por cada condición.

Los resultados muestran que solo la exposición a la luz solar directa durante la exposición en el peor de los casos (2 h), aumenta los agregados, la disminución de Tm y disminución de CDC que se correlaciona con análisis fisicoquímicos. Mientras que la exposición de la sala de luz interior y las condiciones de ICH no tienen ninguna contribución a la fotooxidación de Rituximab medida por estos métodos analíticos fisicoquímicos y biológicos. ^[1]

Estos resultados indican que la administración de Rituximab por perfusión / infusión es segura, mientras que el biológico no esté expuesto a la luz solar directa por tiempos prolongados.

1. ABSTRACT

Intravenously administered Rituximab was the first therapeutic mAb to be used in the field of oncology. This monoclonal antibody has activity to bind lymphocytes through its cluster of differentiation number 20 (CD20), and is now used to treat almost all types of non-Hodgkin's lymphoma. When Rituximab binds to CD20, induce the lysis of B lymphocytes, activating the defense mechanisms of the immune system, such as complement-dependent cytotoxicity (CDC), antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC), and antibody dependent phagocytosis celular (ADPC).

The proper storage of medicines is an essential requirement for them to maintain their physical-chemical and pharmacological properties. Photosensitive biopharmaceuticals are a group of biological substances that, due to their physicochemical characteristics, need to be kept protected from light. We can say that the primary and secondary packaging play an important role in the protection of biopharmaceuticals, in addition to being the pharmaceutical form that is subjected to said radiative stress.

In particular for Rituximab, it is known that within its secondary packaging it is stable for 24 months at a temperature of 2-8 °C; Diluted solutions are stable at 2-8°C for 24 hours and at room temperature for an additional 24 hours if product sterility has not been broken.

In this work we characterize some photo-degradations of Rituximab due to the effect of UV and visible radiation. Which can provide us with information to optimize formulas, to improve immunotherapeutic schemes and overcome the adverse reactions observed in some patients, and thus improve its efficacy and safety.

For this purpose, formulated Rituximab was photoexposure under three conditions that included:

- Exposure of Rituximab to direct sunlight, through a window A lighting with direct exposure to the sun with an irradiation of 280-400 nm (UVB 280-320 and UVA 320-400), for a period of 1 and 2 h. , from 8°C to approx. 37.5 - 39°C. A dark control (protected with secondary packaging) was exposed.
- Exposure of Rituximab to diffused sunlight through a window, To illumination with indirect sun exposure 10 cm and 1 m away from a window, with an irradiation of 300-800 nm (UVB and UVA), for a time of 1 and 2 h, from 8°C to approx. 1 and 2 h, 8 °C at approx. 23 - 24°C.

- Exposure of Rituximab to light under ICH conditions, exposing Rituximab formulated in a drug, to a total illumination of 1.2×10^6 lux-hours of light in the visible range and to an integrated irradiation of near-ultraviolet energy of 200 watts-h/ m², keeping the photostability chamber permanently inside a cold room at $5 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$.

Once the photoexposures were carried out, physicochemical measurements were made (Abs₃₂₀ nm, Zeta Potential, Differential Scanning Fluorometry (DSF), Ion Exchange Chromatography (CEX-UPLC-FLR), Dynamic Light Scattering (DLS) and biological (Biological Potency by Cytolysis complement-dependent (CDC)) that allowed to elucidate the effect caused by each condition. The results show that only exposure to direct sunlight during exposure in the worst case (2 h), increases aggregates, decreases T_m and decreases CDC which correlates with physicochemical analyses. While indoor light room exposure and ICH conditions have no contribution to Rituximab photooxidation as measured by these physicochemical and biological analytical methods. ^[1] These results indicate that the administration of Rituximab by perfusion/infusion is safe, as long as the biologic is not exposed to direct sunlight for long periods of time.

2. INTRODUCCIÓN (MARCO TEÓRICO)

Hace un par de décadas, la inmunoterapia se integró a la quimioterapia y radioterapia como tratamiento adyuvante contra el cáncer. En 1997, 24 años después del primer informe sobre tecnología de hibridomas, la Agencia Federal para Administración de Medicamentos y Alimentos (por sus siglas en inglés FDA) de EE.UU. aprobó por primera vez el uso clínico de un anticuerpo monoclonal (mAb).

El Rituximab administrado por vía intravenosa fue el primer mAb terapéutico que se utilizó contra el cáncer, estableciendo una nueva clase de fármacos denominados ahora biofármacos o biológicos.

Este anticuerpo monoclonal tiene actividad para unir linfocitos a través de su grupo de diferenciación número 20 (por sus siglas en inglés CD20), el cual se usa actualmente para tratar casi todos los tipos de linfomas no Hodgkin. Al unirse, Rituximab induce la muerte de los linfocitos B, activando los mecanismos de defensa del sistema inmunitario, como la citotoxicidad celular dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés), dependiente de células (ADCC, por sus siglas en inglés) e inductora de fagocitosis (ADPC, por sus siglas en inglés). ^[2,3]

Rituximab está disponible a una concentración de 10 mg/mL en presentaciones farmacéuticas líquidas de 100 mg (10 mL) o 500 mg (50 mL) sin conservadores. Antes de la administración, Rituximab se diluye a 1-4 mg/mL directamente en bolsa de infusión o frasco PET que contienen cloruro de sodio al 0,9% o dextrosa al 5%, estériles, soluciones inyectables. Aunque se considera que es bien tolerado por los pacientes tras su administración, se producen algunos efectos secundarios. Según una revisión sistemática de 28 ensayos clínicos, los eventos más comunes de la monoterapia con Rituximab son las reacciones a la infusión/perfusión, especialmente en el primer ciclo, además de la neutropenia.

La conservación adecuada de los medicamentos es un requisito imprescindible para que estos mantengan sus propiedades físico-químicas y farmacológicas. El objetivo prioritario es mantener la eficacia y la seguridad ya que fuera de las condiciones adecuadas de almacenamiento puede sufrir disminución de la potencia y perder la seguridad por la generación de productos de degradación o sustancias tóxicas liberadas de los envases primarios.

Los biofármacos fotosensibles son un grupo de sustancias biológicas que por sus características fisicoquímicas necesitan conservarse protegidas de la luz. Se puede decir que el envase primario y secundario desempeña un papel importante en la protección de los biofármacos además de ser la forma farmacéutica la que se somete a dicho estrés radiativo.

Es importante que los biofármacos no se expongan a la radiación visible o UV desde su fabricación hasta su utilización. Es por ello que como medidas generales se debe tener en cuenta que: 1) Únicamente se extraerán del envase que los protege hasta que vayan a ser administrados. 2) Se deben reconstituir y administrar justo antes de su uso. 3) Cuando por algún motivo el medicamento haya permanecido cierto tiempo expuesto a la radiación se debe consultar su estabilidad antes de utilizarlo. 4) Cuando un medicamento presente alguna alteración en su aspecto (cambios de color, enturbiamiento o precipitado en soluciones) se procederá a su cuarentena para valorar sus atributos críticos de calidad y posterior desecho si así lo requiere, aunque no esté caduco.

En particular para Rituximab se sabe que dentro de su envase secundario es estable durante 24 meses a temperatura de 2-8 °C; que las soluciones diluidas son estables a 2-8 °C durante 24 horas y a temperatura ambiente durante 24 horas adicionales si no se ha roto la esterilidad del producto.

2.1. MEDICAMENTOS BIOTECNOLOGICOS

2.1.1. Definición

La definición de medicamentos biotecnológicos es muy amplia. No hay una definición y clasificación de los mismos a nivel mundial, dejando dicha labor a la autoridad regulatoria sanitaria de cada país, los cuales se encargan de realizar un seguimiento de los mismos tanto para llevar a cabo su registro correspondiente como su vigilancia en el mercado.

En lo concerniente a México en el Reglamento de Insumos para la Salud, Capítulo VIII, **Medicamentos Biotecnológicos**, Artículo 81. Se menciona lo siguiente:

Para efectos del presente Reglamento, se considera biofármaco a toda sustancia que haya sido producida por biotecnología molecular, que tenga actividad farmacológica, que se identifique por sus propiedades físicas, químicas y biológicas y que reúna las condiciones para ser empleada como principio activo de un medicamento biotecnológico.

Asimismo, se entiende por medicamento biotecnológico a toda substancia que haya sido producida por biotecnología molecular, que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presente en forma farmacéutica, que se identifique como tal por su actividad farmacológica y propiedades físicas, químicas y biológicas.

Los biofármacos y los medicamentos biotecnológicos podrán ser:

I. Proteínas recombinantes: Las proteínas producidas por cualquier organismo biológico procarionte o eucarionte al que se le introduce, por técnicas de ingeniería genética, una secuencia de ácido desoxirribonucleico que las codifica;

II. Anticuerpos monoclonales: Las inmunoglobulinas intactas producidas por hibridomas, inmunoconjugados, fragmentos de inmunoglobulinas y proteínas recombinantes derivadas de inmunoglobulinas;

III. Péptidos sintéticos: Los péptidos constituidos por menos de cuarenta aminoácidos producidos por técnicas de biología molecular;

IV. Ácidos nucleicos sintéticos o de plásmidos: Los ácidos nucleicos obtenidos de plásmidos naturales o modificados por técnicas de ingeniería genética, y

V. Los demás que, en su caso, determine mediante acuerdo la Secretaría, conforme a los avances técnicos y científicos.

Actualmente sólo el 20% de los fármacos catalogados como innovadores son obtenidos por técnicas biotecnológicas, porcentaje que va aumentando hasta el 50% si se incluyen aquellos catalogados en fase de investigación clínica ^[4] cifras que se ven corroboradas cuando se comprueba que año tras año la investigación tanto experimental como clínica con medicamentos biotecnológicos superan a los de síntesis química, estimándose que en la actualidad, los biofármacos representan alrededor del 15% de los tratamientos disponibles. ^[5]

2.1.2. Características de los medicamentos biotecnológicos

Para la obtención de los medicamentos biotecnológicos se emplean técnicas basadas en el ADN recombinante e hibridomas, que incorporan información al material genético de organismos vivos como bacterias, hongos, etc., con el cual puedan sintetizar un producto terapéutico de una manera exógena.

Debido a sus diferencias tanto en el origen como a nivel estructural con los medicamentos de síntesis química, presentan características propias a nivel de propiedades farmacológicas uso clínico, aspectos regulatorios y seguridad entre otros aspectos, por lo que muchos conceptos de farmacología clásica no pueden ser aplicables directamente en ellos.

Las principales diferencias entre los medicamentos biotecnológicos y los de síntesis química son:

A. En general los medicamentos biotecnológicos presentan un proceso de producción mucho más complejo. Son sustancias terapéuticas generalmente de naturaleza proteica, que interactúan con las proteínas humanas.

Dichas sustancias son producidas por organismos vivos o extractos de estos en el caso de bacterias, hongos o células de origen animal o humano, por lo que en el primer paso para su obtención es modificar el material genético de una célula o microorganismo introduciéndole la secuencia que produzca la proteína de interés. ^[6]

B. El componente activo de los medicamentos biotecnológicos es heterogéneo y presentan una estructura molecular de mayor complejidad y tamaño que los de síntesis química. Dado lo anterior su análisis, caracterización y producción será más complicada que la de los fármacos de síntesis química, debido a que no pueden replicarse de forma exacta y que sus estructuras y propiedades dependerán de los procesos de producción elegidos, por lo que existe un grado de variabilidad controlada y admitida por las autoridades sanitarias entre lotes del mismo biofármaco. ^[7]

C. La inmunogenicidad es un riesgo a tener en cuenta, debido a su potencial de activar la respuesta inmunitaria induciendo distintas reacciones adversas. Se trata de un proceso en el que un organismo vivo genera una respuesta frente a una proteína o sustancia ajena al organismo. La respuesta frente a este agente conlleva a la producción de anticuerpos que se unen a la entidad extraña para inactivarla formando un complejo antígeno-anticuerpo, causante de los efectos adversos. Este factor representa un aspecto muy importante de bioseguridad, estableciéndose unos requisitos de evaluación del potencial inmunogénico

que aparecen escritos en lineamientos específicos (*Guidelines on immunogenicity assesment of biotechnology-derived therapeutic proteins*).^[8] A pesar de ello la inmunogenicidad sigue siendo el principal factor para el fracaso de los medicamentos en fases preclínicas.

D. El número de pruebas de control requeridas en un medicamento biotecnológico para garantizar su eficacia es mayor en comparación con las pruebas realizadas a los medicamentos basados en principios activos de síntesis química.^[9, 10] Esto se debe a que se requiere un control estricto para garantizar la bioseguridad y la eficacia del biofármaco, por lo que el medicamento incluye este tipo de controles.^[7]

E. La mayoría de los medicamentos se administran por inyección o infusión en medios hospitalarios. No pueden administrarse por vía oral como ocurre con la mayoría de los fármacos de síntesis química.^[9]

F. El desarrollo del estudio farmacéutico de los biofármacos es complejo.^[10] Debido a la similitud entre péptidos endógenos y proteínas de nutrientes, y los péptidos y proteínas de fluidos biológicos. A pesar de ello, el desarrollo y mejora de las técnicas analíticas permiten que cada vez sean más factible, debido al uso de técnicas más complejas como son: inmunoensayos muy específicos y de técnicas avanzadas de espectrometría de masas.^[11]

El costo de los medicamentos biotecnológicos es más alto que el de los medicamentos de síntesis química. Debido a la dificultad de fabricación y el que no haya alternativas más baratas de producción.

2.1.3 Marco legal: la regulación de los medicamentos biotecnológicos

En Europa desde 1995, la EMA es la encargada de la evaluación y autorización de los medicamentos biotecnológicos, agencia en el que están involucrados todos los países miembros de la Unión Europea. Dicha evaluación tiene lugar durante 200 días, tras los cuales el Comité de Medicamentos para Uso Humano (CHMP; Committee for Human Medicinal Products) elabora una opinión científica.

Todos los pasos para seguir en el proceso centralizado de autorización por parte de EMA

fueron por primera vez descritos en la Regulación (EC) No. 726/2004, el cual fue modificado posteriormente por la Directiva (UE) 2017/1572. Y que es obligatorio en los siguientes casos:

- Productos obtenidos mediante el uso de organismos vivos.
- Medicamentos de terapia avanzada (basados en la manipulación de genes, células o tejidos).
- Productos que contengan alguna sustancia nueva cuyo fin sea el tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), cáncer, trastornos neurodegenerativos, diabetes u otras enfermedades de carácter inmunitario y enfermedades virales.
- Medicamentos para el tratamiento de enfermedades raras, denominados como medicamentos huérfanos.

En lo concerniente a México se cuenta con la LGS 222BIS, el Reglamento de Insumos para la Salud, Capítulo VIII, Productos biotecnológicos, Art 81 BIS y la NORMA Oficial Mexicana NOM-257-SSA1-2014, En materia de medicamentos biotecnológicos, que abarca: Las Directrices generales de operación para la evaluación de la información técnica y científica presentada durante el proceso de la solicitud de registro de medicamentos biotecnológicos. Control de la fabricación de medicamentos biotecnológicos. Autorización de protocolos. Farmacovigilancia de medicamentos biotecnológicos. Requisitos para el reconocimiento de medicamentos biotecnológicos de referencia y los Estudios de biocomparabilidad de medicamentos biotecnológicos entre normas que aplican para todos los medicamentos.

2.2. ANTICUERPOS MONOCLONALES

2.2.1. Definición.

Un anticuerpo es una proteína que reacciona a un antígeno. Los anticuerpos, que pueden hallarse en la sangre o en otros fluidos del cuerpo, son utilizados por el sistema inmunitario para reconocer y bloquear virus, bacterias, parásitos u hongos.

A principios del siglo XX, la utilización de los anticuerpos a nivel sanitario consistía en el uso de sueros inmunes convencionales que consistía en una mezcla heterogénea de inmunoglobulinas de suero procedentes de distintas especies.

Cuando se inmunizan los animales con un antígeno específico, pueden generar anticuerpos diversos que unen al antígeno en diferentes epítopes del mismo. En ese caso reciben el nombre de anticuerpos policlonales. Cuando se ha inmunizado a un animal varias veces con el mismo antígeno, sucede una selección específica y maduración de los anticuerpos cuya característica principal es la alta afinidad por el antígeno. Por otro lado, aquellos producidos por un único linfocito B y sus clonas, reciben el nombre de anticuerpos monoclonales y presentan la misma especificidad frente a un único antígeno. De esta forma, se puede definir al anticuerpo monoclonal como un anticuerpo homogéneo capaz de reconocer una parte del antígeno de forma específica, procedente de células linfocitos B. ^[12]

En la actualidad los anticuerpos monoclonales terapéuticos se obtienen mediante técnicas de Biología Molecular en las cuales, se clonan los genes específicos de un anticuerpo, en cósmidos, plásmido y se transfectan a células de mamífero. Creando una célula que produce un único tipo de anticuerpos, es decir, un anticuerpo monoclonal recombinante.

Actualmente, los anticuerpos monoclonales terapéuticos están consolidados en el tratamiento de enfermedades inmunológicas y oncológicas, de tal manera que el número de ellos aprobados o en ensayos clínicos están en constante aumento

2.2.2. Estructura.

Los anticuerpos monoclonales, como inmunoglobulinas que son proteínas altamente especializadas presentando estructuras muy específicas en función del antígeno que reconozcan.

Un mAb consta de cuatro cadenas polipeptídicas dos ligeras (L) y dos pesadas (H). Estas cadenas están unidas por puentes disulfuro y la estructura tridimensional permanece estabilizada por enlaces de tipo no covalentes, como son los puentes de hidrógeno y las fuerzas de Van der Waals.

Esta estructura recibe el nombre de monómero. Las cadenas pesadas y ligeras presentan diferencias entre sí, como por ejemplo en el número de dominios (de 3 a 4 dominios constantes en el caso de las cadenas pesadas y un único dominio en el caso de las cadenas ligeras).

Las cadenas polipeptídicas de los mAbs están unidas por puentes disulfuro y la estructura tridimensional permanece estabilizada por enlaces de tipo no covalentes, como son los puentes de hidrógeno y las fuerzas de Van der Waals. ^[13]

Las cadenas pesadas, cuyo peso molecular es de 55 a 77 kDa, constan de 450 a 550 aminoácidos con un 3 al 15% de carbohidratos necesarios para la estabilidad estructural del monómero y favorecer la activación del sistema del complemento y la unión a receptores Fc.

Existen cinco clases o isotipos de cadenas pesadas, cuyas diferencias estructurales entre sí se detectan a nivel de la región carboxilo terminal. Su clasificación conlleva el uso de letras griegas, las cuales determinarán el tipo de inmunoglobulina: gamma (γ) presente en la IgG, mu (μ) en la IgM, alfa (α) en la IgA, delta (δ) en la IgD y épsilon (ϵ) en la IgE.

Además, presentan una región bisagra cuyo aminoácido predominante es la prolina, ubicada entre los dominios CH1 y CH2. Su longitud es variable (entre 10 a 60 aminoácidos) en función del tipo de inmunoglobulina. La principal característica de esta región es la flexibilidad, factor necesario para la orientación espacial de los paratopos y clave para la eficiencia de la unión antígeno-anticuerpo.

Las cadenas ligeras, cuyo peso molecular es en torno a los 25 kDa, no presentan carbohidratos a diferencia de las cadenas pesadas. Constan de 220 aminoácidos aproximadamente, pudiéndose dividir en dos dominios: dominio variable en posición aminoterminal y dominio constante en posición carboxiterminal. Variaciones estructurales en el CL carboxiterminal permiten distinguir dos tipos de cadenas ligeras: kappa (κ) y lambda (λ). Una Ig nunca podrá tener ambas, solamente κ o λ , Figura 1.

Los extremos amino-terminales de una cadena ligera y una cadena pesada constituyen el paratopo o sitio de unión para el antígeno, lo que quiere decir que existen dos sitios de combinación por monómero de inmunoglobulina. De esta forma, las inmunoglobulinas G, D y E tienen un carácter bivalente porque puede interactuar con dos epítomos idénticos.

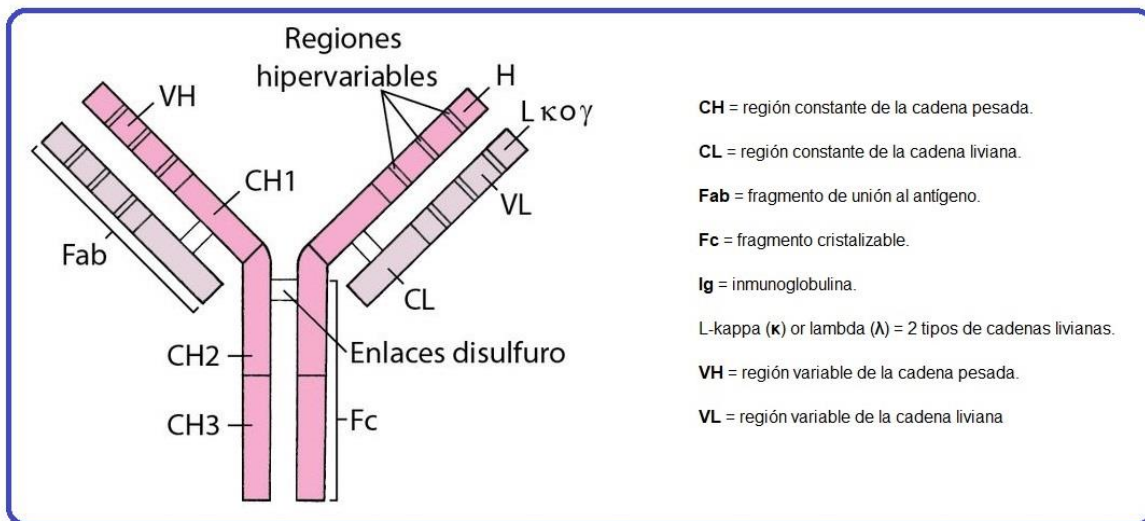


Figura 1. Molécula de inmunoglobulina

Las regiones hipervariables, denominadas también como regiones determinantes de complementariedad (CDR: *Complementary Determining Region*) constan de unos 30 aminoácidos de cada cadena ligera y pesada ubicadas en la región variable. Se pueden dividir en distintos subgrupos en función de cada especie en base a su secuencia de aminoácidos, siendo en el caso de los humanos cuatro subgrupos para las cadenas kappa, seis para las cadenas lambda, y tres para las cadenas pesadas.

De las dos grandes regiones en las que se divide la estructura de un mAb, el fragmento de unión al antígeno (Fab) es el más importante desde el punto de vista funcional. Ubicado en la posición amino terminal permite la unión específica con el antígeno sin llevar a cabo su precipitación. La otra región en la que se divide el anticuerpo es el fragmento cristalizante (Fc), de unos 50 kDa de peso molecular, y cuyo nombre hace referencia a que fue la primera región cristalizada y determinada por rayos X. Ubicada en el extremo carboxilo terminal de la cadena pesada, realiza a cabo muchas funciones importantes, activación de las células fagocíticas, citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC), inmunidad de mucosas, inmunidad neonatal, hipersensibilidad inmediata y regulación de la respuesta inmunogénica.

Existen cinco grandes tipos de anticuerpos o gammaglobulinas humana: Inmunoglobulinas G (IgG), A (IgA), M (IgM), E (IgE) y D (IgD) cuyas diferencias radican en tamaño, carga, composición de aminoácidos y contenido de carbohidratos en las cadenas pesadas, Figura 2.

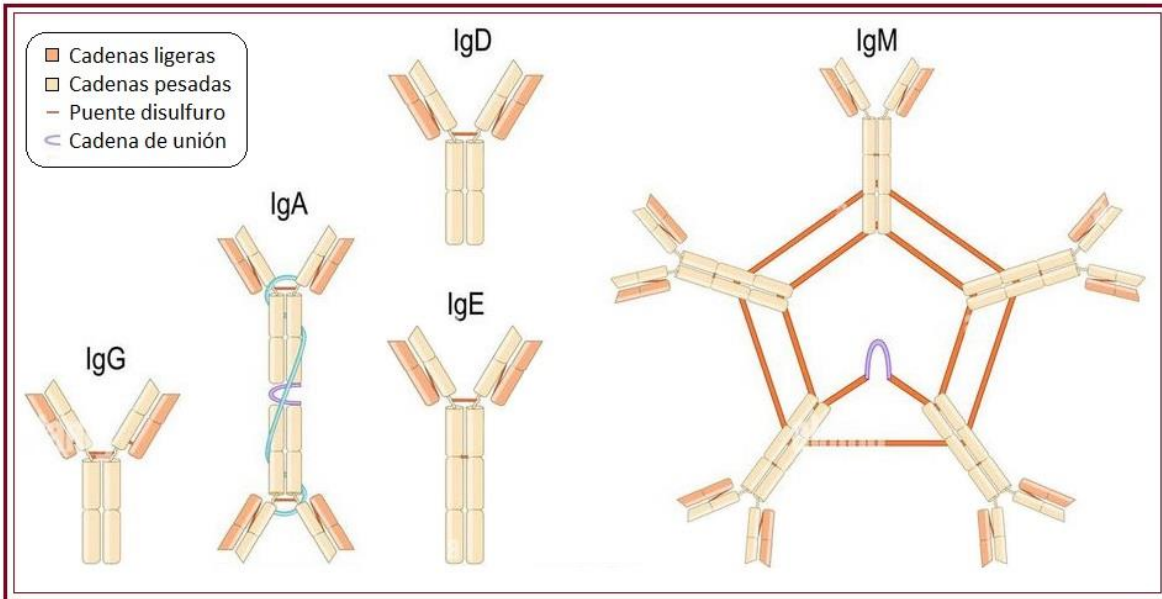


Figura 2. Tipos de anticuerpos e inmunoglobulina. Principales clases de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Cadenas pesadas y ligeras, uniendo cadena, y enlace de Disulfuro. Tetiana Zhabska / Alamy Vector. 26 Ene 2021.

Las gammaglobulinas IgG son las mayoritarias, pudiendo distribuirse por todo el organismo e, incluso, atravesar la placenta para dar inmunidad fetal. Estas se subdividen en cuatro sub-tipos: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 en función del número de aminoácidos en la región bisagra y del número de puentes disulfuro entre cadenas pesadas. El tipo IgG, es el más empleado con fines terapéuticos, y de entre las diferentes subclases, la 1 es la que presentan la mayoría de los comercializados, entre otras razones, por su larga vida media en los fluidos biológicos.

2.2.3. Nomenclatura.

Según la OMS, existen más de 300 denominaciones comunes internacionales (DCI) para los anticuerpos monoclonales desde el año 1992. La nomenclatura está basada en una revisión del International Non proprietary Names (INN) for biological and biotechnological substances. Las DCI (ver Figura 3) para los anticuerpos monoclonales están compuestas de un prefijo (partícula A), un sufijo (partícula B) y ambos con un infijo.

prefijo + infijo A (objetivo, órgano) + infijo B (origen) + sufijo

El prefijo debe ser al azar, y su único requisito es el de contribuir a un nombre eufónico (armonioso) y distintivo.



Figura 3. Nomenclatura de anticuerpos monoclonales

La partícula A indica el tipo de diana (molécula, célula, órgano, enfermedad), por ejemplos: -b (o -ba) es de objetivo bacteriano; -c (o -ci) es de objetivo cardiovascular; -t (o -tu) de objetivo tumoral; l (o -h) su objetivo es ser inmunomodulador. La partícula B indica la especie sobre la que está basada la secuencia de Ig del mAb: (- o- ratón; -u- humano; -zu- humanizado; -xi- quimérica; -xizu- quimérico- humanizada; etc.). El sufijo (terminación) común para los mAbs es —mab.

2.2.4. Obtención.

La forma clásica de obtener anticuerpos frente a un antígeno es mediante el uso de animales, como el conejo o caballo (sueros con anticuerpos policlonales). De esta forma, se necesita inocular previamente al animal (inmunizar) con la sustancia contra la cual se necesitan generar anticuerpos. Tras ello, se purifican del suero mediante diferentes técnicas cromatográficas.

En 1975, César Milstein, George Köhler y Niels K. Jerme, consiguieron desarrollar una técnica para la producción de anticuerpos procedentes de un único clon de linfocitos B, hecho que les permitió ser galardonados con el premio Nobel de Medicina en 1984, mediante el uso de hibridomas o células híbridas de linfocitos B con células plasmáticas tumorales de mieloma múltiple.

Dicho hibridoma, presenta las propiedades idóneas de ambos para su utilidad: producción de un anticuerpo específico (linfocito B) y la inmortalidad con gran capacidad de crecimiento (mieloma).

Las células usadas en un inicio fueron células de ratón, aunque en la actualidad el tipo celular usado para la producción de hibridomas son variadas. Posteriormente, se consiguieron erradicar reacciones adversas que se detectaban en muchos pacientes, gracias a las investigaciones de Gregory Winter y Richard Lerner que humanizaron los anticuerpos monoclonales.

2.2.5. Tecnologías para la producción de anticuerpos monoclonales por medio de hibridomas.

La producción de anticuerpos monoclonales se puede realizar a través de diferentes técnicas, siendo la más usada la técnica de generación de hibridomas mencionada anteriormente.

Con relación a esta generación de hibridomas, a finales del siglo pasado se desarrollaron modelos de ratones transgénicos a los que habían sido inoculados los genes para la producción de inmunoglobulinas humanas, los cuales permiten el desarrollo de linfocitos B en gran cantidad, productores de anticuerpos humanos.

Para la obtención del anticuerpo monoclonal específico, se les inmunizaba con el antígeno para después usar sus bazos para la obtención de hibridomas siguiendo cualquier protocolo convencional. Del bazo se extraen los linfocitos B, que se fusionan en presencia de polietilenglicol (PEG) con células tumorales de mieloma múltiple, consiguiendo que puedan crecer de forma indefinida en un cultivo celular. La unión de ambas células, constituyen el hibridoma, capaz de multiplicarse rápida e indefinidamente, para producir gran cantidad de anticuerpos. Estos hibridomas son cultivados para obtener colonias capaces de producir un único tipo de anticuerpo, los cuales serán analizados para conocer la afinidad por un antígeno determinado para su selección y posterior aislamiento. De esta forma, se obtienen poblaciones homogéneas de anticuerpos frente a un único antígeno.

2.2.6. Producción de anticuerpos terapéuticos por ingeniería genética.

A pesar de la gran efectividad para la obtención de anticuerpos monoclonales de tipo murino (procedente de ratón), no ocurre lo mismo con los anticuerpos monoclonales de tipo humano, por lo que se han desarrollado otras técnicas alternativas a la obtención de estos anticuerpos monoclonales humanos a partir de hibridomas.

Entre estas tecnologías se encuentra la tecnología de los anticuerpos recombinantes, en la cual no es necesaria la inmunización del animal. Para ello, se requieren grandes bibliotecas de genes de anticuerpos, cuyo screening debe tener una eficiencia comparable a la del sistema inmune, mediante la exposición en la superficie de microorganismos los anticuerpos producidos.

En la actualidad, se producen mediante el uso de biorreactores donde células de ovario de hámster chino (CHO) se desarrollan en cultivo en suspensión sin suero. Estas células han sido transfectadas anteriormente con un vector de expresión que contiene la secuencia codificante del mAb. Posteriormente, se procede a los procesos de purificación y control de calidad.

2.3. DESCRIPCIÓN DE RITUXIMAB

2.3.1. Procedimiento de obtención y características.

Rituximab (RTX) es un anticuerpo monoclonal quimérico murino/humano obtenido por ingeniería genética, que representa una inmunoglobulina glicosilada con las regiones constantes de la IgG1 humana y las secuencias de la región variable de las cadenas ligeras y cadenas pesadas murinas cuya función es la unión al antígeno CD20, que es una proteína transmembranal que forma un tetrámero que es un canal de iones para calcio, participe de la regulación de la activación de linfocitos B ^[14] (Figuras 4 y 5).

El Rituximab se obtiene mediante el uso de la ingeniería genética, a través de la cual se combina la región variable de un anticuerpo monoclonal murino con las regiones constantes de la IgG humana. Este anticuerpo se produce a partir de un cultivo en suspensión de células de mamífero (células de ovario de hámster chino) y se purifica mediante cromatografía de afinidad y de intercambio iónico, incluyendo procedimientos específicos de inactivación y de eliminación viral. ^[14]

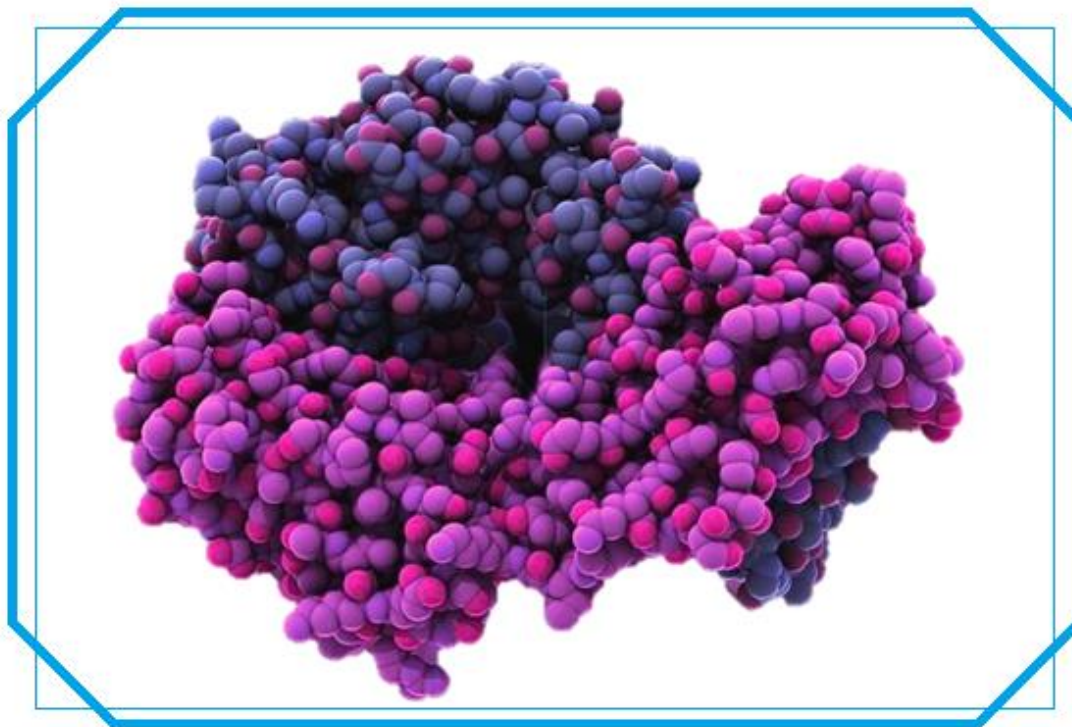


Figura 4. Modelo molecular del fármaco Rituximab. Este anticuerpo monoclonal quimérico, destruye las células B que tienen la proteína CD20 en su superficie. Se utiliza para tratar enfermedades que se caracterizan por un número excesivo, disfuncional o hiperactivo de células B. Esto incluye muchos linfomas, leucemias, rechazo de trasplantes y trastornos autoinmunes. (Es una fotografía de Laguna Design 19 Sep 2018. Science Photo Library). ^[15]

El dominio Fab del Rituximab se une al antígeno CD20 en la superficie de los linfocitos B, mientras que el dominio Fc puede reclutar efectores de la respuesta inmune para mediar la lisis de los linfocitos B. Los mecanismos posibles de la lisis celular mediada por efector incluyen citotoxicidad dependiente del complemento- (CDC) como resultado de la unión de C1q, y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediada por uno o más receptores Fc γ de la superficie de los granulocitos, macrófagos y células NK (natural killer). También se ha demostrado que la unión del Rituximab al antígeno CD20 de los linfocitos B induce la muerte celular por apoptosis. ^[14]



Figura 5. Rituximab 3D. Fuente: Wikiderma. Academia Española de Dermatología y Venereología (España); 31 Mar 2017

Rituximab es un medicamento que se usa para tratar los siguientes cánceres de la sangre y afecciones inflamatorias:

- Linfoma folicular y linfoma no Hodgkin difuso de células B grandes (dos tipos de linfoma no Hodgkin, un cáncer de la sangre).
- Leucemia linfocítica crónica (LLC, otro cáncer de la sangre que afecta a los glóbulos blancos).
- Artritis reumatoide grave (una afección inflamatoria de las articulaciones).
- Granulomatosis con poliangeítis (GPA o granulomatosis de Wegener) y poliangeítis microscópica (MPA), que son afecciones inflamatorias de los vasos sanguíneos.
- Pénfigo vulgar de moderado a grave, una enfermedad autoinmune caracterizada por ampollas generalizadas y erosión de la piel y las membranas mucosas (superficies corporales húmedas, como el revestimiento de la boca). "Autoinmune" significa que la enfermedad es causada por el sistema inmunológico (las defensas naturales del cuerpo) que ataca las propias células del cuerpo.

Dependiendo de la afección que se use para tratar, Rituximab se puede administrar solo o con quimioterapia (otros medicamentos contra el cáncer) o medicamentos utilizados para trastornos inflamatorios (metotrexato o un corticosteroide) ^[16]

Los anticuerpos de Rituximab son estructuras en forma de Y que consisten en dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas conectadas por enlaces disulfuro (ver en Figura 1, los puentes disulfuro). La escisión proteolítica de anticuerpos por papaína produce dos fragmentos de unión a antígenos (fragmentos Fab) y un fragmento cristizable (fragmento Fc). Los brazos superiores de la Y, que contienen regiones de secuencia variable y secuencia constante, forman las piezas Fab. La pieza Fc, que es reconocida por receptores específicos en las células efectoras humanas, consiste en las porciones de las cadenas pesadas que forman el tallo de la Y. [17]

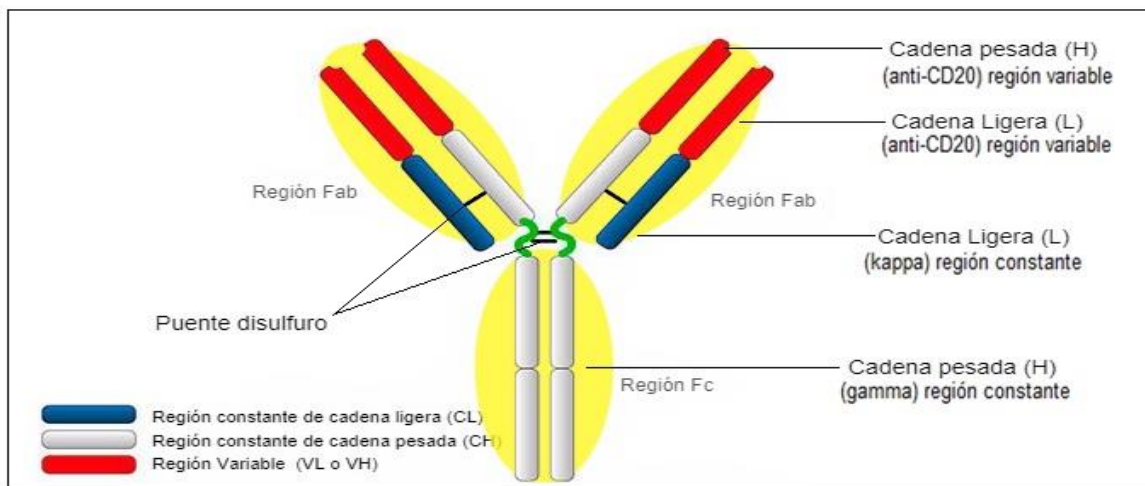


Figura 6. Diagrama de estructura de Rituximab. El Rituximab es un anticuerpo quimérico del tipo de inmunoglobulina G1 kappa con regiones murinas de secuencia variable anti-CD20 (áreas llenas) y regiones humanas de secuencia constante (áreas abiertas).

La estructura quimérica de Rituximab comprende regiones constantes humanas de IgG 1 y cadena kappa y regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo murino a CD20 (Figura 6). [18] Las regiones variables murinas se unen selectivamente al antígeno CD20 expresado en la superficie de los linfocitos B normales y en la mayoría de los linfomas de células B. La presencia de una región constante humana permite que el Rituximab se una a los receptores Fc en las células efectoras humanas (por ejemplo, células de linfoma, macrófagos y neutrófilos) para mediar tanto la citotoxicidad dependiente del complemento como la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos y disminuye su inmunogenicidad. [18] In vitro, se ha demostrado que el Rituximab inhibe la proliferación celular, induce la apoptosis y sensibiliza las células del linfoma a los efectos de ciertos agentes de quimioterapia. [19] Esta interacción sinérgica sugiere el potencial de una mayor eficacia del tratamiento cuando se combinan Rituximab y quimioterapia y fomenta una mayor investigación en pacientes con enfermedad recurrente. Después de la administración de Rituximab, las células B recubiertas de anticuerpos se agotan rápidamente de la sangre periférica, los ganglios linfáticos y la médula ósea. [18]

Tabla 1. Características técnicas del Anticuerpo Recombinante Anti-Human CD20 (rituximab) [20]

Inmunógeno	Línea celular linfoblastoide humana SB
Especie hospedera	Ratón
Derivación	Quimérico (ratón/humano)
Tipo	IgG1 - kappa
Especificidad	Dio positivo contra el antígeno humano nativo
Reactividad de especies	Humano
Aplicaciones	Adecuado para su uso en Neut, ELISA, IF, IP, FuncS, FC, WB y la mayoría de los otros métodos inmunológicos
Nombre comercial	<u>Rituximab</u> / <u>Rituximab</u>
Cas	174722-31-7
Nombre genérico	<u>Rituximab</u>
Vida media biológica	30 a 400 horas (varía según la dosis y la duración del tratamiento)
Código ATC	L01XC02
Banco de Drogas	DB00073
UNII	4F4X42SYQ6
ChEMBL	CHEMBL1201576
Mw	143.859,7 g/mol
Aplicaciones	Adecuado para usar en Neut, ELISA, IF, IP, FuncS, FC, WB y la mayoría de los otros métodos inmunológicos
Fórmula	C ₆₄₁₆ H ₉₈₇₄ N ₁₆₈₈ O ₁₉₈₇ S ₄₄
Almacenamiento	Guardar en condiciones estériles a -20°C al recibirlo. Se recomienda envasar la proteína en cantidades más pequeñas para un almacenamiento óptimo
Enfermedades relacionadas	Granulomatosis de Wegener (WG) y poligamiitis microscópica (MPA), en combinación con glucocorticoides

Origen: *Anticuerpo recombinante antihumano CD20 (Rituximab) - Creative Biolab*

Tabla 2. Antecedentes del Anticuerpo Recombinante Anti-Human CD20 (rituximab) [20]

Introducción	CD20 es una molécula de superficie de linfocitos B que desempeña un papel en el desarrollo y la diferenciación de células B en células plasmáticas.
Nombres alternativos	<u>Rituximab</u> ; <u>rituximab</u> / <u>rituximab</u> ; 174722-31-7; <u>rituximab</u> ; Zytux; DB00073MS4A1; 4 dominios que abarcan membranas, subfamilia A, miembro 1; CD20; Antígeno de linfocitos B CD20; B1; Bp35; MS4A2; Antígeno CD20; Receptor CD20; antígeno de superficie leucocitaria Leu-16; Linfocito B c
Identificación de genes	<u>931</u>
UniProt ID	<u>P11836</u>

Origen: *Anticuerpo recombinante antihumano CD20 (Rituximab) - Creative Biolab*

2.3.2. Mecanismo de acción.

El mecanismo de acción involucra la unión del Rituximab a través de la región variable con el antígeno CD20 sobreexpresado en linfocitos B malignizados. Dicha unión presenta una afinidad y especificidad elevadas, cuantificada en 5,2 nmol/L. Su peso molecular es de 145 kDa.

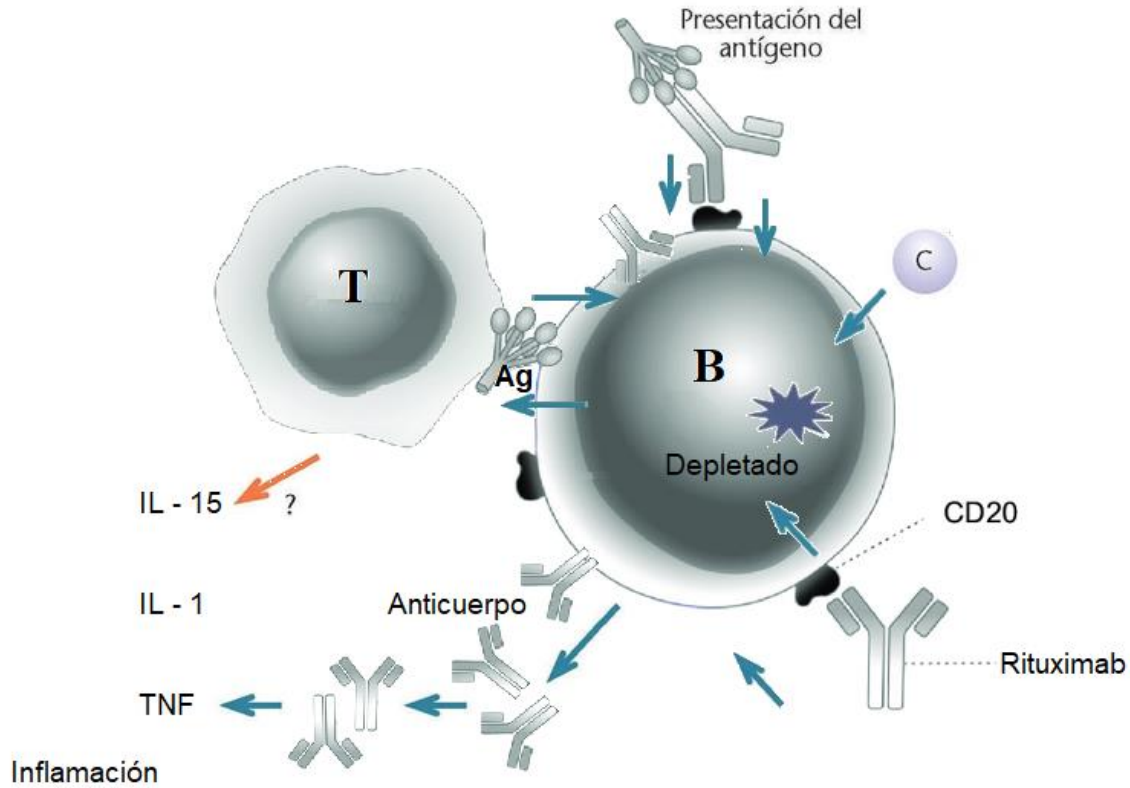


Figura 7. Rituximab es el anticuerpo monoclonal anti-CD20 de los linfocitos B.^[17] Modificado de la fuente: Sany J. Nuevas estrategias terapéuticas en artritis reumatoide. XIII Congreso Internacional de Reumatología. Termas de Chillán (Chile); 2004

La unión antígeno-anticuerpo se ve involucrada en cuatro rutas encargadas de lisar estas células cancerosas: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), fagocitosis celular dependiente de anticuerpo, citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), siendo éste el último mecanismo principal de Rituximab y el efecto antitumoral principal producto de la apoptosis u otras rutas de muerte celular (Figura 7).

La unión del fragmento cristalizante (Fc) a las células cancerosas genera la reorganización de los antígenos CD20 en parches sobre la membrana lipídica que provocan la activación de la ruta clásica del complemento, por la exposición del sitio de C1q, por lo que se activa la citotoxicidad dependiente del complemento, lisis de las células tumorales y se favorece un incremento de la actividad fagocítica.

La interacción entre el fragmento cristalizable Fc con receptores Fc gamma expresada en determinadas células como son las Natural Killers (NK), granulocitos y macrófagos, desencadena la activación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

2.3.3. Aplicaciones.

Rituximab es un anticuerpo monoclonal ampliamente utilizado para el tratamiento de linfomas no Hodgkin B de alto y bajo grado (B-NHL) y con actividad terapéutica también en otras neoplasias de células B como leucemia linfocítica crónica de células B, leucemia de células pilosas y macroglobulinemia de Waldenström [21, 22, 23, 24, 25, 26] (Tabla 3).

Recientemente por su actividad lítica de células B ha encontrado una aplicación para el tratamiento de varias enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide, la trombocitopenia inmune [27, 28] y el vitíligo.

Tabla 3.- Relación de aplicaciones de Rituximab.

Enfermedad	Uso
Linfoma folicular	<ul style="list-style-type: none"> - Paciente con linfoma no Hodgkin de baja recurrencia. - Pacientes de progresión rápida de la enfermedad - Pacientes en estadio III-IV en monoterapia, quimioresistentes o en recidiva tras quimioterapia
Linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL)	<ul style="list-style-type: none"> - Pacientes con DLBCL en combinación con agentes quimioterápicos no tratados. - Pacientes con recidiva en estadio III
Leucemia linfocítica crónica	<ul style="list-style-type: none"> - Todos grupos de pacientes en combinación con agentes quimioterápicos
Granulomatosis con poliangeítis y poliangeítis microscópica	<ul style="list-style-type: none"> - En combinación con glucocorticoides

También se ha demostrado el desarrollo de anticuerpos idiotípicos en pacientes tratados con Rituximab, quienes pueden sufrir reacciones alérgicas al ser tratados con posterioridad con otros anticuerpos. Se está investigando sobre el modo de superar dicha resistencia, siendo fundamentalmente el uso de adyuvantes inhibidores de las vías antiapoptóticas, entre los que se encuentran inhibidores de la histona de acetilasa, inhibidores químicos dirigidos, inhibidores del proteosoma, inhibidores selectivos de productos génicos antiapoptóticos y microRNAs, o el uso combinado con lenalidomida, inmunomodulador que potencia la ADCC, observando mejoría en pacientes con resistencia a Rituximab.

2.3.4. Efectos adversos.

Las más comunes suelen ser reacciones relacionadas con la infusión. Las más severas, incluyen broncoespasmos e hipertensión (en el 12% de los pacientes). Debido a esto, se recomienda una vigilancia durante las primeras 24 horas del tratamiento, momento en el que suelen aparecer este tipo de reacciones que, en caso de ser de mayor gravedad, se considera la suspensión del tratamiento.

Otros efectos adversos consisten en infecciones y efectos a nivel del sistema circulatorio y cardíaco. También se han detectado casos en los que se ha reactivado el virus de la Hepatitis B, desarrollando hepatitis fulminante, insuficiencia hepática y muerte en algunos casos.

En tratamientos monoterápicos de 4 semanas con Rituximab, se han detectado citopenias leves y reversibles, acompañados de neutropenia, leucopenia y trombocitopenia. Otros eventos incluyen trastornos del sistema respiratorio, trastornos gastrointestinales, trastornos cutáneos, trastornos metabólicos y trastornos del sistema nervioso.

2.3.5. Forma farmacéutica. Composición y excipientes.

Rituximab se presenta en una disolución concentrada para preparar a partir de ella una disolución más diluida para perfusión. El aspecto de ambas disoluciones es de un líquido transparente e incoloro. Cada vial contiene 100 mg de Rituximab disueltos en 10 mL, por tanto su concentración es de 10 mg/mL. Los excipientes que contiene son el citrato sódico, polisorbato 80, cloruro sódico y agua para inyectables.

2.4. ESTABILIDAD EN MEDICAMENTOS DE USO HUMANO

2.4.1. Definición.

Para hablar sobre la estabilidad de un medicamento en primer lugar hay que definir el concepto de “estabilidad” del mismo, en la Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015, “*Estabilidad de fármacos y medicamentos*”, se menciona como: la capacidad de un fármaco, un medicamento o un remedio herbolario contenido en un sistema contenedor-cierre de determinado material, para mantener, durante el tiempo de almacenamiento y uso, las especificaciones de calidad establecidas.

En el caso de los medicamentos biotecnológicos, debido a su naturaleza proteica o polipeptídica, su estabilidad es bastante más compleja que la de los medicamentos tradicionales dado que son estructuras cuya actividad biológica y/o funcional depende de fuerzas tanto covalentes como no covalentes de las cuales las últimas pueden ser fácilmente desequilibradas. De tal forma, que son más sensibles a factores ambientales como lo son la temperatura, humedad, luz, oxidación, fuerza iónica y estrés mecánico que los fármacos de síntesis química, por lo que se requieren para los medicamentos biotecnológicos unas condiciones más estrictas de almacenamiento para evitar su degradación y conservar su actividad biológica.

Esta inestabilidad puede ser originada por numerosos aspectos que pueden agruparse en varios tipos como son:

- Físicos.
- Químicos.
- Biológicos.

2.4.2. Tipos de estudio.

Los estudios de estabilidad no sólo están circunscritos al establecimiento de una fecha de caducidad sino de objetivos que dependiendo de la etapa de desarrollo del producto evolucionan junto con él.

Desde este punto de vista, los estudios de estabilidad de cada etapa son complementarios y estudios previos que enriquecen los de las fases siguientes (Figura 8):



Figura 8. Etapas en el desarrollo de un producto farmacéutico en que se realizan pruebas de estabilidad.

Una vez establecido un producto los diferentes estudios de estabilidad que se pueden llevar a cabo son los de estabilidad acelerada, estudios a largo plazo, especiales como aquéllos en donde intencionadamente se expongan a condiciones extremas de luz, humedad, temperatura, congelación/descongelación, etc.

Por ejemplo, en las etapas de productos propuestos se desarrollan estudios de estabilidad acelerada a fin de someter a condiciones extremas, que permitan conocer el comportamiento del producto ante dichas situaciones. En productos establecidos comercializados se monitorea su comportamiento de forma periódica generalmente anual de tal forma que se corrobore que el comportamiento del producto se ha sostenido.

2.4.3. Regulación.

Existen diferentes organismos internacionales que se ocupan de la seguridad de los medicamentos de uso humano que se comercializan, y por tanto de los requerimientos para el cumplimiento de la estabilidad de los mismos. En 1990 tuvo lugar la constitución de la International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use para armonizar la normativa mundial de seguridad, efectividad y calidad de los medicamentos desarrollados y registrados para uso humano. Desde entonces, en esta conferencia participan las agencias del medicamento de Europa, Japón y EUA, constituyéndose en una organización internacional generadora de guías y recomendaciones unificadas para su cumplimiento por parte de las industrias farmacéuticas, de manera que se asegure la calidad de los medicamentos comercializados en los países que adoptan el cumplimiento de lo indicado en las correspondientes guías.

Existen además otros organismos internacionales que establecen recomendaciones para la evaluación de los medicamentos biotecnológicos, como es la Food and Drug Administration (FDA) o al European Medicine Agency (EMA) o incluso sistemas nacionales de salud, como el NHS (National Health System) del Reino Unido. No obstante, en general todos ellos parten de las indicaciones generales recogidas en las guías de la organización ICH.

Entre otras, las guías ICH establecen recomendaciones sobre el desarrollo de los estudios de estabilidad en biofármacos. Concretamente, las guías Q5A a Q5E están dirigidas a la calidad de los productos biotecnológicos (Quality of Biotechnological Products). Dentro de ellas, la guía Q5C tiene como propósito armonizar sobre los estudios requeridos para la evaluación de la estabilidad de los productos biotecnológicos/biológicos (Stability Testing of Biotechnological/Biological Products). Concretamente la guía Q6B (Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products) indica qué tipo de caracterización y qué tipo de análisis deben de realizarse para poder realizar una adecuada descripción de la estabilidad de un medicamento y/o producto farmacéutico biotecnológico. Se destacan en ella, como aspectos importantes en la caracterización de los medicamentos y productos biotecnológicos, el estudio de propiedades físicoquímicas y de la actividad biológica.

La regulación aplicable en México para este tema se aborda en la Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015, “*Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios*”, en cuyo contenido se establecen las especificaciones y los requisitos de los estudios de estabilidad, su diseño y ejecución, que deben de efectuarse a los fármacos, medicamentos, así como a los remedios herbolarios para uso humano, que se comercialicen en territorio nacional, así como aquellos medicamentos con fines de investigación.

Existen algunos lineamientos en regulación nacional e internacional a considerarse como:

Para un medicamento nuevo, los estudios de estabilidad deben llevarse a cabo en al menos 3 lotes de producción, o lotes piloto del medicamento, provenientes de un sitio de desarrollo o de producción, fabricados con la misma fórmula cualitativa utilizada en los estudios clínicos fase III y aplicando el método de fabricación que simule el proceso que será usado en la fabricación de los lotes de producción para ser comercializados.

Para un medicamento conocido o genérico los estudios de estabilidad deben llevarse a cabo en al menos 3 lotes de producción o lotes piloto del medicamento, y aplicando el método de fabricación que simule el proceso que será usado en la fabricación de los lotes de producción para comercialización.

Cuando sea posible los lotes del medicamento deben ser producidos utilizando diferentes lotes del fármaco.

Se deben elegir las condiciones de los estudios de estabilidad de acuerdo a las condiciones declaradas en el marbete para cada medicamento o dispositivo médico de acuerdo a lo dispuesto en la normatividad, tanto nacional e intencional, vigente.

Los estudios deben llevarse a cabo en el mismo envase primario propuesto para su almacenamiento y distribución.

2.5. FOTOESTABILIDAD

La degradación de un fármaco es un problema que afecta la vida de anaquel de todo medicamento, dando como resultado un cambio en su apariencia, estructura, actividad y/o potencia. Dicho problema es causado por la luz ultravioleta proveniente de fuentes como el sol y la iluminación artificial. También hay otros factores que causan dicho fenómeno como el calor y el envejecimiento natural del producto o excipientes.

El presente trabajo de investigación será sustentado por bases teóricas y apoyadas por datos experimentales en una forma objetiva e interpretadas en la misma forma para llegar a conclusiones que sirvan de apoyo para las tomas de decisiones en la selección, almacenamiento, formulación y utilización de materiales en la fabricación del Rituximab.

Los fármacos afrontan un problema, que es el cambio de las propiedades físico-química-biológicas que es provocada por la luz conocida como fotoestabilidad. La luz es un agente potente que puede generar síntesis y descomposición. Los medicamentos son muy variables a la susceptibilidad de la luz solar, luz ultravioleta, luz fluorescente y la luz infrarroja y, por consiguiente, al cambio de sus propiedades.

La fotoestabilidad de un fármaco puede definirse como la respuesta del fármaco o producto farmacéutico a la exposición a la luz solar, UV y visible en estado sólido, semisólido o líquido que conduce a un cambio físico o químico.

La respuesta del fármaco a la absorción y excitación de la luz se puede considerar en términos de reacciones de fotodegradación (fotólisis) a través de la formación de radicales libres o reacciones de fotosensibilización por transferencia de energía intermolecular. Estas reacciones involucran reacciones primarias (fotoquímicas) y secundarias (químicas) que dan los productos finales.

En vista de la fotosensibilidad y la fotoinestabilidad de los fármacos y adyuvantes, es necesario conocer la fotoestabilidad de estas sustancias y sus productos formulados para evaluar lo siguiente:

- (i) Las características intrínsecas de fotoestabilidad.
- (ii) Los cambios físicos y químicos tras la exposición a la luz.
- (iii) Las vías y mecanismos de fotodegradación.
- (iv) La vida útil de los productos.
- (v) La eficacia de los agentes estabilizadores en la fotoestabilización.
- (vi) La necesidad de modificación de los parámetros de formulación.
- (vii) La necesidad de medidas para superar los efectos de la exposición a la luz durante la fabricación, el envasado, el etiquetado, el transporte y el almacenamiento.
- (viii) Los efectos biológicos inducidos por la luz.
- (ix) El diseño del paquete primario y secundario.

Los requisitos para los estudios de fotoestabilidad, considera lo siguiente:

- (i) La solubilidad del fármaco y elección del medio de reacción.
- (ii) Las características espectrales de la molécula del fármaco.
- (iii) La sensibilidad de la molécula del fármaco a la luz solar, UV y visible.
- (iv) El recipiente de reacción y la fuente de radiación apropiada para las características espectrales de la molécula del fármaco.
- (v) El conocimiento del modo de fotodegradación y la naturaleza de los fotoproductos de los estudios preliminares.
- (vi) Un método de ensayo indicador de estabilidad validado para determinar el fármaco intacto y los fotoproductos en el material degradado.

2.5.1. Luz Solar.

La luz solar es una mezcla de radiaciones de distintas longitudes de onda (λ). La longitud de onda, es la distancia entre dos puntos idénticos de dos ciclos repetitivos adyacentes de la onda. Las radiaciones electromagnéticas propagadas por el sol y que llegan a la tierra contienen un rango de longitud de onda que va de los rayos gamma hasta ondas de radio.

Muchas de estas ondas electromagnéticas son filtradas por la atmósfera, pero una porción de la región de ultravioleta que posee una longitud de onda de 290 o 400 nm, llega hasta la superficie de la tierra.

2.5.2. Luz Visible.

Se llama espectro visible a la región del espectro electromagnético que el ojo humano es capaz de percibir. A la radiación electromagnética en este rango de longitudes de onda se le llama luz visible o simplemente luz.

No hay límites exactos en el espectro visible: el ojo humano típico responderá a longitudes de onda de 380 a 750 nm, aunque en casos excepcionales algunas personas pueden ser capaces de percibir longitudes de onda desde 310 hasta 1050 nm.^[29] Los arcos iris son un ejemplo de refracción del espectro visible. El «color más visible» es el amarillo

El amarillo es el color que se percibe ante la fotorrecepción de una luz cuya longitud de onda dominante mide entre 574 y 582 nm. Se encuentra a la coloración característica de la piel del limón maduro, de la flor del diente de león, de las abejas o del oro.

La luz solar que llega a la superficie terrestre se compone de tres longitudes de onda que son la ultravioleta (UV), la visible (VIS) y la infrarroja (IR). (Figura 9)

La luz puede ser descrita por su longitud de onda, para lo cual el nanómetro (nm) es una conveniente unidad de longitud. Un nanómetro es 1/1,000,000 de milímetro (mm).

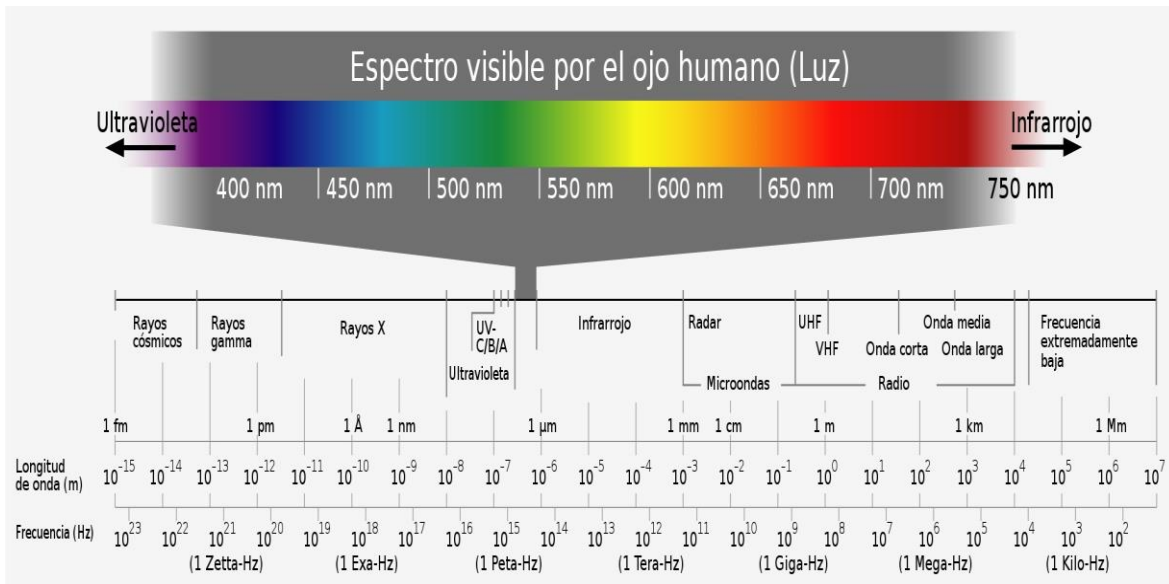


Figura 9. El Espectro electromagnético

Por encima de la frecuencia de las radiaciones infrarrojas se encuentra lo que comúnmente es llamada luz, un tipo especial de radiación electromagnética que tiene una longitud de onda en el intervalo de 0,4 a 0,8 micrómetros. Éste es el rango en el que el sol y las estrellas similares emiten la mayor parte de su radiación. Probablemente, no es una coincidencia que el ojo humano sea sensible a las longitudes de onda que emite el sol con más fuerza. Las unidades usuales para expresar las longitudes de onda son el armstrong y el nanómetro.

La luz que perciben los ojos es realmente una parte muy pequeña del espectro electromagnético. La radiación electromagnética con una longitud de onda entre 380 nm y 760 nm (790-400 THz) es detectada por el ojo humano y se percibe como luz visible. Otras longitudes de onda, especialmente en el infrarrojo cercano (más de 760 nm) y ultravioleta (menor de 380 nm) también se refiere a veces como la luz, aún cuando la visibilidad a los seres humanos no es relevante. Si la radiación que tiene una frecuencia en la región visible del espectro electromagnético se refleja en un objeto, por ejemplo, un tazón de fruta, y luego golpea los ojos, esto da lugar a la percepción visual de la escena. El sistema visual del cerebro procesa la multitud de frecuencias que se reflejan en diferentes tonos y matices, y a través de este fenómeno psicofísico, no del todo entendido, la mayoría de la gente percibe un tazón de fruta; un arco iris muestra la óptica (visible) del espectro electromagnético.^[30]

2.5.3. Luz Ultravioleta.

Se denomina radiación ultravioleta o radiación UV a la radiación electromagnética cuya longitud de onda está comprendida aproximadamente entre los 100 nm (100 E-09 m) y los 400 nm (400 E-09 m). Su nombre proviene del hecho de que su rango empieza desde longitudes de onda más cortas de lo que el ojo humano identifica como luz violeta, pero dicha luz o longitud de onda, es invisible al ojo humano al estar por encima del espectro visible.

Esta radiación es parte integrante de los rayos solares y produce varios efectos en la salud al ser una radiación entre ionizante y no-ionizante. ^[31]

Los rayos ultravioleta son invisibles para la mayoría de los seres humanos. El lente del ojo humano bloquea la mayor parte de la radiación en el rango de longitud de onda de 300-400 nm (nanómetros); las longitudes de onda más cortas son bloqueadas por la córnea. ^[32]

La luz ultravioleta es una porción de la energía solar y en menor grado de la luz artificial. La luz UV puede ser radiada por tubos de cuarzo que contienen vapor de mercurio (emisor), cuando se induce una corriente en los polos, se genera un arco voltaico que ioniza a los átomos del mercurio, donde los electrones incrementan su energía hasta convertirlo en fotones de luz UV. Su longitud de onda va de 295 a 400 nanómetros, sin embargo, la CIE (Comisión Internacional de Iluminación, publicación No 20) hace una distinción en el espectro de la luz ultravioleta en tres regiones:

A) UVA tiene un rango de 315 a 400 nm.

- Produce ligera degradación de polímeros.
- Produce curtido solar, no quemaduras.
- Usado para probar fibras y materiales para interiores.
- No es absorbido por el vidrio de las ventanas.

B) UVB tiene un rango de 280 a 315 nm.

- Es la más corta de las longitudes de onda del espectro solar sobre la tierra.
- Produce mayor grado de degradación de polímeros.
- Produce quemaduras solares.
- Es absorbido por el vidrio de las ventanas.

C) UVC tiene un rango de menos de 280 nm.

- Solo se encuentra en el espacio exterior.
- Es absorbido por la capa de ozono de la atmósfera.
- Mata a los microorganismos.^[33]

Según su longitud de onda, se distinguen varios subtipos de rayos ultravioleta ^[33]

Tabla 4. Subtipos de rayos ultravioleta según su longitud de onda

NOMBRE	ABREVIATURA	LONGITUD DE ONDA (NM)	ENERGÍA POR FOTÓN (EV)	NOTAS/ NOMBRES ALTERNATIVOS
Ultravioleta a (onda larga)	UVA	400-315	3,10-3,94	UV de onda larga, luz negra, no absorbida por la capa de ozono: UV suave.
Ultravioleta b (onda media)	UVB	315-280	3,94-4,43	UV de onda media, principalmente absorbido por la capa de ozono: UV intermedio; radiación Dorno.
Ultravioleta c (onda corta)	UVC	280-100	4,43-12,40	UV de onda corta, UV germicida, radiación ionizante en longitudes de onda más cortas, completamente absorbida por la capa de ozono y la atmósfera: UV duro.
Ultravioleta cercano (<i>near</i>)	NUV	400-300	3,10-4,13	Visible para pájaros, insectos y peces.
Ultravioleta medio (<i>middle</i>)	MUV	300-200	4,13-6,20	
Ultravioleta lejano (<i>far</i>)	FUV	200-122	6,20-10,16	Radiación ionizante en longitudes de onda más cortas.
Línea lyman-alpha	H Lyman- α / Ly- α	122-121	10,16-10,25	Línea espectral a 121,6 nm, 10,20 eV.
Ultravioleta de vacío	VUV	200-10	6,20-124	Muy absorbido por el oxígeno atmosférico, aunque las longitudes de onda de 150 a 200 nm pueden propagarse a través del nitrógeno.
Ultravioleta extremo	EUV	121-10	10,25-124	Radiación totalmente ionizante según algunas definiciones; completamente absorbido por la atmósfera.

2.6. TÉCNICAS PARA EVALUACIÓN DE MOLÉCULAS FOTOSENSIBLES RESULTANTES.

2.6.1. Abs₃₂₀ nm.

La espectrofotometría se basa en la medida de la absorción, por diferentes sustancias, de una radiación electromagnética de longitud de ondas situadas en una banda definida y estrecha, esencialmente monocromática. La banda espectral empleada en las mediciones se extiende desde las longitudes de onda corta de la zona ultravioleta (190 nm a 380 nm) hasta la visible (380 nm a 780 nm) del espectro.

Esta técnica ajustada a una longitud de onda de 320 nm se utiliza para detectar agregados insolubles, que son partículas grandes que dispersan la luz, diferentes de las proteínas solubles que no dispersan la luz en esta longitud de onda.

El fundamento de la espectroscopia se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro UV/visible.

2.6.2. Potencial zeta.

Tiene por propósito medir el potencial electrostático en la doble capa eléctrica que rodea una molécula en solución.

El potencial zeta es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática (o de carga) entre las moléculas (o partículas), y es uno de los parámetros fundamentales que se sabe que afectan la estabilidad. Su medición aporta información detallada de las causas de la dispersión, agregación o floculación, y se puede aplicar para mejorar la formulación de dispersiones, emulsiones y suspensiones.

Para medir el potencial zeta, se aplica un campo eléctrico a 20 V por medio de electrodos inmersos en la muestra provocando que las partículas cargadas se muevan a través del campo eléctrico detectándose su movimiento por medio de un LASER a una longitud de onda normalmente de 658 nm.

Los parámetros que influyen en dicho movimiento son: la viscosidad del solvente, el tamaño de la partícula, su forma y carga que se encuentran descritos en la fórmula con la que describe su cálculo:

$$\zeta = 0.008 + 0.026 \log_{10}(C)$$

Siendo (C) la concentración de sales del electrolito en mol/litro, y ζ el potencial zeta en volts (Una expresión del mismo obtenida por ajuste de datos por Pride y Morgan para concentraciones de sales menores a 0.5 mol/litro).

A mayor velocidad, mayor la carga de la molécula y mayor potencial zeta, ya que los demás parámetros son constantes. Normalmente por arriba de +/-20 mV se puede considerar que las soluciones o suspensiones son estables.

2.6.3. Fluorimetría diferencial de barrido (DSF).

La fluorimetría de barrido diferencial es una técnica termoanalítica en la que se coloca un fluoróforo hidrofóbico junto con la proteína de la que se quiere saber su temperatura media (T_m). El fluoróforo se une a una proteína conforme se despliega al aumentar la temperatura de la muestra. Dado que con el aumento de la temperatura sus puentes de hidrógeno se rompen, expone aminoácidos hidrofóbicos con lo que se favorece la unión del sensor. Dicho fluoróforo al unirse a una molécula mucho mayor, reduce su movimiento browniano significativamente aumentando la probabilidad de que los fotones del LASER que radían la muestra exciten sus electrones π , fluoresciendo. La máxima pendiente de fluorescencia se toma en su punto de inflexión y como la T_m de la molécula que se analiza. Se conoce que a mayor T_m , mayor estabilidad de la molécula en anaquel y por tanto una mayor extensión de su fecha de caducidad. Por lo cual forma un método crítico para evaluar el estado molecular de una proteína.

DSF se ha encontrado como una aplicación casi universal en el estudio de macromoléculas biológicas. La DSF define de manera cualitativa la T_m aparente de una molécula, unión a su ligando y para evaluar la estabilidad térmica de una formulación. La DSF puede dilucidar los factores que contribuyen al plegado y estabilidad de las biomoléculas nativas. Estos rearrreglos estructurales dan lugar a la absorción de calor causada por la redistribución de enlaces no covalentes. Estos factores incluyen interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno y entropía de conformación. Al formar estructuras bien definidas las biomacromoléculas se someten a cambios de conformación técnicamente inducidos.

2.6.4. Cromatografía CEX-UPLC.

La cromatografía de intercambio catiónico es una forma de cromatografía de intercambio iónico (IEX), que se utiliza para separar moléculas en función de su carga superficial neta. La cromatografía de intercambio catiónico, más específicamente, utiliza una resina de intercambio iónico cargada negativamente la cual tiene afinidad por las moléculas que tienen cargas superficiales positivas netas.

2.6.5. Potencia Biológica por Citotoxicidad Dependiente de Complemento (CDC).

El análisis está basado en la capacidad de la muestra para inducir citólisis dependiente del complemento (CDC) en células que expresan CD20 en presencia de complemento humano. La viabilidad de las células, después de un tratamiento con la muestra se mide utilizando un reactivo redox que genera fluorescencia después de que ha sido absorbido y metabolizado por células vivas. Tras la muerte celular inducida por algún factor apoptótico o tóxico.

2.6.6. Dispersión de luz dinámica (DLS).

Esta técnica utilizada para determinar el tamaño promedio de una partícula y de la distribución de tamaños, para partículas disueltas y suspendibilidad en un líquido (intervalo de 2 nm – 2 mm). Basada en el efecto Doppler, se incide un haz de luz láser en un medio que contiene las muestras. La correlación espacial disminuye con el tiempo, de manera que el instrumento puede evaluar el tiempo en el cual una molécula o partícula permanece en una posición dada. A mayor tamaño de la molécula se mueve más lento y existe una mayor correlación respecto del tiempo. Y es directamente proporcional dicha correlación a su tamaño.

3. ANTECEDENTES.

3.1. FOTOESTABILIDAD EN PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS.

Se ha documentado la susceptibilidad de las proteínas recombinantes con actividad terapéutica, de sufrir modificaciones en su estructura primaria, secundaria o terciaria derivadas de su exposición a la luz, que podrían ocasionar cambios en su actividad e inmunogenicidad (Figura 10), siendo los principales blancos de sensibilidad los enlaces peptídicos de la cadena principal, así como los aminoácidos triptófano, tirosina, fenilalanina y cisteína, traduciendo en los efectos perjudiciales predominantes: la fotoagregación y la fotodegradación.

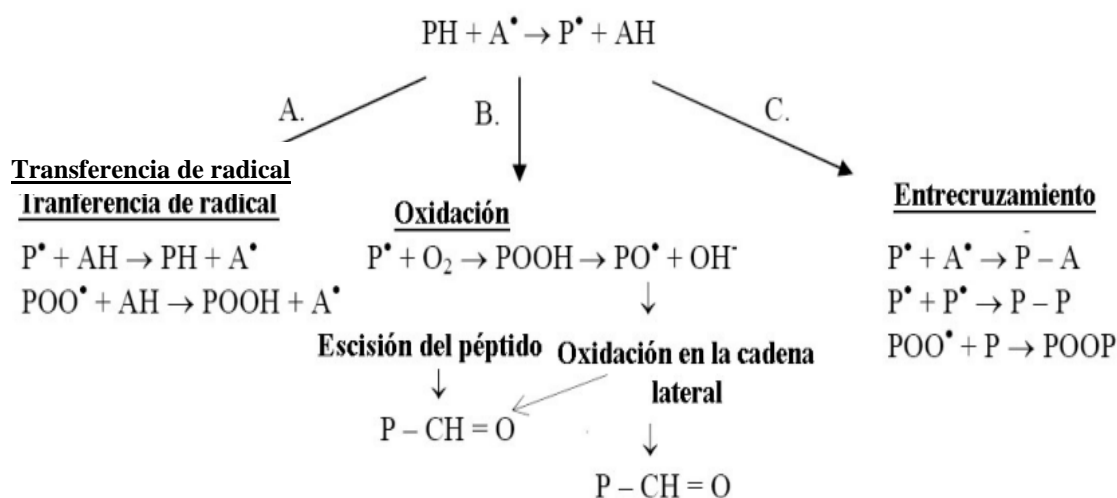


Figura 10. Fotooxidaciones, fotodegradaciones en proteínas. Sun Protection in Man, P.U. Giacomoni, 2001 Elsevier Science B.V

Los estudios de degradación controlada son cruciales en los estudios de desarrollo de medicamentos, incluidos los biotecnológicos. [26]

Ellos constituyen una herramienta necesaria a la hora de evaluar robustez de un producto a diversas situaciones, incluida la luz. En este caso concreto, existe una guía de recomendaciones sobre como degradar controladamente el medicamento: la ICH Q1B (Stability Testing. Photostability Testing of New Drug Substances and Products). En ella se establecen las condiciones para exponer medicamentos a la radiación electromagnética.

Si bien existen algunas referencias del impacto de la radiación ultravioleta en anticuerpos monoclonales como es el caso del artículo *Effect of UVC Irradiation on the Oxidation of Histidine in Monoclonal Antibodies*, en el cual oxidan residuos de histidina en fármacos de anticuerpos monoclonales de inmunoglobulina gamma 1 (IgG1) utilizando radiación ultravioleta C (UVC: 200–280nm), y llegan a la conclusión de que el daño debido a la fotooxidación UVC de los residuos de histidina se pueden evitar en condiciones ácidas donde se protona el anillo de imidazol de la estructura ^[22], es escasa la información particular de fotooxidaciones para el anticuerpo Rituximab.

4. JUSTIFICACIÓN.

Si bien existen algunas referencias del impacto de la radiación ultravioleta en anticuerpos monoclonales, es escasa la información particular de fotooxidaciones para el anticuerpo Rituximab. El presente trabajo busca ahondar en el conocimiento básico del impacto de la irradiación solar y de luz ultravioleta controlada bajo condiciones de la guía de estudios de estabilidad ICH Q1b, de tal forma que esta información contribuya en el conocimiento del control de la fotoestabilidad del medicamento, ya que este parámetro no ha sido tan ampliamente estudiado en esta proteína

5. HIPÓTESIS.

El anticuerpo monoclonal Rituximab se fotodegrada proporcionalmente a las intensidades de irradiación de luz solar y ultravioleta, generando modificaciones relacionadas principalmente con el aumento de agregados, disminución de su temperatura media (T_m), variantes de carga ácida y disminución de la potencia de Citotoxicidad celular dependiente del complemento (CDC).

6. OBJETIVOS.

6.1. General.

Evaluar mediante una caracterización fisicoquímica y biológica los cambios que se deriven de la fotoexposición del anticuerpo monoclonal Rituximab considerando las condiciones de uso en vida real y las referidas por la guía de la Conferencia Internacional sobre Armonización ICH Q1B.

6.2. Objetivos específicos

- ◆ Exposición del anticuerpo monoclonal Rituximab a diferentes condiciones de luz, tanto en las establecidas en la guía ICH Q1B como en condiciones de radiación solar, para inducir la formación de moléculas de degradación.
- ◆ Caracterización de la molécula de Rituximab por medio de técnicas fisicoquímicas ($Ab_{S_{320}}$ nm, Potencial zeta, Fluorometría Diferencial de Barrido

(DSF), Cromatografía de intercambio iónico (CEX-UPLC-FLR), Dispersión de Luz Dinámica (DLS) y biológicas (Potencia biológica por Citólisis dependiente de complemento (CDC), para evaluar si existen formas degradadas.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

La fotoexposición de Rituximab formulado se realizó en tres condiciones que incluyen:

- Exposición de Rituximab a la luz solar directa a través de ventana
- Exposición de Rituximab a la luz solar difusa a través de una ventana
- Exposición de Rituximab a la luz en condiciones ICH

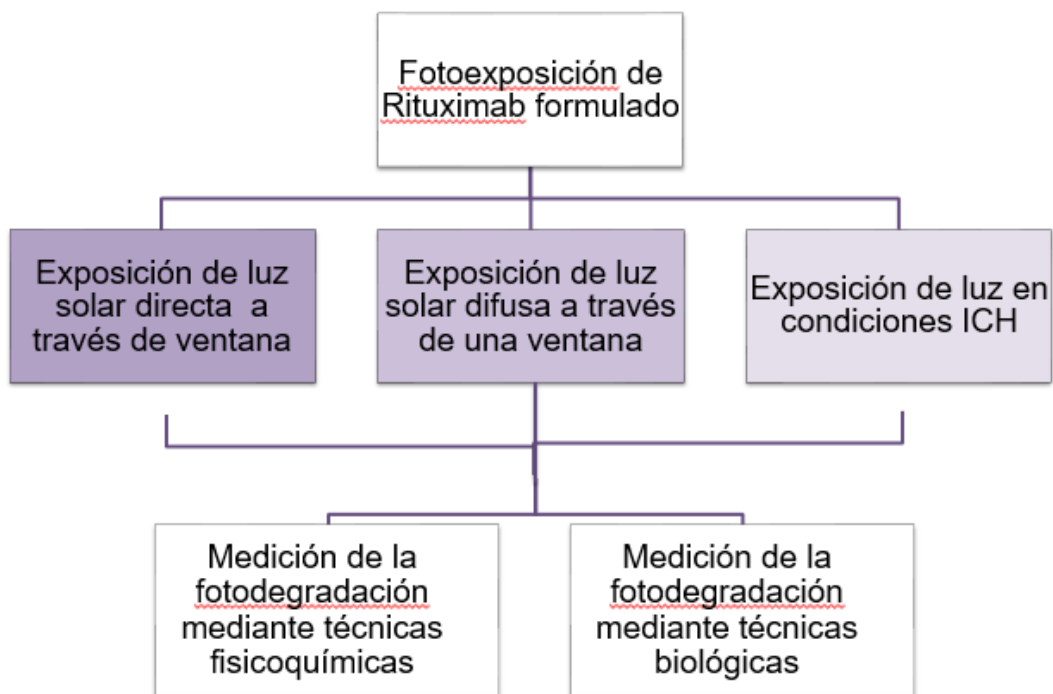


Figura 11. Estrategia de fotoexposición de las muestras de Rituximab

A continuación se describen las condiciones de cada una de las tres condiciones antes mencionadas:

7.1. EXPOSICIÓN DE RITUXIMAB A LA LUZ SOLAR DIRECTA A TRAVÉS DE VENTANA.

Se realizó un estudio exponiendo Rituximab formulado en un medicamento Rituximab 10 mg/mL, solución inyectable, en envase primario cerrado, en posición vertical a una iluminación con exposición directa al sol con una irradiación de 280-400 nm (UVB 280-320 y UVA 320-400), por un tiempo de 1 y 2 h, de 8°C a aprox. 37.5 - 39 °C.

Se expuso un control oscuro (protegido con envase secundario) a una exposición con iluminación con exposición directa al sol, con una irradiación de 300-800 nm (UVB y UVA), por un tiempo de 1 y 2 h, de 8 °C a aprox. 22 - 24 °C. El objeto de exponer el control en estas condiciones fue evidenciar la protección que proporciona el envase secundario y a su vez comparar si existía un efecto o no de degradación en las muestras.

7.2. EXPOSICIÓN DE RITUXIMAB A LA LUZ SOLAR DIFUSA A TRAVÉS DE UNA VENTANA

Se realizó un estudio exponiendo Rituximab formulado en un medicamento Rituximab 10 mg/mL, solución inyectable, en envase primario cerrado, en posición vertical. A una iluminación con exposición indirecta al sol a 10 cm y 1 m de distancia de una ventana, con una irradiación de 300-800 nm (UVB y UVA), por un tiempo de 1 y 2 h, de 8°C a aprox. 1 y 2 h, 8 °C a aprox. 23 - 24°C. Se utilizó un luxómetro digital para las mediciones de la intensidad de luxes de la radiación solar en que fue expuesto el producto.



Figura 12. Luxómetro digital Benentech. Mod. Gm1020 Rango 0~200,000 Lux

7.3. EXPOSICIÓN DE RITUXIMAB A LA LUZ EN CONDICIONES ICH

Realizar un estudio exponiendo Rituximab formulado en un medicamento, a una iluminación total de 1.2×10^6 lux-hora de luz en el rango visible y a una irradiación integrada de energía en ultravioleta cercano de 200 watts-h/m², manteniendo la cámara de fotoestabilidad permanentemente dentro de una cámara fría a $5 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$.

Se incluyó un “control oscuro” que correspondió al producto en evaluación completamente cubierto con hojas de aluminio para evitar el paso de luz, pero expuesto a las mismas condiciones y tiempo que las muestras problema.

El tiempo necesario para cubrir los requisitos de iluminación e irradiación fueron 10 días.

Tabla 5.- Datos del producto fotoexpuesto.

PARÁMETRO	DESCRIPCIÓN
DENOMINACIÓN DISTINTIVA:	NO APLICA
DENOMINACIÓN GENÉRICA:	<u>RITUXIMAB</u>
CONCENTRACIÓN:	COMO SOLUCIÓN INYECTABLE: 10 MG/ML
FORMA FARMACÉUTICA:	SOLUCIÓN INYECTABLE
SISTEMA CONTENEDOR-CIERRE:	COMO SOLUCIÓN INYECTABLE: VIAL VIDRIO CLARO TIPO I, 10 ML, BOCA 20 MM, TAPÓN BROMOBUTILO GRIS, 20 MM. CASQUILLO FLIP OFF, 20 MM.
FABRICANTE DEL MEDICAMENTO:	PROBIOMED SA DE CV, SAN ESTEBAN 88 COLONIA SANTO TOMÁS, AZCAPOTZALCO, CDMX.
SITIO DONDE SE REALIZA EL ESTUDIO EN CONDICIONES ICH	GRUPO IDEA®, AV. JOSÉ MARÍA MORELOS Y PAVÓN, FRACCIONAMIENTO LAS AMÉRICAS, C.P. 55076, ECATEPEC DE MORELOS, ESTADO DE MÉXICO.

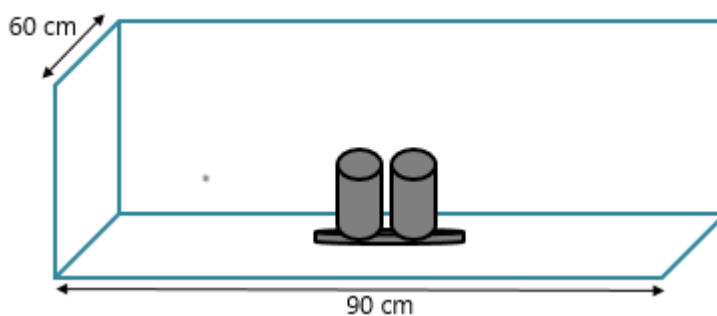


Figura 13. Medidas del módulo de fotoestabilidad.

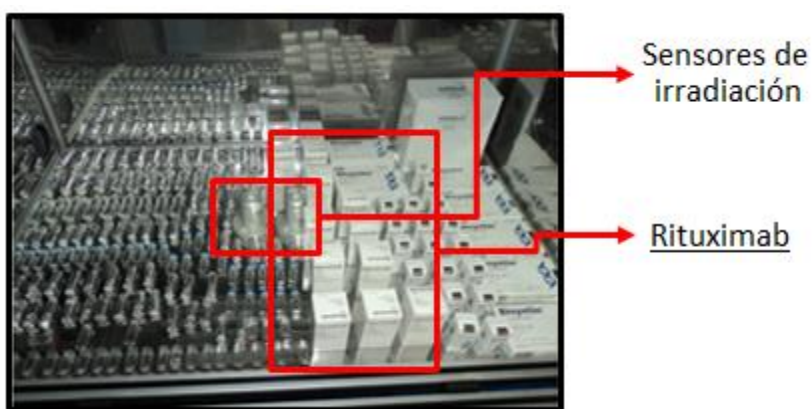


Figura 14. Fotoexposición de muestras de Rituximab en condiciones mencionadas en la ICH.

Una vez fotoexpuesto el producto, se realizaron las siguientes técnicas fisicoquímicas y biológicas para la evaluación de moléculas fotosensibles resultantes.

- Abs₃₂₀ nm
- Potencial zeta
- Fluorometría Diferencial de Barrido (DSF)
- Cromatografía de intercambio iónico (CEX-UPLC-FLR)
- Potencia biológica por Citólisis dependiente de complemento (CDC)
- Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Reactivos y materiales usados.

Durante la ejecución de este estudio se utilizaron los siguientes reactivos y materiales: Acetonitrilo grado analítico (ACN), ácido cítrico, ditioneitol (DTT), acetato de sodio, citrato de sodio, fosfato diácido de sodio mono hidratado, fosfato dibásico de sodio dihidrato, 2-ácido (N-morfolino) etanosulfónico (MES), cloruro de sodio, fosfato dibásico heptahidratado y sulfato de sodio, de J.T. Baker (Center Valley, Pensilvania, EE. UU.). Los materiales de grado analítico, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, urea, ácido trifluoroacético, acetonitrilo, agua, tripsina y ácido fórmico se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EE. UU.). Protein Thermal Shift Kit® se obtuvo de Applied Biosystems (Waltham, MA, EE. UU.).

El agua desionizada utilizada para todos los análisis (excepto MS) se obtuvo de un sistema de purificación Millipore Milli-Q. FBS (CAT SH30071) de Hyclone y medio RPMI 1640 con rojo fenol, con L-glutamina, sin bicarbonato de sodio, se obtuvieron de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EE. UU.). El producto farmacéutico Rituximab utilizado en este estudio fue producido internamente por Probiomed S.A. de C.V (Ciudad de México, México). En este estudio se utilizaron lotes del producto Rituximab formulados en tampón citrato (25 mM), NaCl (mM) y PS80 (0,18 %), a pH 6,5. Todas las soluciones se filtraron a través de una membrana de polipropileno hidrófilo de 0,2 µm de Merck Group (Darmstadt, Alemania) excepto las muestras de potencial DLS y Zeta que se filtraron a través de 0,1 µm.

Particularmente para los ensayos biológicos se utilizaron los reactivos: Línea celular WIL2S (ATCC No. CRL-8885), Estándar de Rituximab interno de Probiomed S.A. de C.V., Alamar Blue (Biosource, Cat. DAL1025), Azul tripano (SIGMA No. T6146), Albumina bovina (Calbiochem, Cat. 12657), Complemento de suero humano (Quidel, Cat. A113), Dextrosa (JTBaker, Cat.1916-01), Dimetil sulfóxido (Sigma Aldrich, Cat. D2650-5XML), Eritrosina B (Sigma Aldrich, Cat.200964-5), Gentamicina 50 mg/mL (Gibco, Cat. 15750-078), Medio RPMI 1640 (1X), líquido (Gibco, Cat. 22400-071), Suero fetal bovino certificado (Gibco, Cat. 16000-044)

8.2. Métodos.

8.2.1. Absorbancia a 320 nm.

Se utilizó un espectrofotómetro DU-650 Beckman para la detección de agregados insolubles utilizando una celda de cuarzo QS con paso de celda de 1 cm. Las muestras se analizaron a 10 mg/mL. Todas las muestras fueron esterilizadas por filtración (previo al estrés de la radiación solar) utilizando una membrana de 0,2 μm , que eliminó las partículas de gran tamaño que dispersaban la luz, las cuales no están relacionadas con la radiación.

La metodología para realizar las pruebas de absorbancia consistió en que:

- 1) Se filtraron las muestras a través de filtros acrodiscos con membranas de 0.2 μm .
- 2) Se encendió el espectrofotómetro UV-Visible Encender monitor y se esperó el término de ejecución de las pruebas diagnósticas del equipo.
- 3) Se establecieron las condiciones de medición (longitud de onda, ajuste de abertura de la rendija, ubicación de la celda).
- 4) Se encendió la lámpara de luz UV (190 nm – 380 nm). Se dejó calentar el equipo 15 minutos antes de la operación del equipo.
- 5) Se ajustó el equipo para las lecturas a 320 nm.



Figura 15. Espectrofotómetro Beckman

- 6) Se verificó que se usara la celda de cuarzo QS con paso de celda QS. Se colocó 1 mL de muestra en la celda. Se colocó en el portaceldas del equipo, verificando que el área transparente de la celda quedara en el trayecto del haz de luz.

- 7) Se corrió el espectro de absorción y se reportaron los valores obtenidos de las absorbancias.

8.2.2. Potencial Zeta

Las medidas de potencial zeta se realizaron en un instrumento Möbius (Wyatt). Las muestras a una concentración de 1 mg/mL se filtraron a través de membranas de 0.1 μm y se colocaron manualmente en la celda electroforética. La electroforesis se realizó a la oscilación eléctrica de 20 Hertz a 20 $^{\circ}\text{C}$, 2.5 V durante 15 s en modo LÁSER bajo (réplicas técnicas más biológicas $n = 3 + 3$). Después de la medición, también se verificó la ausencia de burbujas en la celda.

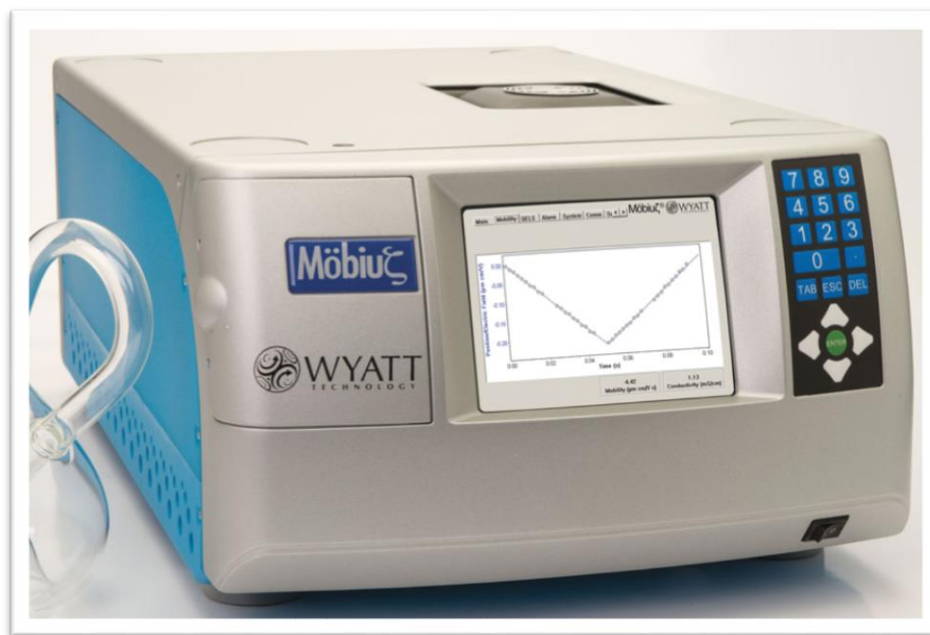


Figura 16. Analizador de potencial Z Mobius

8.2.3. Fluorimetría de barrido diferencial (DSF).

La desnaturalización de las especies fotodegradadas de Rituximab sin modificar (control) se realizó mediante adsorción Sybr Green (25x, 2 ml cada pocillo) y fluorescencia en una escala de temperatura de 1 $^{\circ}\text{C}$ cada 31 segundos de 24 a 93 $^{\circ}\text{C}$ (70 ciclos). El gradiente de temperatura se realizó en un termociclador 7500 Applied biosystems utilizando el protocolo proporcionado por el fabricante (Applied Biosystems).

El volumen final se ajustó a 40 μ L. La cantidad de proteína fue de aproximadamente 38 μ g por pocillo. La T_m se calculó utilizando la ecuación de Boltzmann 14 ajustada dentro de los límites de cada curva sigmoideal y los resultados se promediaron (n=6) utilizando el software Origin-Lab® versión 8.1 SR2. La estabilidad estructural y la resistencia a la desnaturalización inducida térmicamente se evaluaron comparativamente para el Rituximab no modificado (control) y el Rituximab expuesto directamente a la luz solar. Réplicas técnicas: n = 6.

8.2.4. Cromatografía de intercambio iónico (CEX-UPLC-FLR).

La cromatografía CEX de gradiente se realizó en un sistema UPLC de Acquity Waters. La metodología para realizar dichas pruebas consistió en:

- 1) La columna utilizada fue de Protein Pak SP (sulfopropil) 1000 Å, 4,6 x 100 mm, 7 μ m.
- 2) La temperatura de la columna se fijó en 30 °C. Se realizó una cromatografía de gradiente utilizando tampón MES de 10 mM a pH 6.5 como tampón de fosfato de 100 mM con NaCl de 500 mM como eluyente B a pH 6.5.
- 3) El gradiente cromatográfico se estableció de la siguiente manera: Fase B móvil de 5 a 20 % en 17 min, luego a 100 % en 0.1 min, siguiente 0.9 min a 5 % y otros 2 minutos se agregaron para el equilibrio.
- 4) El flujo de fase móvil se fijó en 0,8 ml/min. Se inyectaron 10 μ L en el sistema cromatográfico a 2 mg/ml y las muestras se mantuvieron a 15 °C durante los análisis.
- 5) La detección UV se realizó a 280 nm y la fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 275 nm y la detección de emisión a 340 nm.

Las muestras no expuestas se utilizaron como controles.

8.2.5. Actividad CDC

Se usaron células WIL-2S como células diana en el ensayo de CDC. Las células se sembraron en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con FBS al 10 %. Se prepararon diluciones en serie de Rituximab en presencia de células diana (50,000 células, 50 μ L/pocillo) y complemento de suero humano (Quidel) a una dilución de 1:5 (50 μ L por pocillo).

Las concentraciones finales de Rituximab en el ensayo fueron de 0.114, 0.0651, 0.0372, 0.0213, 0.0122, 0.00695, 0.00397 y 0 μ g/pocillo en diluciones en serie de 1:1.75 en un total de 150 μ L/pocillo. Se incubaron placas de poliestireno negro de fondo plano de 96 pocillos (Corning), cargadas con muestras, a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 2 h. Pasado este tiempo, se adicionaron a cada pocillo 20 μ L de Alamar Blue. Se incubaron 280 placas durante otras 24 h a 37 °C y se midió la fluorescencia en un espectrofotómetro Spectramax M3 con excitación a 530 nm y detección realizada a 590 nm (repeticiones biológicas; n = 3).

Dentro de la instrumentación utilizada están: Autoclave de doble puerta (OTSA No Serie 35596), Balanza analítica (Sartorius BP210D No. Serie 51109256), Balanza de doble platillo (OHAUS, Harvard Trip Balance), Campana de flujo laminar (Convion VRL 48 No. Serie 950264), Contador de células (Daiger, modelo KX6594), Dosificador de repetición (Eppendorf, Finnpiptete, Brand), Gabinete de seguridad biológica (Forma Scientific 1148 No. Serie 15791-251), Incubadora de CO₂ (Cellstar SWJ500TABA No. Serie 02QF-292374-OF), Lector de microplacas con fluorescencia (Spectra Max[®], Molecular Devices), Medidor del nivel de CO₂ (Bacharach Fyrite[®] No. Serie 119026), Microcentrífuga (Beckman GS 15No. Serie GXB95L05), Micropipeta monocal (Labsystem, Finnpiptete de 0.5-10, 5-40, 20-100, 20-200 y 200-1000 μ L), Microscopio invertido triocular (Nikon, modelo TMS-F, No serie 210447).

La metodología para realizar las pruebas de potencia fue:

- 1) Contar las células WIL2-S, diluirlas hasta una concentración de 1×10^6 células/mL en RPMI 1640.
- 2) Dispensar 50 μ L/pozo de la suspensión celular en la placa de 96 pozos negra con fondo claro y plano (concentración final 5×10^4 células/pozo) excluyendo los pozos de la periferia.

- 3) Colocar a la columna 11, 100 μL de medio de prueba para Rituximab (control celular)
- 4) Diluir el suero humano 1:5 en RPMI+0.1% BSA en un tubo de 15 mL (800 μL de suero + 3200 μL de medio).
- 5) Dispensar 50 μL de suero humano diluido en los pozos de la placa, excluyendo los pozos de la periferia.
- 6) Dispensar 150 μL de medio RPMI+0.1% BSA en los pozos de la periferia (“solamente medio”).
- 7) Preparar una curva estándar generando diluciones independientes por triplicado hasta llegar a una concentración de 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- 8) Diluir la muestra analizada a concentraciones de 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de acuerdo con la concentración de proteína.
- 9) Adicionar las curvas estándar y de muestra a la microplaca – 50 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ en el formato de placa.
- 10) Preparar en la placa diluciones seriales de 1:1.75.
- 11) Incubar la microplaca por 2 hrs. en una incubadora humidificada a 37 °C, 5 % de CO_2 .
- 12) Dispensar 20 μL de Alamar Blue a todos los pozos de la placa.
- 13) Incubar la placa toda la noche en una incubadora humidificada a 37 °C, 5 % de CO_2 .
- 14) Remover la placa de la incubadora.
- 15) Leer la fluorescencia a 530 nm para emisión, 590 nm para excitación.
- 16) El análisis de datos y los cálculos son realizados por líneas paralelas

8.2.6. Dispersión dinámica de luz.

El tamaño del radio hidrodinámico del Rituximab se puede medir mediante dispersión dinámica de la luz (DLS). La correlación entre la velocidad y el tamaño se calculó utilizando la ecuación límite de Rayleigh-Gans-Debye.

Las mediciones de radio hidrodinámico de Rituximab se realizaron en un instrumento Möbius (Wyatt) a una concentración de 1 mg/mL disuelto en tampón, utilizando una célula PMP de 1 cm de longitud de trayectoria. Las curvas se ajustaron al modelo de ajuste de regularización. Las mediciones se adquirieron durante 15 segundos (n=3). Se utilizó BSA de Thermo Scientific (2 mg/mL) como sustancia de referencia de radio hidrodinámico. Se utilizó una muestra no expuesta como referencia inicial del radio hidrodinámico.

La técnica de Dispersión Dinámica de Luz (DLS), por sus siglas en inglés, es un método absoluto y no destructivo que permite obtener el radio hidrodinámico (R_h) de partículas en solución. El R_h es el radio en nanómetros (nm) de una esfera sólida hipotética con un coeficiente de difusión traslacional (D_t) y viscosidad intrínseca (η) particulares.

Esta medición se logra mediante el monitoreo por parte de un módulo contador de fotones, de las fluctuaciones dependientes del tiempo de la luz dispersada por las partículas debido al movimiento Browniano (movimiento aleatorio de partículas en solución).

Las partículas con menor tamaño relativo se difunden más rápido causando fluctuaciones de intensidad más frecuentes que las partículas con mayor tamaño relativo. Una función de autocorrelación es calculada y graficada a partir de las fluctuaciones de intensidad con respecto al tiempo y el decaimiento de la función es ajustado para determinar el D_t de la partícula y de forma subsecuente, derivar el R_h .

La metodología para realizar las pruebas de dispersión dinámica de luz fue:

- 1) Ajustar las muestras de proteína a 1 mg/mL y filtrar por 0.2 μm .
- 2) Ajustar los parámetros del instrumento a lo declarado en la metodología.
- 3) Llenar una celda de PMP transparente con 1 mL de muestra.
- 4) Y leer en el instrumento la dispersión dinámica de las partículas

9. RESULTADOS.

Las soluciones de Rituximab en su recipiente de cierre primario (viales) se expusieron a la radiación solar a través de una ventana y a diferentes distancias de ella. Se probaron dos condiciones sobre este esquema, irradiación solar directa y radiación difusa, indicadas en el estudio como muestras SDL (luz solar directa) y SIL (luz solar indirecta), respectivamente.

Los perfiles de radiación solar indirecta se muestran en la siguiente Figura 17.

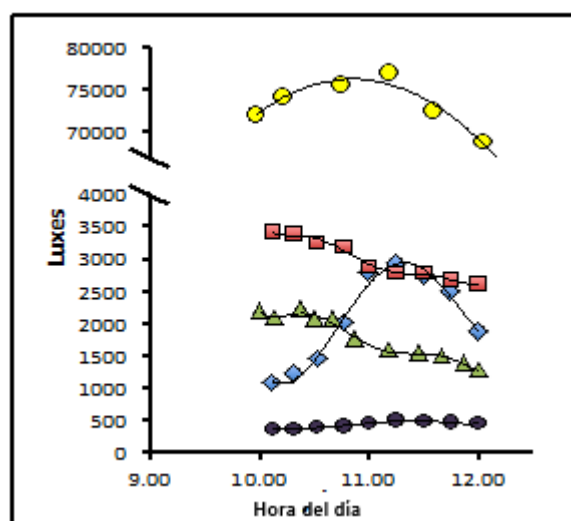


Figura 17. Perfiles de radiación solar indirecta.

Viales de Rituximab a 10 mg / mL en viales, se expusieron a radiación solar directa e indirecta a través de una ventana (difusa) A) Las muestras SDL fueron expuestas a radiación solar directa (○), B) Muestras de SILA con luz solar indirecta(◇), a 10 cm de ventana lejana, muestras SLIB con luz solar indirecta (□), a 1 m lejos de la ventana, y muestras SDLC (△) fueron expuestas a radiación solar directa dentro de los contenedores primario y secundario. El control se expuso a una lámpara fluorescente durante las 2 horas (●).

Las mediciones de iluminancia en diferentes lugares del cuarto de Probiomed S.A. de C.V. en que se hizo la exposición están escritas en la siguiente Tabla 6:

Tabla 6. Condiciones de exposición de rituximab a la luz solar directa y difusa a través de ventana.

Función	Muestras fotooxidadas	Acrónimo	Cantidad de iluminancia expuesta a las muestras	Horario
NA 3	Muestras expuestas directamente a la luz solar (SDL)	SDL 2h	145093	10 a 12 am
		SDL 1h	75537	10 a 12 am
		SDLC 2h	3514	10 a 12 am
		SDLC 1h	2017	10 a 12 am
1	Muestras expuestas indirectamente a la luz solar (SILA y SILB)	SILB 2h	5993	10 a 12 am
		SILB 1h	3259	10 a 12 am
2		SILA 2h	4223	10 a 12 am
		SILA 1h	1603	10 a 12 am
4	Control	Control	834	10 a 12 am

Las condiciones de exposición de Rituximab a la luz en condiciones ICH corresponden a una iluminación total de 1.2×10^6 lux-hora de luz en el rango visible y a una irradiación integrada de energía en ultravioleta cercano de 200 watts-h/m².

9.1. Absorbancia a 320 nm.

Se midió la absorbancia a 320 nm para detectar agregados insolubles, que son partículas grandes que dispersan la luz, diferentes de las proteínas solubles que no dispersan la luz en esta longitud de onda.

Tabla 7. Resultados de Absorbancia a 320 nm en muestras de Rituximab fotoexpuestas.

Condición	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	DE
SDL2h	0.04760	0.0489	0.0477	0.0481	0.0007
SDL1h	0.03740	0.0390	0.0454	0.0406	0.0042
SILA 2 h	0.03820	0.0402	0.0418	0.0401	0.0018
SILA 1 h	0.03600	0.0386	0.0405	0.0384	0.0023
SILB 2 h	0.03770	0.0406	0.0407	0.0397	0.0017
SILB 1 h	0.03680	0.0375	0.0407	0.0383	0.0021
ControlSDLC2h	0.04480	0.0400	0.0411	0.0420	0.0025
ControlSDLC1h	0.03750	0.0413	0.0380	0.0389	0.0021
ICHEP	0.0296	0.0296	0.0304	0.0299	0.0005
ICHES	0.029	0.0295	0.03	0.0295	0.0005
Control 2	0.0300	0.0300	0.0306	0.0302	0.0003

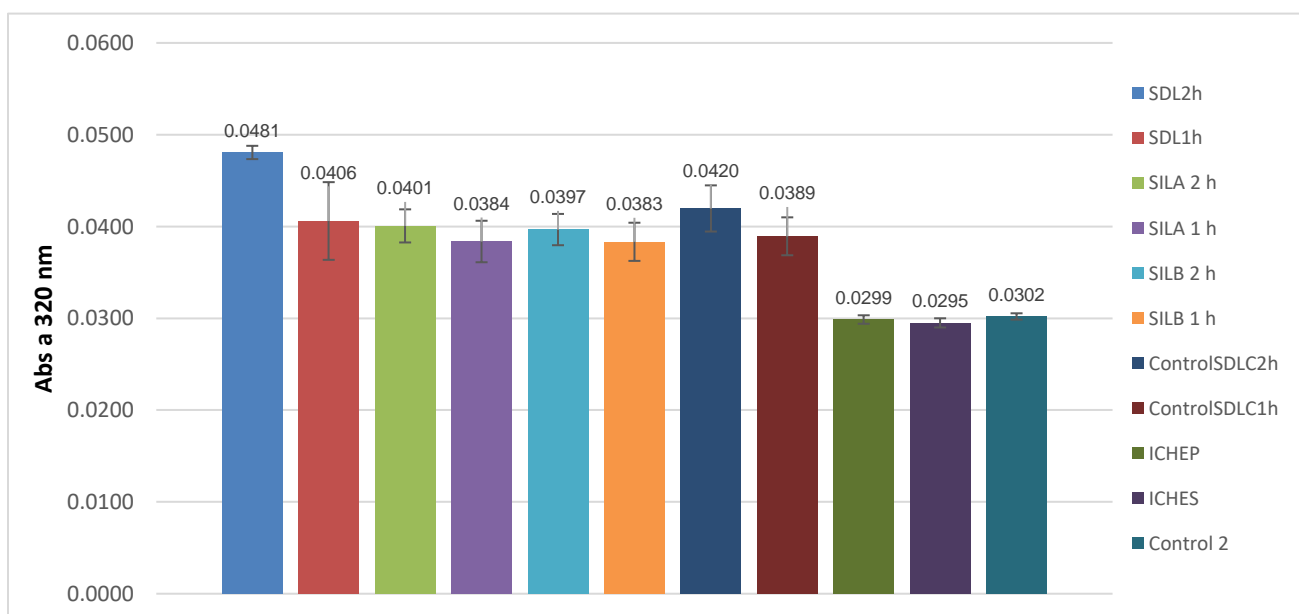


Figura 18. Resultados de Absorbancia a 320 nm en muestras de Rituximab fotoexpuestas

Tabla 8. Resultados de Abs 320 nm en muestras de Rituximab fotoexpuestas

Abreviatura	Descripción	Abreviatura	Descripción
SDL2h	Exposición solar directa, 2h	SDLC2h	Control de exposición solar (envase secundario) 2 h
SDL1h	Exposición solar directa, 1h	SDLC1h	Control de exposición solar (envase secundario) 1 h
SILA2h	Exposición difusa solar a 10 cm, 2h	ICHEP	Condiciones ICH, envase primario
SILA1h	Exposición difusa solar a 10 cm, 1h	ICHES	Condiciones ICH, envase secundario
SILB1h	Exposición difusa solar a 1m, 1h	Control 2	Control de exposición condiciones ICH
SILB2h	Exposición difusa solar a 1m, 2h		

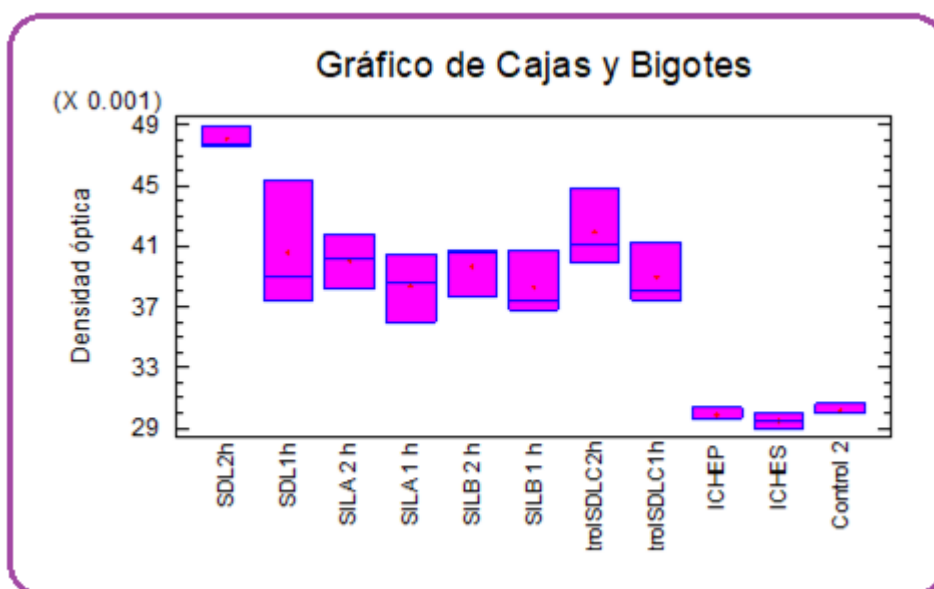


Figura 19. Gráfico de caja y bigotes, resultados de absorbancia a 320 nm

Fuente	Sumas de cuadrados	<i>g.l.</i>	Cuadrado Medio	Cociente-F	Valor-P
Entre grupos	9.92102E-04	10	9.92102E-05	24.15	0
Intra grupos	9.03933E-05	22	4.10879E-06		

Contraste de Hipótesis:

Hipótesis Nula: No existe diferencia entre los grupos o medias.

Hipótesis alternativa: Existe diferencia entre los grupos y las medias.

Puesto que el valor *p* de la prueba F es inferior a 0.05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias.

Por tanto, sí existe diferencia entre los grupos que se fotoexpusieron en condiciones diferentes.

9.2. Potencial Zeta

El potencial zeta es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática (o de carga) entre las partículas, y es uno de los parámetros fundamentales que se sabe que afectan la estabilidad.

El cambio de carga también cambia la estabilidad del Rituximab en solución, por lo que la medición del potencial Zeta cobró importancia para evaluar la estabilidad del anticuerpo.

Tabla 9. Resultados de potencial Z en muestras de Rituximab fotoexpuestas con envase secundario

Muestra	Temp Celda PALS (C)	Conductividad (mS/cm)	PALS Amplitud (V)	Movilidad ($\mu\text{m cm/s V}$)	Potencial Zeta (mV)	
						1
Media	20.0	15.47	0.022	-0.21	-4.41	
S	0.0	0.00	0.000	0.00	0.00	
%S	0.0	0.00	0.000	0.00	0.00	
S ²	0.0	0.00	0.000	0.00	0.00	
Min	20.0	15.47	0.022	-0.21	-4.41	
Max	20.0	15.47	0.022	-0.21	-4.41	

Tabla 10. Resultados de potencial Z en muestras de Rituximab fotoexpuestas

Muestra	Temp Celda PALS (C)	Conductividad (mS/cm)	PALS Amplitud (V)	Movilidad ($\mu\text{m cm/s V}$)	Potencial Zeta (mV)	
						1
Media	20.0	17.04	0.070	-0.48	-10.15	
S	0.0	0.00	0.000	0.00	0.00	
%S	0.0	0.00	0.000	0.00	0.00	
S ²	0.0	0.00	0.000	0.00	0.00	
Min	20.0	17.04	0.070	-0.48	-10.15	
Max	20.0	17.04	0.070	-0.48	-10.15	

Tabla 11. Resultados de potencial Z en muestras control

Muestra	Temp Celda PALS (C)	Conductividad (mS/cm)	PALS Amplitud (V)	Movilidad ($\mu\text{m cm/s V}$)	Potencial Zeta (mV)	
						1
Media	20.0	17.32	0.023	-0.26	-5.51	
S	0.0	0.00	0.000	0.00	0.00	
%S	0.0	0.00	0.000	0.00	0.00	
S ²	0.0	0.00	0.000	0.00	0.00	
Min	20.0	17.32	0.023	-0.26	-5.51	
Max	20.0	17.32	0.023	-0.26	-5.51	

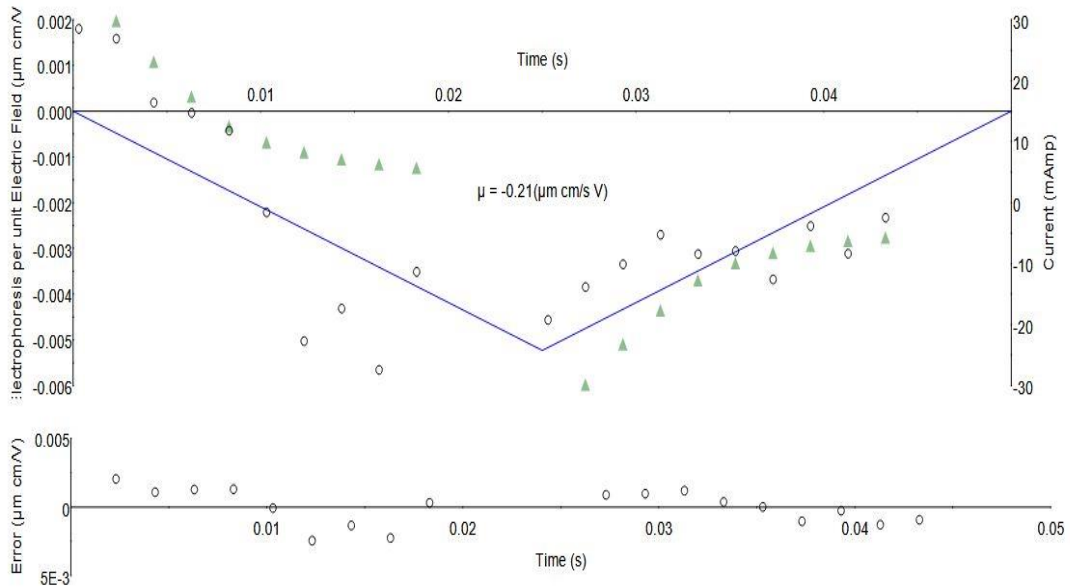


Figura 20. Gráfico de Potencial Z en muestras de Rituximab fotoexpuestas con envase secundario.

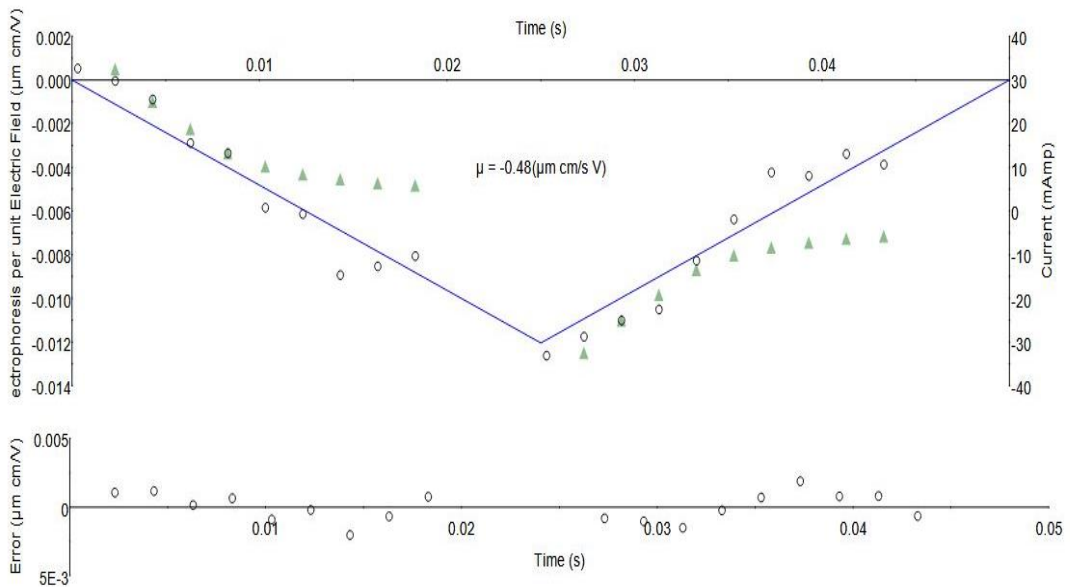


Figura 21. Gráfico de Potencial Z en muestras de Rituximab fotoexpuestas.

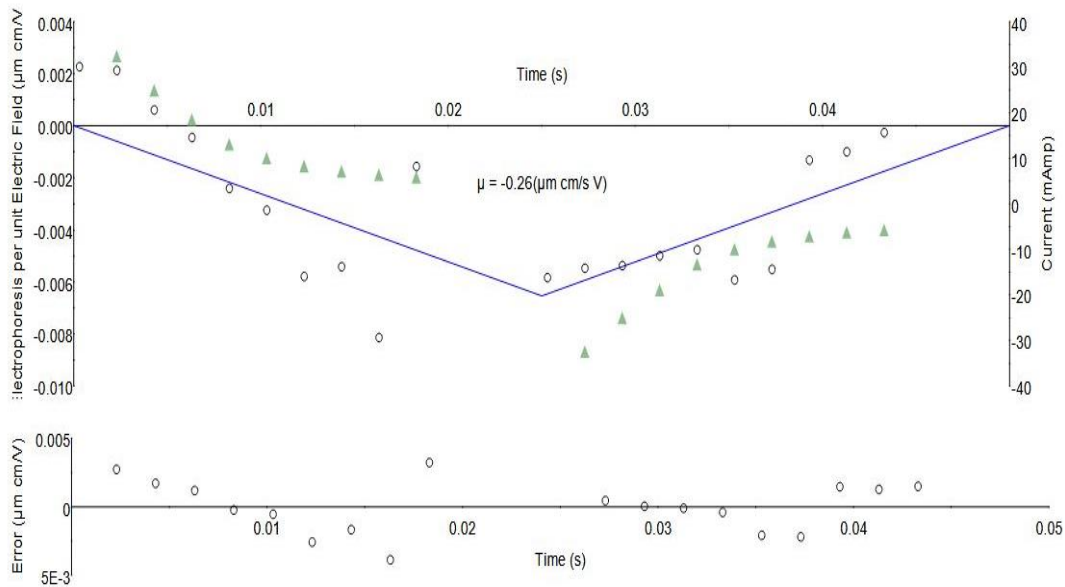


Figura 22. Gráfico de Potencial Z en muestras control

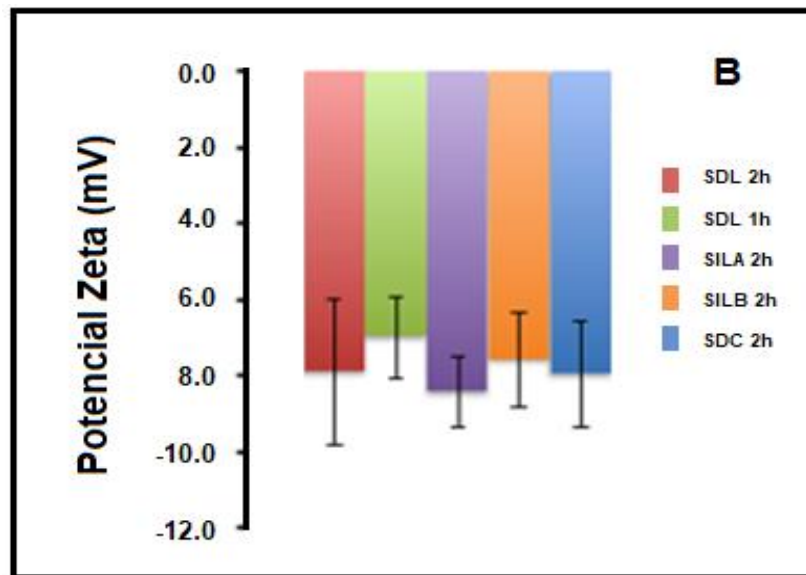


Figura 23. Resultados de potencial Z en muestras de Rituximab fotoexpuestas

Derivado de medir la carga superficial de las partículas en la inter-fase de la primera capa iónica y la capa difusa, entre las muestras medidas no se observa una diferencia entre ellas.

9.3. Fluorimetría diferencial de barrido (DSF).

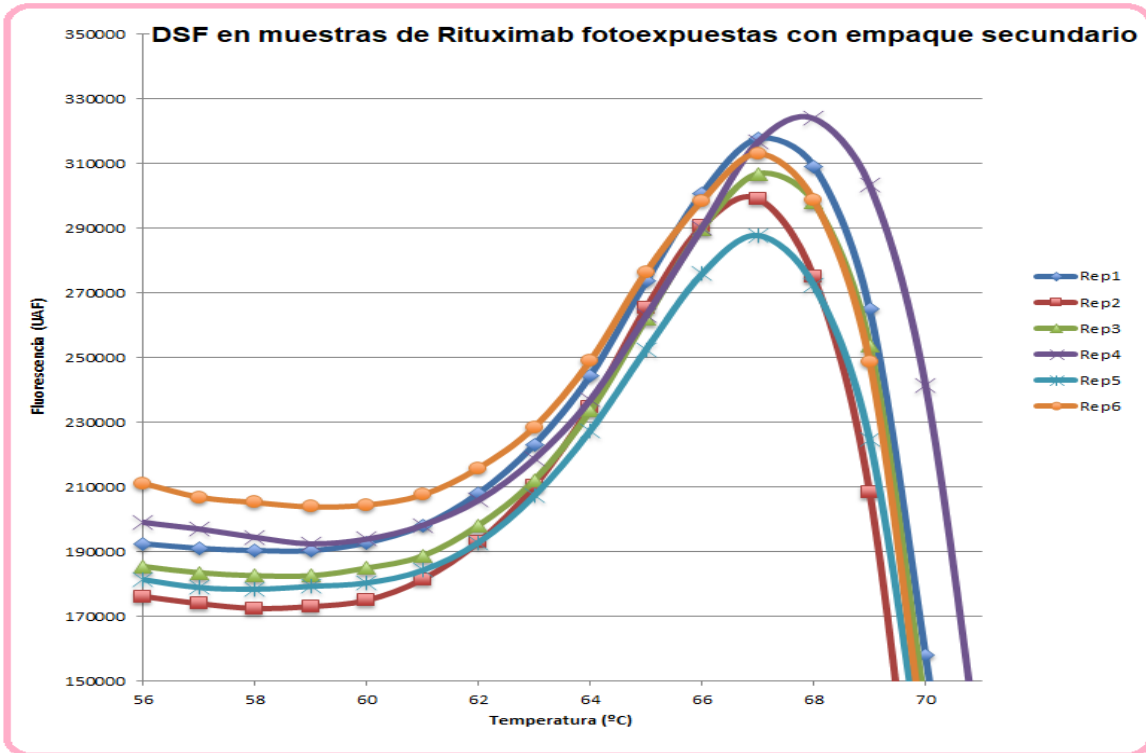


Figura 24. Gráfico de DSF en muestras de Rituximab fotoexpuestas con envase secundario

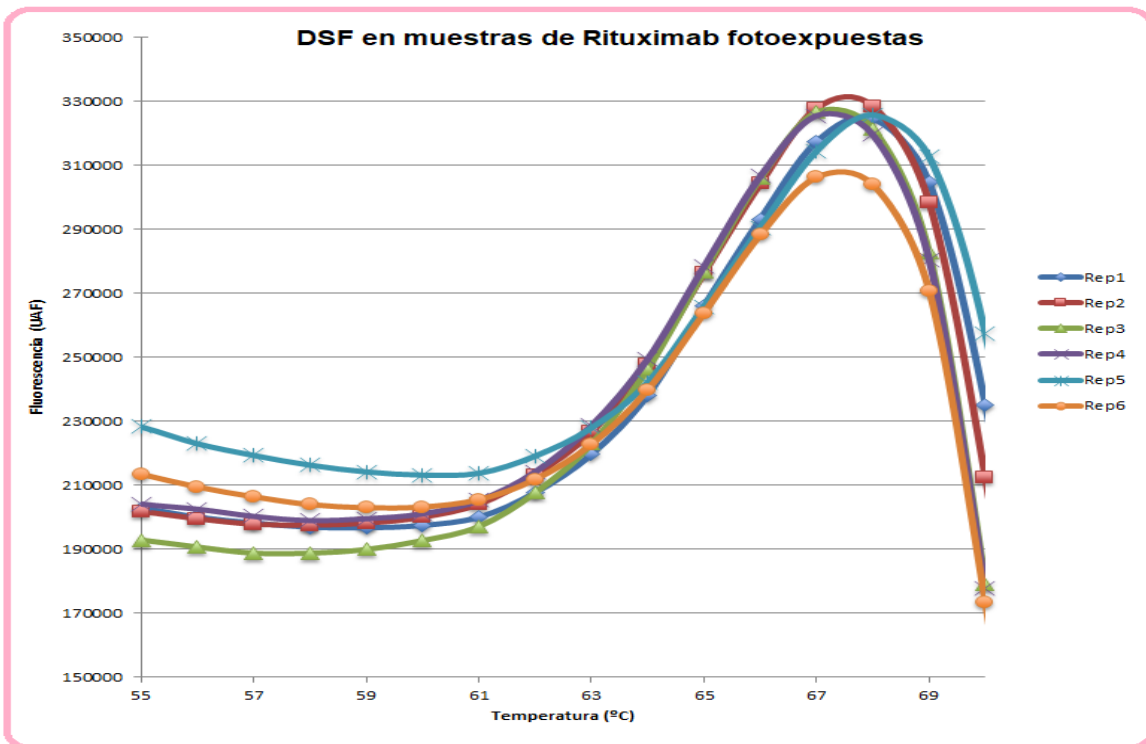


Figura 25. Gráfica de DSF en muestras de Rituximab fotoexpuestas

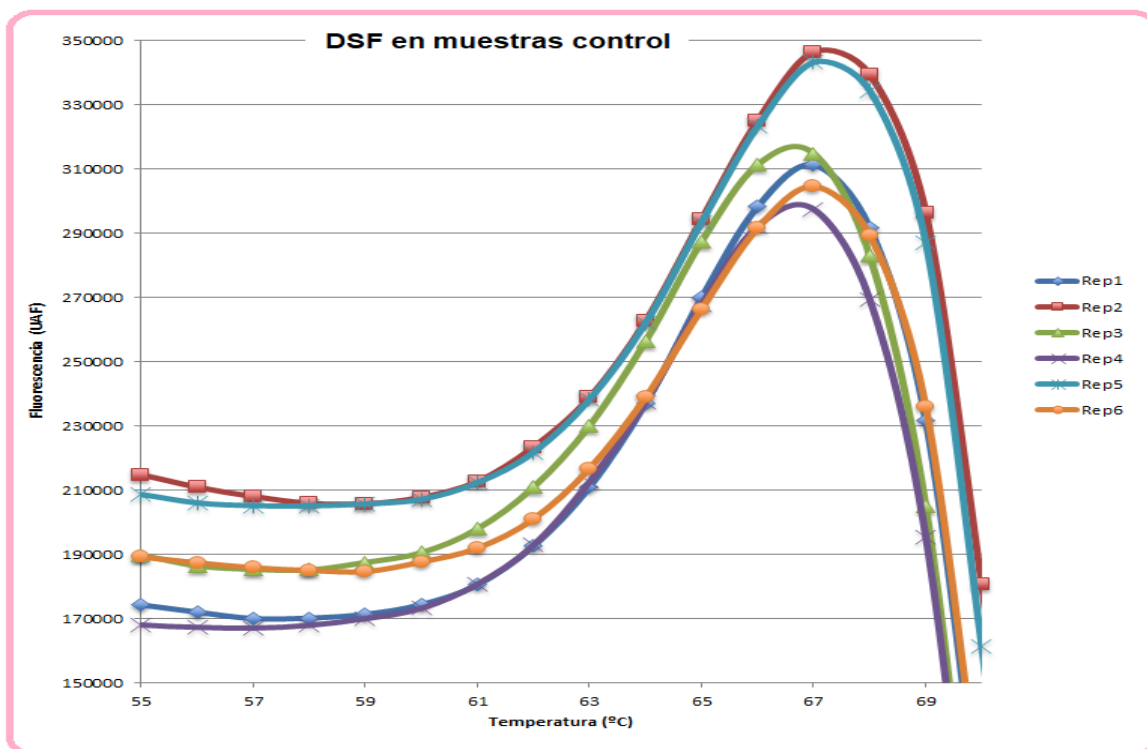


Figura 26. Gráfico de DSF en muestras control

Tabla 12. Resultados de la Fluorimetría diferencial de barrido en muestras de Rituximab fotoexpuestas

Muestras	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Réplica 5	Réplica 6	Media	DE
SDL2h	63.696	64.780	63.658	64.090	64.666	63.689	64.10	0.5119
SDL1h	64.787	64.983	65.108	65.392	64.822	64.559	64.94	0.2887
SILA 2 h	64.751	65.235	65.394	65.061	64.679	65.269	65.06	0.2920
SILA 1 h	64.421	64.861	64.773	64.924	64.782	65.093	64.81	0.2232
SILB 2 h	64.353	64.907	64.918	64.787	64.110	64.737	64.64	0.3295
SILB 1 h	64.611	64.340	64.539	64.445	64.441	64.743	64.52	0.1433
ControlSDLC2h	65.160	64.910	64.252	64.843	64.125	65.656	64.82	0.5707
ControlSDLC1h	65.435	65.172	65.106	64.635	64.982	65.416	65.12	0.2980
ICHEP	65.290	65.615	65.048	65.129	64.835	64.865	65.13	0.2915
ICHES	65.052	64.582	65.041	65.619	64.818	64.613	64.95	0.3828
Control 2	64.681	64.734	64.419	64.678	65.106	64.960	64.76	0.2407

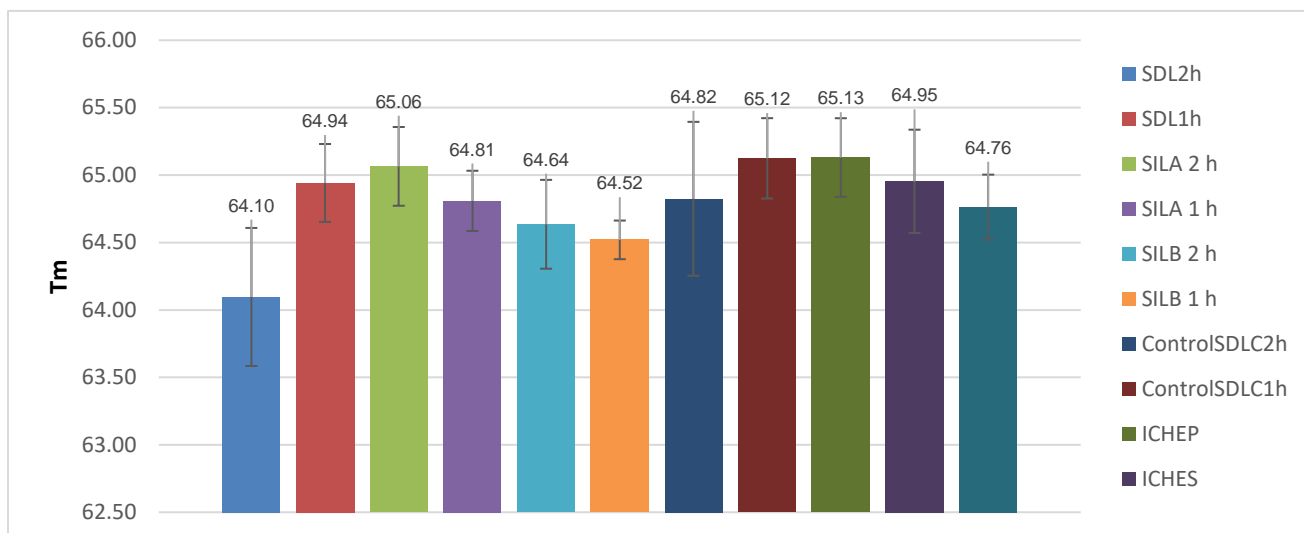


Figura 27. Resultados de la Fluorometría diferencial de barrido en muestras de Rituximab fotoexpuestas

Tabla 13. Resultados de la Fluorometría diferencial de barrido en muestras de Rituximab fotoexpuestas

Abreviatura	Descripción	Abreviatura	Descripción
SDL2h	Exposición solar directa, 2h	SDLC2h	Control de exposición solar (envase secundario) 2 h
SDL1h	Exposición solar directa, 1h	SDLC1h	Control de exposición solar (envase secundario) 1 h
SILA2h	Exposición difusa solar a 10 cm, 2h	ICHEP	Condiciones ICH, envase primario
SILA1h	Exposición difusa solar a 10 cm, 1h	ICHES	Condiciones ICH, envase secundario
SILB1h	Exposición difusa solar a 1m, 1h	Control 2	Control de exposición condiciones ICH
SILB2h	Exposición difusa solar a 1m, 2h		

La foto-oxidación al oxidar aminoácidos modifica la carga y cambia la estabilidad de sus interacciones intramoleculares.

Gráfico de Cajas y Bigotes

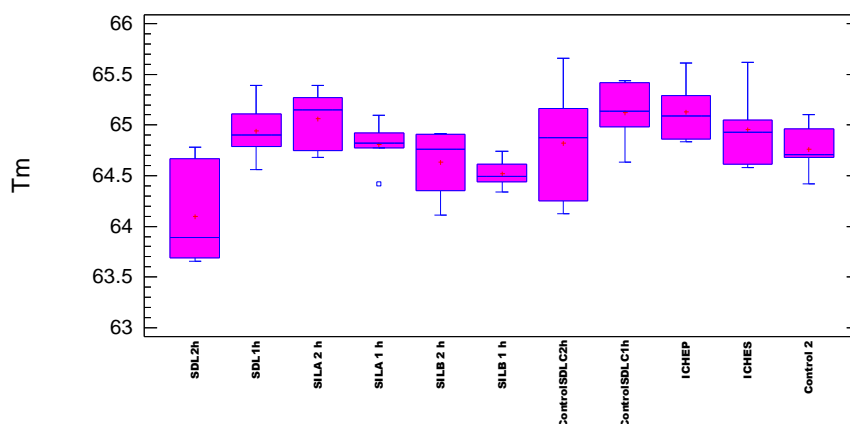


Figura 28. Gráfico de caja y bigotes, resultados de la Fluorometría diferencial de barrido.

Fuente	Sumas de cuadrados	<i>g.l.</i>	Cuadrado Medio	Cociente-F	Valor- <i>p</i>
Entre grupos	5.58318	10	0.558318	4.68	0.0001
Intra grupos	656752	55	0.119409		

Contraste de Hipótesis:

Hipótesis Nula: No existe diferencia entre los grupos o medias.

Hipótesis alternativa: Existe diferencia entre los grupos y las medias.

Puesto que el valor *p* de la prueba F es inferior a 0.05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias

Si existe diferencia entre los grupos que se fotoexpusieron en condiciones diferentes.

9.4. Cromatografía de intercambio iónico (CEX-UPLC-FLR).

Tabla 14. Adecuabilidad en la Cromatografía de exclusión molecular en muestras de Rituximab fotoexpuestas.

Reporte analítico

Determinación de Isoformas cargadas en Rituximab por CEX-UPLC-FLR

Muestra: Rituximab

Deteccion 295nm ex, 340nm em

Lote(s):5433130804

Columna: Protein Pak SP 7 mcm 4.6 X100 mm

Sustancia de referencia: 5433130804 sin luz

Código del sistema: 02-01-02820

CRITERIO	RESULTADO	DICTAMEN
Verifica que los cromatogramas de la sustancia de referencia de <u>Rituximab</u> sean consistentes con el cromatograma teórico.	Corresponden	Cumple
Verifica que el nivel de ruido o señal de fondo del blanco, no sea superior a 2 mv.	1 mV	Cumple
Verifica que el tiempo de retención de los picos correspondientes a <u>rituximab</u> sea mayor a 3 min.	SR: 11 min.	Cumple
Verifica que el coeficiente de variación respecto del área porcentual del pico correspondiente a <u>Rituximab</u> sea menor o igual al 7 % para el triplicado de sustancia de la referencia.	Pico de <u>Rituximab</u> : 2 %	Cumple

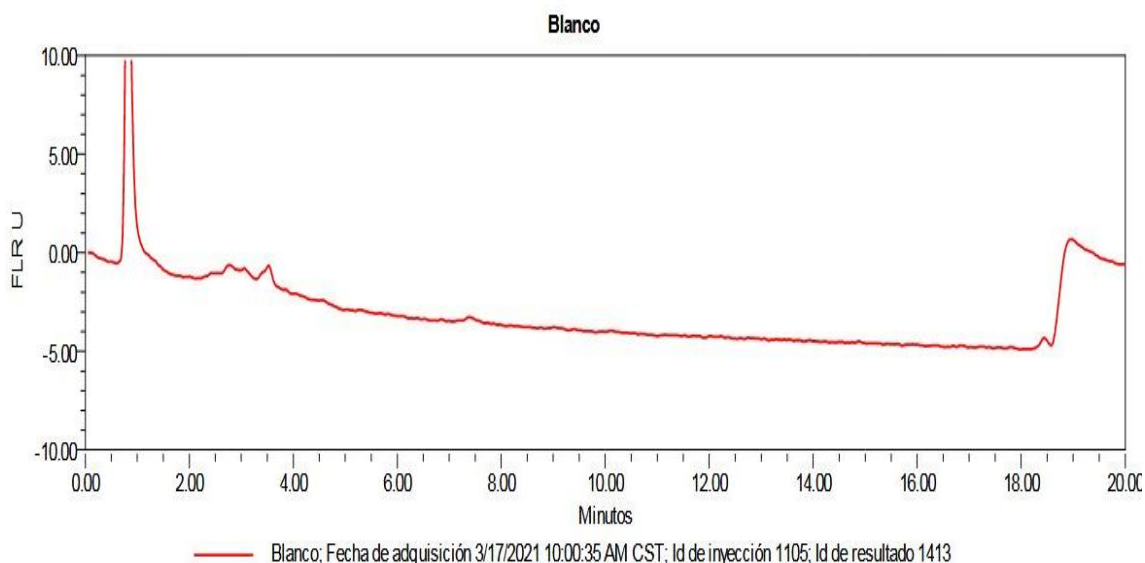


Figura 29. Respuesta del blanco en la Cromatografía de intercambio iónico en muestras de Rituximab fotoexpuestas.

A continuación se muestran cromatogramas de las muestras expuestas a diferentes condiciones de fotoexposición así como de los controles.

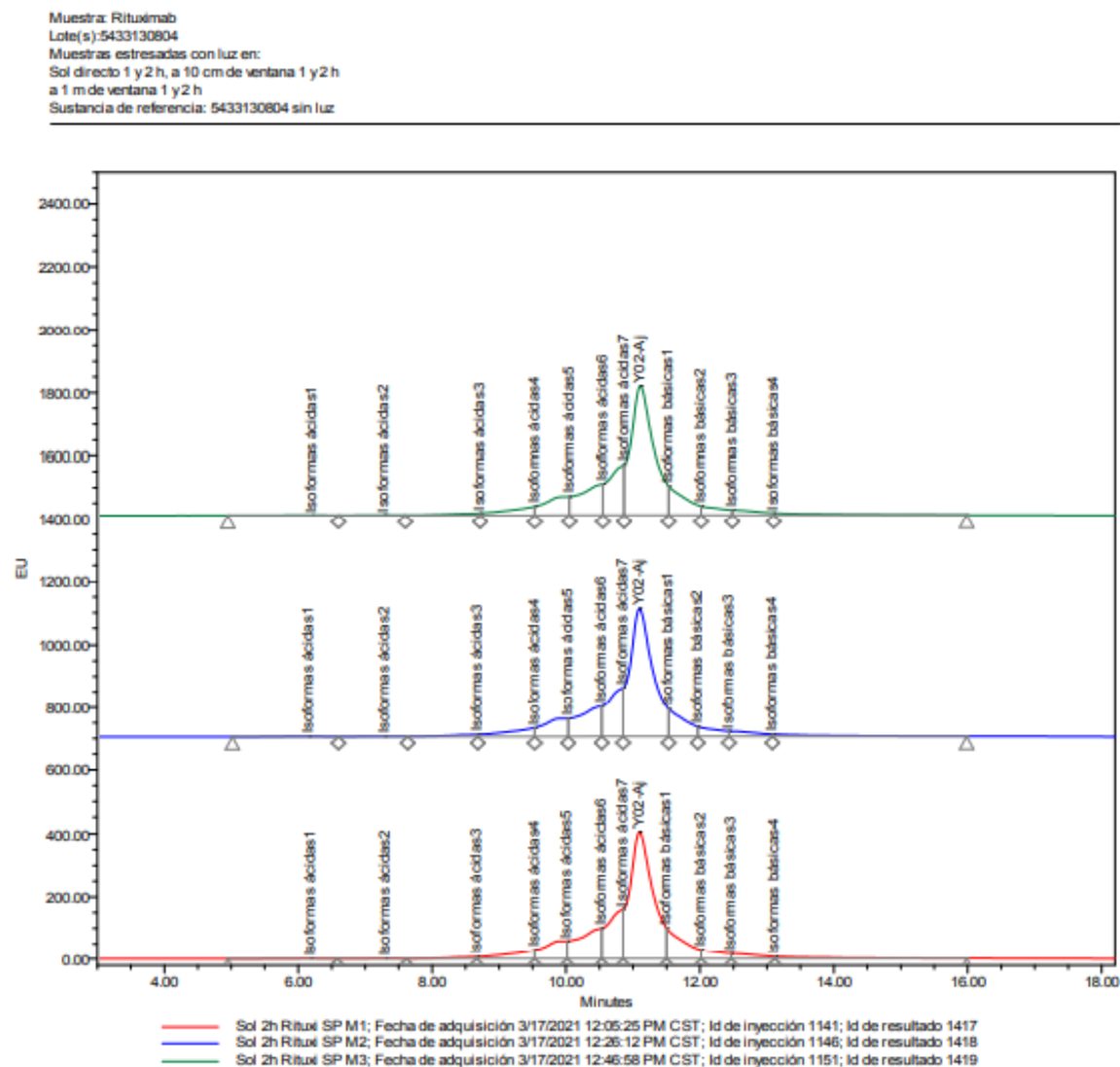


Figura 30. Muestras de Rituximab estresadas con Luz

Tabla 15. Determinación de isoformas en muestras de Rituximab estresadas con luz

	Código de muestra	Descripción	Tiempo de retención (min)	Área bajo la curva
1	To Rituxi SP M1	Rituximab	11.105	114686756
2	To Rituxi SP M1	Isoformas ácidas6	10.487	20268807
3	To Rituxi SP M1	Isoformas ácidas5	9.899	13261790
4	To Rituxi SP M1	Isoformas ácidas4	9.600	7218242
5	To Rituxi SP M1	Isoformas ácidas3	8.717	1513147
6	To Rituxi SP M1	Isoformas ácidas2	7.348	610116
7	To Rituxi SP M1	Isoformas ácidas1	6.189	629291
8	To Rituxi SP M1	Isoformas básicas1	11.517	14953328
9	To Rituxi SP M1	Isoformas básicas2	11.983	5472904
10	To Rituxi SP M1	Isoformas básicas3	12.433	4243577
11	To Rituxi SP M1	Isoformas básicas4	13.083	2919024
12	To Rituxi SP M1	Isoformas ácidas7	10.850	21621980
13	To Rituxi SP M2	<u>Rituximab</u>	11.119	114327775
14	To Rituxi SP M2	Isoformas ácidas7	10.883	23085599
15	To Rituxi SP M2	Isoformas ácidas6	10.502	19664582
16	To Rituxi SP M2	Isoformas ácidas5	9.913	13728693
17	To Rituxi SP M2	Isoformas ácidas4	9.617	7179218
18	To Rituxi SP M2	Isoformas ácidas3	8.733	1532742
19	To Rituxi SP M2	Isoformas ácidas2	7.351	569824
20	To Rituxi SP M2	Isoformas ácidas1	6.208	591017
21	To Rituxi SP M2	Isoformas básicas1	11.550	13470939
22	To Rituxi SP M2	Isoformas básicas4	13.033	3142988
23	To Rituxi SP M2	Isoformas básicas3	12.433	4116012
24	To Rituxi SP M2	Isoformas básicas2	11.967	5827964
25	To Rituxi SP M3	Isoformas ácidas1	6.215	531581
26	To Rituxi SP M3	Isoformas ácidas3	8.750	1582543
27	To Rituxi SP M3	Isoformas ácidas4	9.650	7812539
28	To Rituxi SP M3	Isoformas ácidas5	9.906	12861196
29	To Rituxi SP M3	Isoformas ácidas6	10.583	21387059
30	To Rituxi SP M3	Isoformas ácidas7	10.850	19824750
31	To Rituxi SP M3	<u>Rituximab</u>	11.113	116787428
32	To Rituxi SP M3	Isoformas básicas4	13.083	2971806
33	To Rituxi SP M3	Isoformas básicas3	12.450	4159033
34	To Rituxi SP M3	Isoformas básicas2	12.050	4689753
35	To Rituxi SP M3	Isoformas básicas1	11.533	15534241
36	To Rituxi SP M3	Isoformas ácidas2	7.381	546753

Muestra: Rituximab
 Lote(s): 5433130804
 Sustancia de referencia: 5433130804 sin luz
 Detección 295nm ex 340nm em.

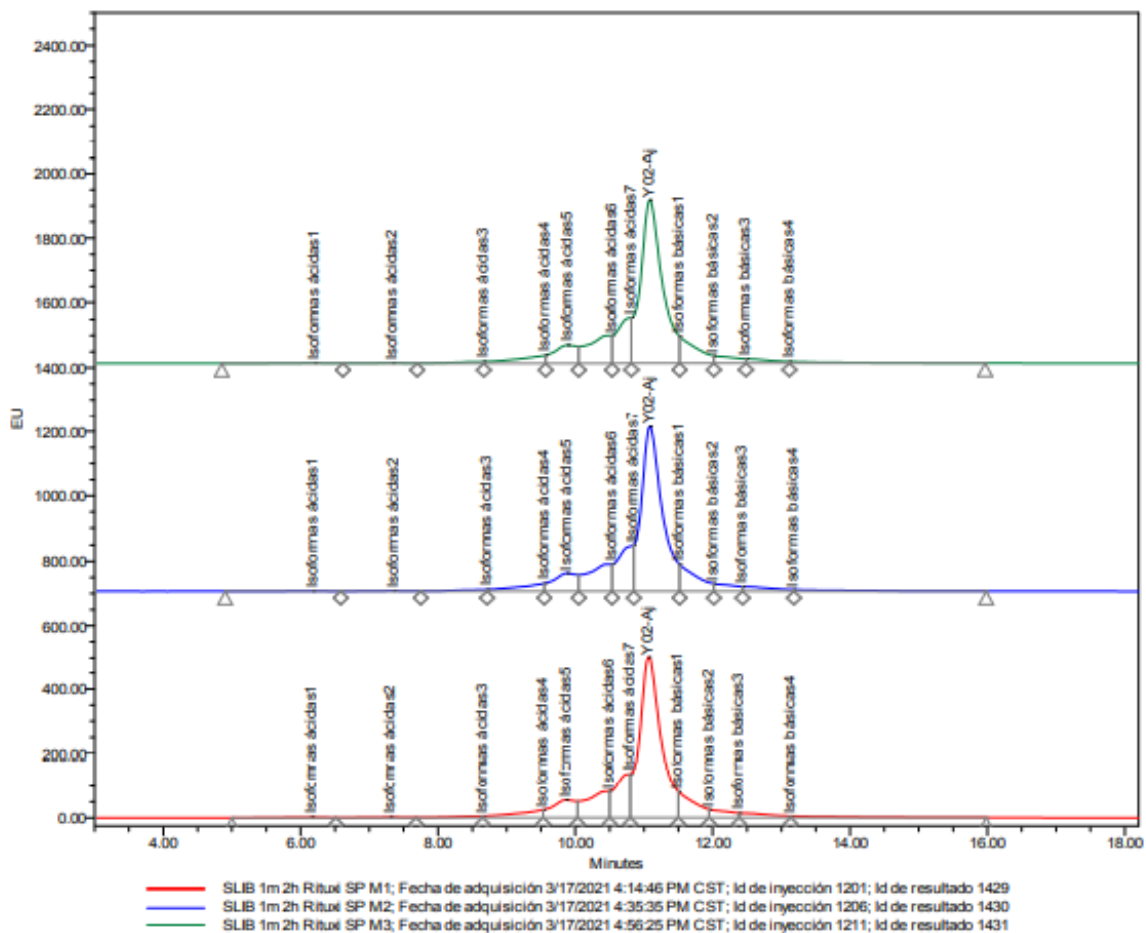


Figura 31. Muestras de Rituximab sin Luz

Tabla 16. Determinación de isoformas en muestras de Rituximab sin luz

	Código de muestra	Descripción	Tiempo de retención (min)	Área bajo la curva
1	SR M1	<u>Rituximab</u>	11.037	125329271
2	SR M1	Isoformas ácidas6	10.467	16522418
3	SR M1	Isoformas ácidas5	9.836	10221984
4	SR M1	Isoformas ácidas4	9.300	2733000
5	SR M1	Isoformas ácidas3	8.633	953656
6	SR M1	Isoformas básicas1	11.467	19089955
7	SR M1	Isoformas básicas2	11.983	7145667
8	SR M1	Isoformas básicas3	12.491	7092921
9	SR M1	Isoformas básicas4	13.250	4031176
10	SR M1	Isoformas ácidas7	10.783	20333855
11	SR M2	<u>Rituximab</u>	11.086	133958350
12	SR M2	Isoformas ácidas7	10.767	13763423
13	SR M2	Isoformas ácidas6	10.550	18522798
14	SR M2	Isoformas ácidas5	9.904	8740576
15	SR M2	Isoformas ácidas4	9.533	4140542
16	SR M2	Isoformas ácidas3	8.733	1036872
17	SR M2	Isoformas ácidas1	6.171	512451
18	SR M2	Isoformas básicas1	11.533	16989061
19	SR M2	Isoformas básicas4	13.250	4199397
20	SR M2	Isoformas básicas3	12.400	7833608
21	SR M2	Isoformas básicas2	11.983	7075321
22	SR M3	Isoformas ácidas1	6.227	527528
23	SR M3	Isoformas ácidas3	8.817	1057634
24	SR M3	Isoformas ácidas4	9.633	4345654
25	SR M3	Isoformas ácidas5	9.967	8555204
26	SR M3	Isoformas ácidas6	10.583	16051081
27	SR M3	Isoformas ácidas7	10.900	20198037
28	SR M3	<u>Rituximab</u>	11.147	122841866
29	SR M3	Isoformas básicas4	13.117	4966982
30	SR M3	Isoformas básicas3	12.601	5625234
31	SR M3	Isoformas básicas2	11.983	8987086
32	SR M3	Isoformas básicas1	11.583	15673181

Las muestras sometidas a radiación solar directa muestran una proporción de isoformas ácidas mayor comparando contra las demás muestras.

9.5. Actividad CDC

Como mencionó en la sección de Antecedentes, este análisis se basa en la capacidad de la muestra para inducir citólisis dependiente del complemento (CDC) en células que expresan CD20 (WIL2-S) en presencia de complemento humano. La viabilidad de las células, después de un tratamiento con la muestra se mide utilizando Alamar Blue. Alamar Blue es un tinte redox que genera fluorescencia después de que ha sido tomado y metabolizado por células vivas. La muerte celular inducida por la muestra a través de rutas del complemento está inversamente relacionada con la fluorescencia generada.

El reporte de actividad biológica se realizó en unidades porcentuales que refleja la potencia relativa que se tuvo respecto de la sustancia de referencia.

La potencia del anticuerpo expresada como EC50 se obtiene tanto para el estándar como para la muestra y haciendo referencia a que la potencia del estándar es 100%, se calcula la potencia relativa de la muestra. Esta relación de la potencia de la muestra a la del estándar se realiza en cada análisis.

Potencia biológica en muestras de Rituximab fotoexpuestas.

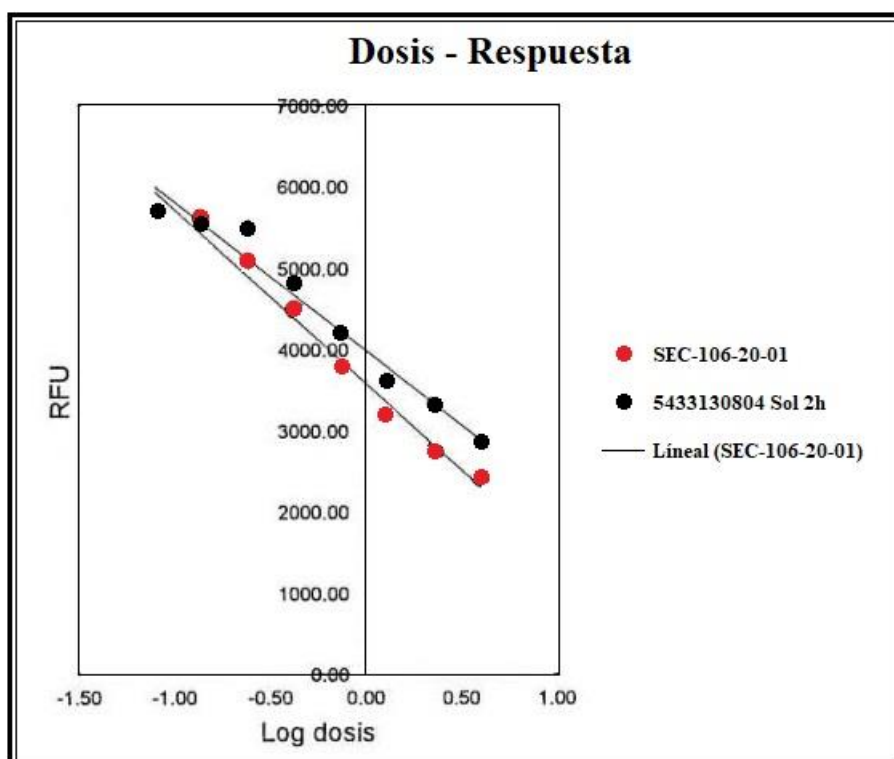


Figura 32. Dos horas en luz solar directa (peor caso)

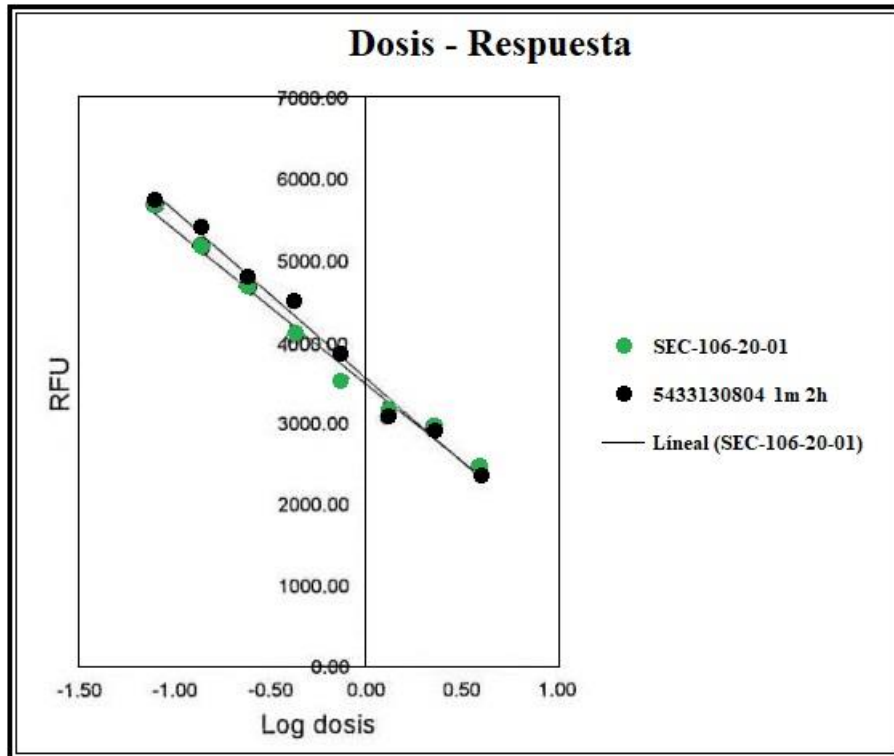


Figura 33. Dos horas en luz solar difusa

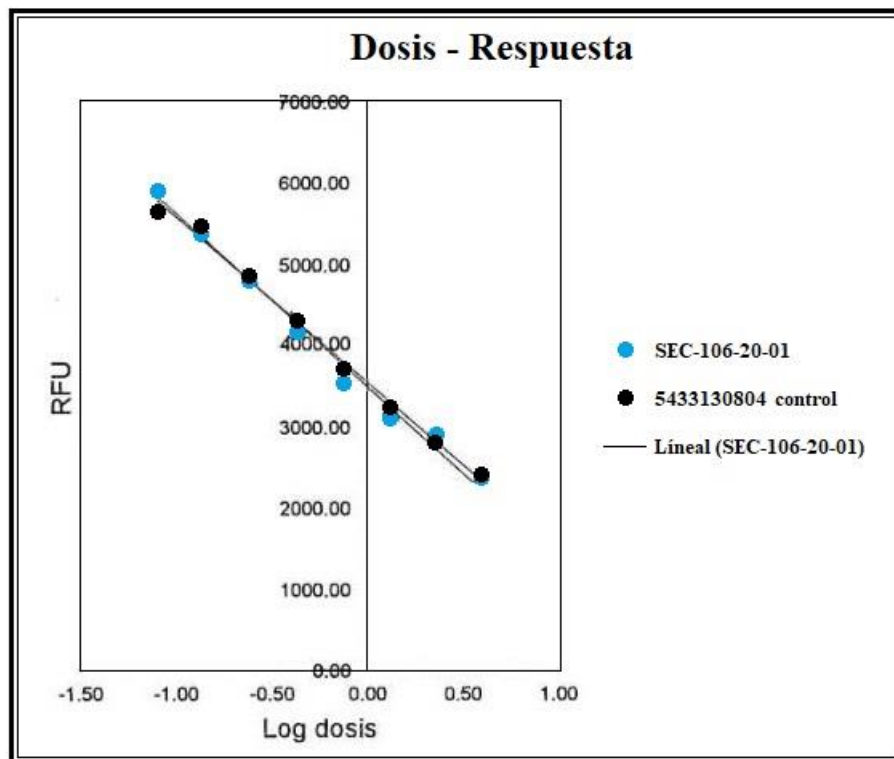


Figura 34. Control

Tabla 17. Resultados de potencia biológica en muestras de Rituximab fotoexpuestas

Muestras	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	DE
SDL2H	74.1	80.0	73.4	75.84	3.62
SDL1H	96.5	100.8	96.5	97.92	2.51
SILB 2 H	100.4	100.0	101.5	100.62	0.76
CONTROLS DLC2H	99.4	96.7	99.4	98.49	1.57
CONTROLS DLC1H	101.6	outlier	100.4	101.00	0.91
ICHEP	100.0	100.0	100.0	100.02	0.00
ICHES	97.5	97.5	97.5	97.49	0.00
CONTROL 2	99.9	99.9	99.9	99.92	0.00

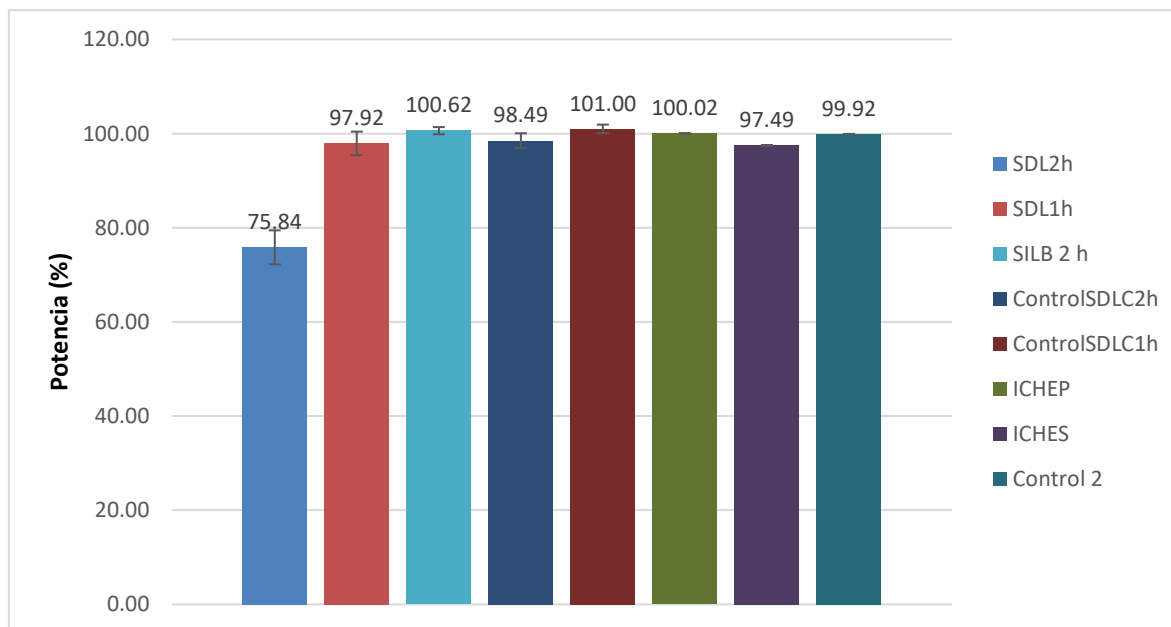


Figura 35. Resultados de potencia biológica en muestras de Rituximab fotoexpuestas.

Tabla 18. Resultados de potencia biológica en muestras de Rituximab fotoexpuestas

Abreviatura	Descripción	Abreviatura	Descripción
SDL2h	Exposición solar directa, 2h	SDLC1h	Control de exposición solar (envase secundario) 1 h
SDL1h	Exposición solar directa, 1h	ICHEP	Condiciones ICH, envase primario
SILB1h	Exposición difusa solar a 1m, 1h	ICHES	Condiciones ICH, envase secundario
SDLC2h	Control de exposición solar (envase secundario) 2 h	Control 2	Control de exposición condiciones ICH

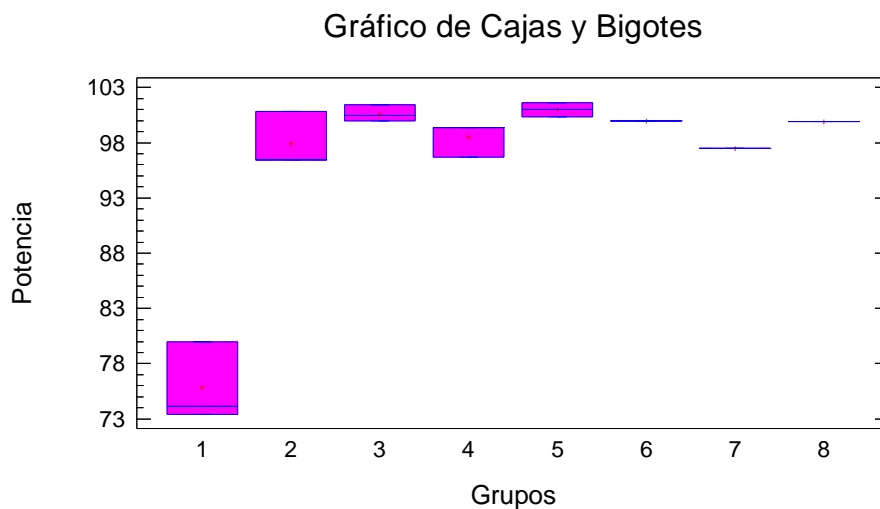


Figura 36. Gráfico de caja y bigotes, resultados de actividad biológica por CDC

Fuente	Sumas de cuadrados	<i>g.l.</i>	Cuadrado Medio	Cociente-F	Valor- <i>p</i>
Entre grupos	1462.58	7	0.558318	68.67	0.0000
Intra grupos	45.6423	15	0.119409		

Contraste de Hipótesis:

Hipótesis Nula: No existe diferencia entre los grupos o medias.

Hipótesis alternativa: Existe diferencia entre los grupos y las medias.

Puesto que el valor p de la prueba F es inferior a 0.05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias

Después de 2 h de luz solar equivalente a ~ 150,000 lux, la potencia de los CDC cambió mostrando que si hubo un daño a las moléculas de Rituximab. Las diferencias entre las otras muestras con condiciones de fotoexposición menos severas no mostraron mayores cambios, estos fueron inferiores al 5 %.

9.6. Dispersión de luz dinámica

Rituximab

Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

Mediciones de DLS de muestras de Rituximab irradiado (n = 3)

Los agregados se detectaron sólo en algunas muestras independientes como se muestra a continuación:

Tabla 19. Resultados de DLS en muestras de Rituximab fotoexpuestas con envase secundario.

	Radio (nm)	Mw – R (kDa)	% Pd	% Intensidad	% Masa	% Número
Peak 1	5.4	174.4	16.3	100.0	100.0	100.0

Tabla 20. Resultados de DLS en muestras de Rituximab fotoexpuestas.

	Radio (nm)	Mw – R (kDa)	% Pd	% Intensidad	% Masa	% Número
Peak 1	5.3	169.9	15.1	100.0	100.0	100.0

Tabla 21. Resultados de DLS en muestras control.

	Radio (nm)	Mw – R (kDa)	% Pd	% Intensidad	% Masa	% Número
Peak 1	5.2	157.8	9.4	100.0	100.0	100.0

Tabla 22. Resultados de mediciones de DLS de muestras de Rituximab irradiado

Muestras	<i>Rh</i> (nm)	RSD	% Masa	Agregados (nm)
SDL 2h	5.47	1.1	99.8	2532
SDL 1h	5.10	3.9	99.9	46.3, 240.2
SILB 2h	5.23	1.1	99.8	30.3, 83.6
SILB 1h	5.07	4.1	99.9	89.1
SILA 2h	5.37	1.1	99.9	26.4, 80.7
SILA 1h	5.37	3.9	99.9	48.5, 143.3, 143.3
Control	5.27	1.1	100.0	32.4

Regularization Results: Ritux 1 mg/mL Env Sec M1

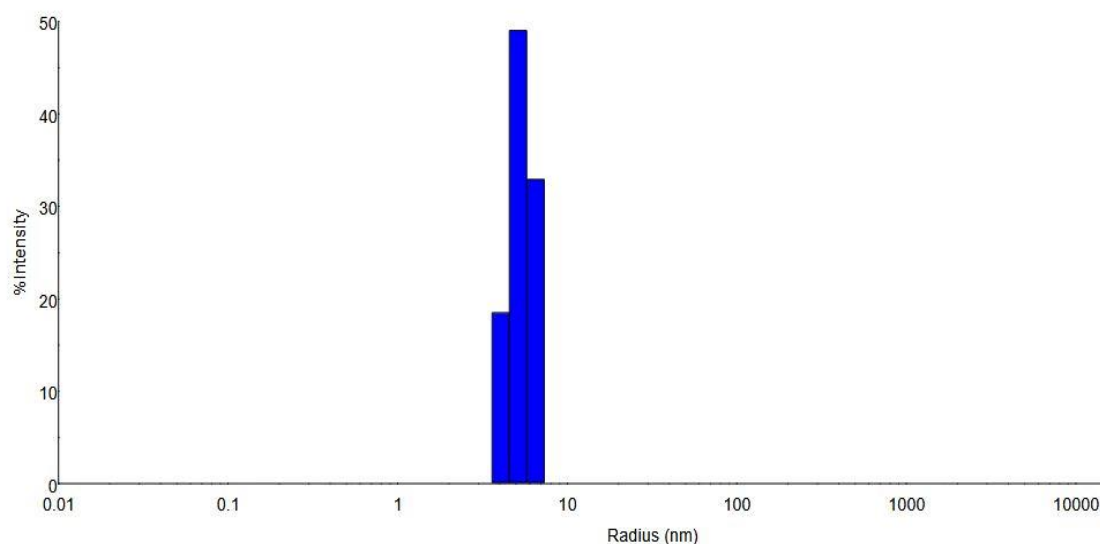


Figura 37. Gráfico de DLS en muestras de Rituximab fotoexpuestas con envase secundario

Regularization Results: Ritux 1 mg/mL Fotoxi M1

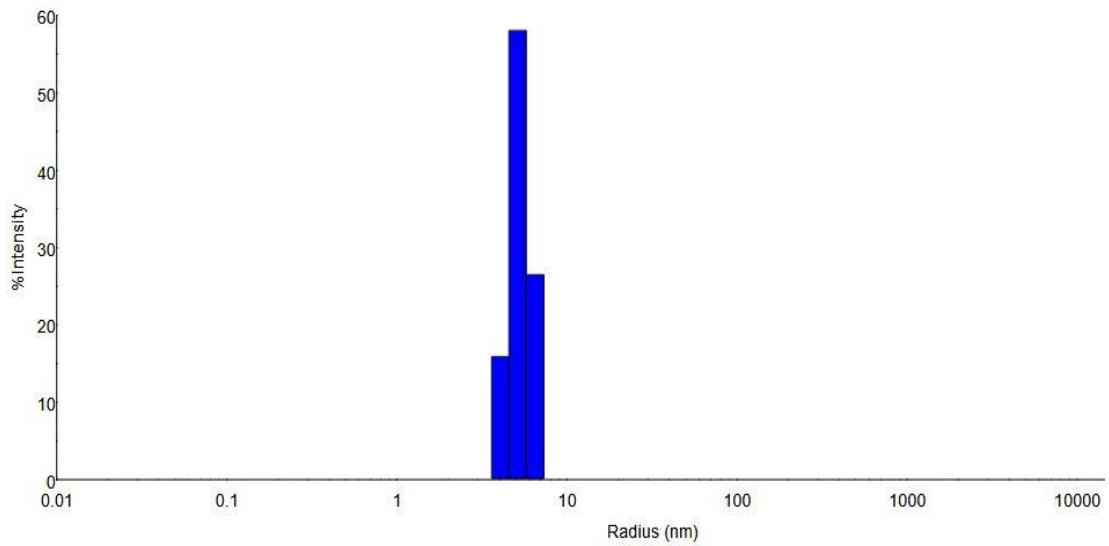


Figura 38. Gráfico de DLS en muestras de Rituximab fotoexpuestas

Regularization Results: Ritux 1 mg/mL Oscuro M1

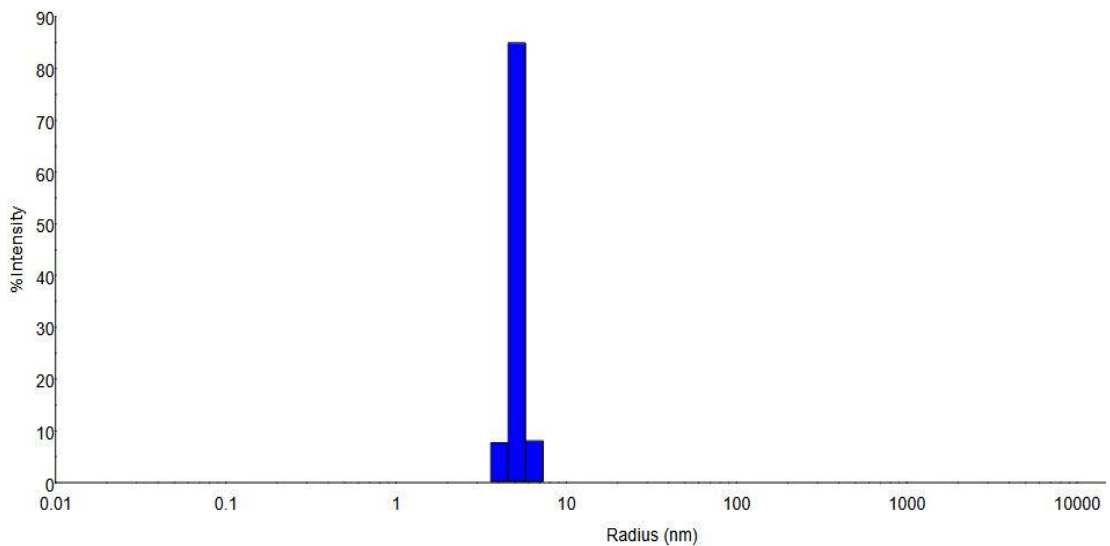


Figura 39. Gráfico de DLS en muestras control

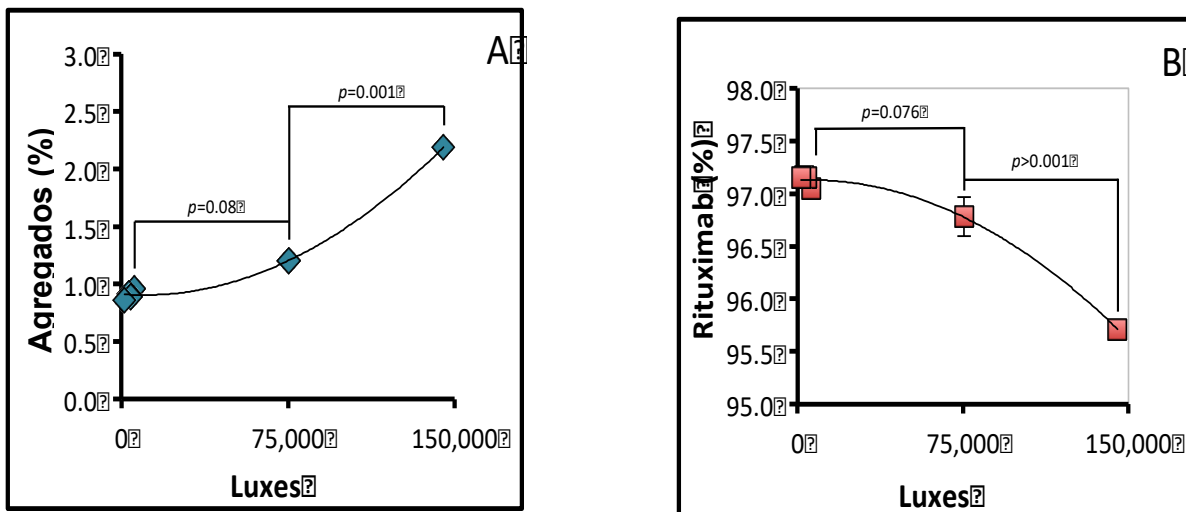


Figura 40. Resultados de Mediciones de DLS de muestras de Rituximab irradiado

Las muestras de luz solar filtradas con radiación solar directa (SDL) mostraron que hay un aumento importante en los agregados insolubles después de 2 h, en comparación con 1 h.

También se muestra que el contenedor secundario ayuda a inhibir la agregación en Rituximab por radiación solar directa filtrada.

10. DISCUSIÓN

Rituximab es un anticuerpo monoclonal utilizado en el tratamiento de enfermedades como la artritis reumatoide o el linfoma no Hodgkin. Durante su administración puede exponerse a lámparas fluorescentes o irradiación solar natural y debido a su administración al paciente por infusión/perfusión, la fotoestabilidad es un factor clave en la eficacia de este biológico. Para comprender mejor los mecanismos de fotodegradación de Rituximab, el biológico se expuso a diferentes condiciones de irradiación. En este estudio se demostró que este mAb se fotodegrada de manera proporcional a las intensidades de irradiación.

Para comprender la relación entre estos cambios en el uso en la vida real y en comparación con la prueba de luz estandarizada de ICH, se configuró una caracterización.

Se evaluaron los peores casos de fotoestrés, a 1 y 2 h bajo luz solar directa a través de una ventana, imitando el perfil de radiación electromagnética a la que podría estar expuesto el medicamento en una condición de administración.

Los resultados muestran que solo la exposición a la luz solar directa durante la exposición en el peor de los casos (2 h), aumenta los agregados, la disminución de Tm y disminución de CDC que se correlaciona con análisis fisicoquímicos. Mientras que la exposición de la sala de luz interior y las condiciones de ICH no tienen ninguna contribución a la fotooxidación de Rituximab medida por estos métodos analíticos fisicoquímicos y biológicos.

Estos resultados indican que la administración de Rituximab por perfusión / infusión es segura, mientras que el biológico no esté expuesto a la luz solar directa.

Las condiciones de exposición se describen en la guía ICH 1B para pruebas de fotoestabilidad de nuevas sustancias y productos farmacéuticos. En esta guía, los productos deben estar expuestos a 1.2 millones de Luxes y 200 W / m²·h para UVA (320 - 400 nm).

Los comentarios para su aplicación, sin embargo, establecieron dos opciones para probar los productos, ya que la exposición a 1.2 millones de Luxes de luz transporta un componente UVA relacionado con la lámpara fluorescente a la que se prueban los productos en una cámara de fotoestabilidad, que de hecho es mayor que la cantidad establecida en la guía. Por lo tanto, los investigadores exponen las muestras a la exposición a la radiación en el rango visible y UVA para cubrir ambos requisitos. En nuestro ejemplo, exposición a 1.2 mLuxes a un nivel de irradiación de 200 W / m²·h durante 10 días, utilizando una lámpara fluorescente, que cubre también el rango UVA.

No obstante, las condiciones descritas en la guía son condiciones de laboratorio que no pueden cubrir las condiciones reales de radiación. Por lo tanto, establecer fuentes de luz relevantes no es una tarea fácil, debido a la diversidad de fuentes de radiación a las que pueden estar expuestos los biológicos. Por ejemplo, la intensidad de la luz solar varía a lo largo del año, principalmente por el ángulo de incidencia de la radiación o las condiciones climáticas. Por lo tanto, se deben desglosar algunas consideraciones.

Los resultados de la experimentación nos llevan a la siguiente información:

Para los datos obtenidos en la prueba de absorbancia a 320 nm, puede verse en la figura 18, las muestras fotoexpuestas a luz difusa y en condiciones ICH no tienen diferencias mayores a las obtenidas con respecto del control; sin embargo, el efecto visto en las muestras expuestas 2 h a luz solar directa si presentan cambios importantes, que reflejan fenómenos de agregación de partículas insolubles.

En cuanto a las determinaciones de potencial Zeta como se observa en la Figura 23, el efecto visto entre los grupos de muestras fotoexpuestas en condiciones ICH, de luz difusa y luz solar directa, no hay cambios mayores al compararse con el grupo control.

Relacionado con los datos de la estabilidad térmica del rituximab obtenidos con la técnica de termoanálisis de fluorimetría diferencial de barrido, se observa en la Figura 27, que en el grupo de muestras expuestas a luz solar directa durante 2 h hay un cambio en la T_m respecto del grupo control. La disminución de la T_m refleja mayor inestabilidad de la molécula.

En lo que corresponde a la evaluación cromatográfica de intercambio iónico CEX-UPLC-FLR, como puede verse en la Tabla 15, las muestras sometidas 2 h a radiación solar directa muestran una proporción de isoformas ácidas mayor comparando contra las demás muestras.

Al respecto de los resultados obtenidos en la determinación de potencia biológica, se observa en la Figura 35 un cambio significativo en las muestras fotoexpuestas a la condición de luz solar directa durante 2 horas, respecto a la respuesta que presentó el control en la inducción de citólisis dependiente del complemento (CDC) en células que expresan CD20 en presencia de complemento humano, ya que la actividad biológica disminuyó a un nivel de 60%.

Relacionado con los datos obtenidos con la prueba de dispersión de luz dinámica, se observa en la Tabla 22 que las muestras fotoexpuestas 2 h a la luz solar directa presenta una respuesta diferente a la que tuvo el grupo control; es decir, hay subpoblaciones, presentes en la muestra dejando ver la agregación de la molécula.

De forma ortogonal se observa que después de 2 h de luz solar equivalente a ~ 150,000 lux, aspectos fisicoquímicos y biológicos de las moléculas de Rituximab se modifican.

Las diferencias entre las otras muestras con condiciones de fotoexposición menos severas no mostraron mayores cambios.

11. CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo confirman que el anticuerpo monoclonal Rituximab se fotodegrada proporcionalmente a las intensidades de irradiación de luz solar y ultravioleta, generando modificaciones relacionadas principalmente con el aumento de agregados, disminución de su temperatura media (T_m), variantes de carga ácida y disminución de la potencia de Citotoxicidad celular dependiente del complemento (CDC).

Esta caracterización analítica para determinar la degradación inducida por la luz demostró que el anticuerpo monoclonal sufre una combinación de reacciones físicas y químicas en estas condiciones.

Esta fotosensibilidad depende de la intensidad de radiación, relacionada con las luxes/h y el tiempo de exposición, demostrando que a mayor intensidad mayor daño. El envase secundario del medicamento de Rituximab le otorga protección a la molécula ante el daño que es susceptible de sufrir cuando es expuesta a la luz.

Y si bien los resultados demostraron que la fotodegradación del Rituximab después de una intensa la exposición a la luz, se puede prevenir mediante un embalaje secundario adecuado, es importante mencionar que el producto se coloca en bolsas de perfusión para ser administrado en los pacientes y es en ese momento donde el producto se encuentra con mayor exposición a la luz.

12. PERSPECTIVAS

Este trabajo sienta las bases para el desarrollo de una fórmula que proteja a Rituximab de la luz.

Permite continuar con una serie de experimentos de formulación relacionados con dilucidar aquella que tenga mayor estabilidad ante la exposición a la luz, es decir una menor de menor impacto de la fotoexposición de la formulación; y, que tras la exposición a las condiciones de luz ambiental encontradas durante la fabricación rutinaria, almacenamiento y administración se tenga un diseño adecuado de la formulación, del contenedor primario así como del paquete secundario.

Es importante mencionar que el presente trabajo sumado a la experimentación realizada por el Dr. Víctor Pérez Medina derivó en la publicación del artículo "*Photodegradation of Rituximab, critical evaluation of its sensibility to electromagnetic radiation*", recientemente aceptado en la Revista AAPS PharmSciTech y en la que se dilucida la forma en que el anticuerpo monoclonal es afectado por la fotooxidación y como esto se correlaciona con los cambios fisicoquímicos y la pérdida de la actividad biológica del Rituximab. Lo cual contribuye al conocimiento básico del comportaminto del anticuerpo.

13. REFERENCIAS

1. Medina Martínez, Víctor; Cedillo Robles, Miriam; Juárez-Bayardo, Carmina; Espinosa-de la Garza, Carlos; Meneses, Angélica; Pérez, Néstor O. Photodegradation of Rituximab, critical evaluation of its sensibility to electromagnetic radiation. *AAPS PharmSciTech* (2022) 23:271. <https://doi.org/10.1208/s12249-022-02412-8> (29 September 2022).
2. G. Salles, M. Barret, et al. Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies: A review of 20 Years of Clinical Experience, *Adv Ther* 34(10) (2017) 2232-2273.
3. A.Abulaya, A. Bredan et al Rituximab: modes of action remaining dispute and future perspective, *Futere Oncol* 10 (15) (2014) 2481-2492.
4. Biotecnológicos y biosimilares en farmacia hospitalaria, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. Prácticas tuteladas, (2017)
5. Informe INESME (Instituto de Estudios Médico Científicos). Equivalencias terapéuticas de los medicamentos biotecnológicos, Madrid, 2009.
6. M.C.Iglesias-Osma, J. González-Correa y col. Desarrollo y Regulación de Medicamentos Biotecnológicos, AFT 2013.
7. Asociación Española de Bioempresas (ASEBIO). Medicamentos biológicos. www.asebio.com (08 abril 2019)
8. Guideline on immunogenicity assesment of biotechnology-derived therapeutic proteins. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/WC500003946.pdf (13 december 2007)
9. International Federation of Pharmaceutical Manufacturers & Associations (IFPA). Productos Bioterapéuticos Similares. International Federation of Pharmaceutical Manufacturers & Associations. (08 abr 2019).
10. W.S. Putnam, S. Prabhu, et al. Pharmacokinetic, pharmacodynamic and immunogenicity comparability assesment strategies for monoclonal antibodies, *Trends Biotechnol* 28(10) (2010) 509-516.

11. N. Goyal, The Role of Drug Exposure in Clinical Development: To What Extent Is Pharmacokinetic Assesment Needed in a Drug Development Programme?, Clin Pharmacokinet 54(10)(2015) 985-987.
12. Anticuerpos monoclonales terapéuticos- Informe de Vigilancia Tecnológica, Genoma España y Fundación General de la Universidad Autónoma de Madrid (FUAM) (2007).
13. H. Ledford, Cocktails for cáncer with a measure of immonotherapy, Nature 532 (7598) (2016) 162-164.
14. MabThera: EPAR - All Authorised presentations (PDF/19.75 KB). Ficha técnica o resumen de las características del producto. Last updated: 10/06/2016. MabThera (Rituximab). (<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/mabthera>)
15. Laguna Design. 19/09/2018. Rituximab drug molecule - Stock Image - C030/1430 - Science Photo Library. (<https://www.sciencephoto.com/media/767117/view/rituximab-drug-molecule>)
16. Truxima (rituximab). European Medicines Agency. EMA/413553/2019. EMEA/H/C/004112. https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/truxima-epar-medicine-overview_es.pdf
17. Amy Morgan Wood (2001) Pharmacology and Pharmacokinetics of Rituximab. American Journal of Health-System Pharmacy. 58(3) (https://www.medscape.com/viewarticle/406941_8)
18. Reff ME, Carner K, Chambers KS et al. Depletion of B cell in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. Blood. 1994; 83: 435-45
19. Maloney DG, Smith B, Appelbaum FR. The antitumor affect of monoclonal anti-CD20 antibody therapy includes direct anti-proliferative activity and induction of apoptosis in CD20 positive non-Hodgkin´s lymphoma cell lines. Blood 1996; 88: 637.
20. Anti-Human CD20 Recombinant Antibody (Rituximab) - Creative Biolabs.
21. Zichen Zhao, Mahesha M. Poojary, Leif H. Skibsted,* and Marianne N. Lund*. 2020. Cleavage of Disulfide Bonds in Cystine by UV-B Illumination Mediated by Tryptophan or Tyrosine as Photosensitizers, Journal of Agricultural and Food Chemistry.
22. Yuya Miyahara 1, Koya Shintani2, Kayoko Hayashihara-Kakuhou2, et.al. 2020. Effect of UVC Irradiation on the Oxidation of Histidine in Monoclonal Antibodies, Scientific Reports, NatureResearchs.

23. Pei Qi, David B. Volkin, Hui Zhao, Michael L. Nedved. 2009. Characterization of the Photodegradation of a Human IgG1 Monoclonal Antibody Formulated as a High-Concentration Liquid Dosage Form. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 98, No.9.
24. Allen Zielnik. 2013. Photostability Testing: Shedding Light on a Not Well Understood Guideline International Pharmaceutical Industry Spring / Summer 2013 Volume 5 Issue 2.
25. Lara O. Reid, Ernesto A. Roman, Andres H. Thoma and M. Laura Dantola. 2016. Photooxidation of Tryptophan and Tyrosine Residues in Human Serum Albumin Sensitized by Pterin: A Model for Globular Protein Photodamage in Skin American Chemical Society (ACS Publications).
26. Nitin Rathore and Rahul S. Rajan. 2008. Current Perspectives on Stability of Protein Drug Products during Formulation, Fill and Finish Operations *Biotechnol. Prog.* 2008, 24, 504-514.
27. Amy S. Rosenberg. 2006. Effects of Protein Aggregates: An Immunologic Perspective *The AAPS Journal* 2006; 8 (3) Article 59 (<http://www.aapsj.org>).
28. Aka-Any-Grah A, Kawthar Bouchemal, Armand Koffi, Florence Agnely, Min Zhang, Madeleine Djabourov, Gilles Ponchel. 2010. Formulation of mucoadhesive vaginal hydrogels insensitive to dilution with vaginal fluids. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.
29. Lynch, David K.; Livingston, William Charles (2001). *AnoColor and Light in Nature* (2nd ed.). Cambridge, UK: Cambridge University Press. p. 231. ISBN 978-0-521-77504-5. Retrieved 12 October 2013. Limits of the eye's overall range of sensitivity extends from about 310 to 1050 nanometers.
30. Valenzuela, David. «Espectro Electromagnético». *Fisic. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso*.
31. «Factores que influyen en los niveles de radiación UV. (Fuente: Global Solar, UV index. A practical guide. WHO, WMO, UNEP. 2002)-(Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales)». Consultado el 30 de agosto de 2021.
32. M A Mainster (2006). «Lentes intraoculares bloqueadoras de la luz violeta y azul: fotoprotección frente a fotorrecepción». *British Journal of Ophthalmology* **90** (6): 784-792. PMC 1860240. PMID 16714268. doi:10.1136/bjo.2005.086553.
33. CLARIANT. How do uv-absorbers work. Imprint in Germany: October 1997, 29 p.

34. Allen LV, Popovich NG, Anse HC. 2011. Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 9th ed. Williams & Wilkins, Philadelphia.
35. Amit A, Sharma Sharad, Ajazuddin, Khan Mohammed, Junaid Swarna. 2011. Theories and factors affecting mucoadhesive drug delivery systems. *Internacional journal of research in ayurveda and pharmacy*, 2(4), 115-1161.
36. Golay Josée, Cittera Elena, Di Gaetano Nicola, et al. 2006. The role of complement in the therapeutic activity of rituximab in a murine B lymphoma model homing in lymph nodes. *Haematologica/the hamatology journal*; 91(2).
37. Byrd JC, Stilgenbauer S, Flinn IW. 2004. Chronic lymphocytic leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*. p. 163-83.
38. Thomas DA, O'Brien S, Bueso-Ramos C, Faderl S, Keating MJ, Giles FJ, et al. 2003. Rituximab in relapsed or refractory hairy cell leukemia. *Blood*; 102:3906-11.
39. Boye J, Elter T, Engert A. 2003. An overview of the current clinical use of the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab. *Ann Oncol*; 14:520-35.
40. Lin TS, Lucas MS, Byrd JC. 2003. Rituximab in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*; 30:483-92.
41. Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, Solal- Celigny P, Bouabdallah R, Ferme C, et al. 2005. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol*; 23:4117- 26.
42. Treon SP, Hansen M, Branagan AR, Verselis S, Emmanouilides C, Kimby E, et al. 2005. Polymorphisms in FcγRIIIA (CD16) receptor expression are associated with clinical response to rituximab in Waldenström's macroglobulinemia. *J Clin Oncol*; 23:474-81.
43. Cooper N, Stasi R, Cunningham-Rundles S, Feuerstein MA, Leonard JP, Amadori S, et al. 2004. The efficacy and safety of Bcell depletion with anti-CD20 monoclonal antibody in adults with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*; 125:232-9.
44. Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, et al. 2004. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*; 350:2572-81. Un an.
45. Kirsten Lotte, Regina Plessow and Andreas Brockhinke. 2004. Static and time-resolved fluorescence investigations of tryptophan analogues – a solvent study.

Photochem. Photobiol. Sci. 2004, 3, 348-359. DOI: 10.1039/ b312436c.

46. Abdulla Badawy and Christopher J Morgan. 2010. Rapid Isocratic Liquid Chromatographic Separation and Quantification of Tryptophan and Six kynurenine Metabolites in Biological Samples with Ultraviolet and Fluorimetric Detection. *International Journal of Tryptophan Research* 2010:3 175–186, doi: 10.4137/IJTR.S6225.
47. Dinen D. Shah, Jingming Zhang, Haripada Maity, Krishna M.G. Mallela. 2018. Effects of photo-degradation on the structure, stability, aggregation, and function of an IgG1 monoclonal antibody. *International Journal of Pharmaceutics*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.007>
48. Nathan Downs, Alfio V Parisi, Linda Galligan, Joanna Turner, Abdurazaq Amar, Rachel King, Filipina Ultra, Harry Butler. 2016. Solar Radiation and the UV index: An application of Numerical Integration, Trigonometric functions, Online Education and the Modelling Process. *International Journal of Research in Education and Science (IJRES)*, 2(1), 179-189.
49. Luigi Grassi, Chiara Cabrele. 2019. Susceptibility of protein therapeutics to spontaneous chemical modifications by oxidation, cyclization, and elimination reactions. *Amino Acids* (2019) 51:1409–1431 <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02787-2>
50. Arnold G. Vulto and Orlando A. Jaquez. 2017. The process defines the product: what really matters in biosimilar design and production?. *Rheumatology* 2017;56:iv14-iv29. doi:10.1093/rheumatology/kex278
51. Elena Hipper, Michaela Blech, Dariush Hinderberger, Patrick Garidel and Wolfgang Kaiser. 2022. Photo-Oxidation of Therapeutic Protein Formulations: From Radical Formation to Analytical Techniques. *Pharmaceutics* 2022, 14, 72. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010072>
52. Iqbal Ahmad, Sofia Ahmed, Zubair Anwar, Muhammad Ali Sheraz and Marek Sikorski. 2016. Photostability and Photostabilization of Drugs and Drug Products. *International Journal of Photoenergy*. Volume 2016, Article ID 8135608, 19 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8135608>
53. Shihong Li, Christian Schoneich and Ronald T. Borchardt. 1995. Chemical Instability of Protein Pharmaceuticals : Mechanisms of Oxidation and Strategies for Stabilization. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 48, Pp. 490-500.

54. David Creed. 1984. The photophysics and photochemistry of the near-uv absorbing amino acids-ti. tyrosine and its simple derivatives. *Photochemistry and Photobiology* Vol. 39, No. 4. pp. 563 - 575, 1984
55. B. R. Dasgupta D. A. Boroff. 1965. Increased selectivity of photooxidation for amino acid residues *Biochim. Biophys. Acta*, 97 (1965) 157-159.
56. Bronislaw Marciniak and Krzysztof Bobrowski. 2022. Photo- and Radiation-Induced One-Electron Oxidation of Methionine in Various Structural Environments Studied by Time-Resolved Techniques. *Molecules* 2022, 27, 1028. <https://doi.org/10.3390/molecules27031028>
57. Christopher S. Foote. 1968. Mechanisms of Photosensitized Oxidation. *Science*. 29 November 1968, Volume 162, Number 3857
58. Koji Uchida*, Shunro Kawakishi. 1993. 2-Oxo-histidine as a novel biological marker for oxidatively modified proteins. *Federation of European Biochemical Societies*. Volume 332, number 3, 208-210.
59. Susan W. Hovorka, Christian Schoè Neich. 2001. Oxidative Degradation of Pharmaceuticals: *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 90, No. 3, March 2001 Theory, Mechanisms and Inhibition.
60. Stephanie Bellmaine, Alisa Schnellbaecher, Aline Zimmer. 2020. Reactivity and degradation products of tryptophan in solution and proteins. *Free Radical Biology and Medicine* 160 (2020) 696–718. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.09.002>
61. Luigi Grassi & Chiara Cabrele. 2019. Susceptibility of protein therapeutics to spontaneous. *Amino Acids* 51, 1409-1431. DOI <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02787-2>
62. Basant Sharma. 2007. Immunogenicity of therapeutic proteins. Part 3: Impact of manufacturing changes. *Biotechnology Advances* 25 (2007) 325–331. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.01.007
63. Edward T. Maggio. 2012. Polysorbates, Immunogenicity, and the Totality of the Evidence *BioProcess International* 10(10) November 2012
64. Sloey Christopher James, et al. 2014. aqueous formulation of erythropoiesis stimulating protein stabilized by antioxidants for Parenteral Administration. United States Patent Application Publication. Pub. No.: US 2014/0294859 A1.

65. Raj Kumar Thapa, Hanne Cecilie Winther-Larsen, Dzung B. Diep ,Hanne Hjorth Tønnesen. 2020. Photostability studies of GarKS peptides for topical formulation Development. European Journal of Pharmaceutical Sciences. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105652>
66. Robert P. Tansey, Newark abd George H. Schneller. 1953. Stablized folic acid and vitamin composition. United States Patent Office Serial No. 336,641.
67. B. R. Dasgupta D. A. Boroff. 1965. Increased selectivity of photooxidation for amino acid residues. Biochim. Biophys. Acta, 97 (1965) I57-I59
68. Annia Galano. 2015. Free Radicals Induced Oxidative Stress at a Molecular Level: The Current Status, Challenges and Perspectives of Computational. Chemistry Based Protocols J. Mex. Chem. Soc. 2015, 59(4), 231-262.
69. Durga Mahor, Julia Püschmann, Diederik R. Adema, Marc J. F. Strampraad, Peter-Leon Hagedoorn. 2020.Unexpected photosensitivity of the well-characterized heme enzyme chlorite dismutase JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry (2020) 25:1129–1138 <https://doi.org/10.1007/s00775-020-01826-8>
70. Kosuke Watanabe, Shohei Matsuda, Carlos A. Cuevas, Alfonso Saiz-Lopez, Akihiro Yabushita and Yukio Nakano. 2019. Experimental Determination of the Photooxidation of Aqueous I⁻ as a Source of Atmospheric I₂. ACS Earth Space Chem. 2019, 3, 669–679 <http://pubs.acs.org/journal/aescqg>
71. Jessica Bane, Olivier Mozziconacci, Li Yi, Y. John Wang, Alavattam Sreedhara, Christian Schöneich. 2016. Photo-oxidation of IgG1 and Model Peptides: Detection and Analysis of Triply Oxidized His and Trp Side Chain Cleavage Products. DOI 10.1007/s11095-016-2058-2
72. L. Coelho, I.F. Almeida, J.M. Sousa Lobo, J.P. Sousa e Silva. 2018. Photostabilization Strategies of Photosensitive Drugs. DOI <https://doi.org/10.1016/j.iipharm.2018.02.012>
73. Kohei Kawabata, Ayaka Takato, Sayaka Oshima, Shiori Akimoto, Masanori Inagaki and Hiroyuki Nishi. 2019. Protective Effect of Selected Antioxidants on Naproxen Photodegradation in Aqueous Media. Antioxidants 2019, 8, 424; doi:10.3390/antiox8100424
74. Atsushi Uchida, Hiroto Ohtake, Yukiko Suzuki, Hideyuki Sato, Yoshiki Seto, Satomi Onoue, Toshio Oguchi.. 2019. Photochemically stabilized formulation of dacarbazine with reduced production of algogenic photodegradants. International Journal of Pharmaceutics 564 (2019) 492–498. <https://doi.org/10.1016/j.iipharm.2019.04.063>

75. I. H. Leavearn D F. G. Lennox. 1965. Studies on the photodegradation of tryptophan. *Photochemistry and photobiology*. 1965 Vol. 4, pp. 491-497.
76. Douglas McG. Clarkson, Roger Harvey, Dave Sheepy. Light protection of chemotherapy drugs for infusion. 2015. *Medical Engineering and Physics* 37 (2015) 233–238. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medengphy.2014.11.010>
77. Mohamed El Aatmani, Sylvain Poujol, Cecile Astre, Françoise Malosse, and Frederic Pinguet. 2002. Stability of dacarbazine in amber glass vials and polyvinyl chloride bags. *Am J Health-Syst Pharm*—Vol 59 Jul 15, 2002.
78. Masaki Tashiro, Takafumi Naito, Chikoto Yamamoto, Shin-Ya Katoh and Junichi Kawakami. 2019. Impact of Light Shielding on Photo-Degradation of Dacarbazine during the Preparation Process. *Biol. Pharm. Bull.* 42, 2062–2068 (2019)
79. Giuseppina Ioele, Lorena Tavano¹, Michele De Luca, Rita Muzzalupo, Annalisa Mancuso, and Gaetano Ragno. 2017. Light-sensitive drugs in topical formulations: stability indicating methods and photostabilization strategies. *Future Med. Chem.* (2017) 9(15), 1795–1808.
80. Giuseppina Ioele, Fedora Grande, Michele De Luca, Maria Antonietta Occhiuzzi, Antonio Garofalo and Gaetano Ragno. 2021. Photodegradation of Anti-Inflammatory Drugs: Stability Tests and Lipid Nanocarriers for Their Photoprotection. *Molecules* 2021, 26, 5989. <https://doi.org/10.3390/molecules26195989>
81. Emad Yousif and Raghad Haddad. 2013. Photodegradation and photostabilization of polymers, especially polystyrene: review. *SpringerPlus* 2013, 2:398. <http://www.springerplus.com/content/2/1/398>
82. Mohd M. Khan, Bowen Jiang, Anthony Mazzeo and Kim Huynh-B. 2018. Stability challenges not addressed by harmonized guidance. Khan et al. *AAPS Open* (2018) 4:2 DOI 10.1186/s41120-018-0022-4
83. Mimmi L. E. Lundahl, Silvia Fogli, Paula E. Colavita and Eoin M. Scanlan. 2021. Aggregation of protein therapeutics enhances their immunogenicity: causes and mitigation strategies. *RSC Chem. Biol.*, 2021, 2, 1004. DOI: 10.1039/d1cb00067e
84. Yuefei Ji. 2014. Photochemical and photocatalytic degradation of pharmaceutical and personal care products (PPCPS) in aqueous solution : a case study of atenolol and 2-phenylbenzimidazole-5-sulfonic acid. *Hal Open Science*, NNT : 2014LYO10073
85. Amy S. Rosenberg. 2006. Effects of Protein Aggregates: An Immunologic Perspective. *AAPS Journal* 2006; 8 (3) Article 59 (<http://www.aapsj.org>).

86. Marián Carretero Colomer. 2007. Rituximab Tratamiento de la artritis reumatoide en pacientes que no responden a los tratamientos biológicos actuales con anti-TNF. Actualidad científica Medicamentos de vanguardia, OFFARM Vol 26 Num 5 Mayo 2007.

14. ANEXO

14.1. Artículo: Photodegradation of Rituximab and Critical Evaluation of Its Sensibility to Electromagnetic Radiation

RESEARCH ARTICLE

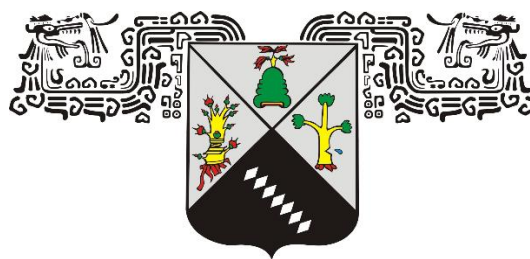
Photodegradation of Rituximab and Critical Evaluation of Its Sensibility to Electromagnetic Radiation

Víctor Pérez Medina Martínez¹ • Miriam Cedillo Robles² • Laura Carmina Juárez-Bayardo¹ •

Carlos E. Espinosa-de la Garza¹ • Angélica Meneses³ • Néstor O. Pérez⁴

Received: 17 May 2022 / Accepted: 29 August 2022

<https://doi.org/10.1208/s12249-022-02412-8>





Photodegradation of Rituximab and Critical Evaluation of Its Sensibility to Electromagnetic Radiation

Víctor Pérez Medina Martínez¹ · Miriam Cedillo Robles² · Laura Carmina Juárez-Bayardo¹ · Carlos E. Espinosa-de la Garza¹ · Angélica Meneses³ · Néstor O. Pérez⁴

Received: 17 May 2022 / Accepted: 29 August 2022

© The Author(s), under exclusive licence to American Association of Pharmaceutical Scientists 2022

Abstract

Rituximab is a monoclonal antibody used in the treatment of lymphoma non-Hodgkin. This mAb is photosensitive as it is administrated to the patient by infusion/perfusion; therefore, photostability is a decisive factor in the efficacy of this biologic. To better understand the photodegradation mechanisms of Rituximab, this biologic was exposed to different irradiance conditions. We show in this study that this mAb photodegrade proportionally to irradiance intensities. The main modifications of Rituximab by irradiance correlate to the increase in aggregates, decrease in its T_m , acidic charge variants, oxidation of the Trp (36) in the heavy chain, and decrease in complement-dependent cytotoxicity (CDC) potency. To understand the relationship between real-life photo-exposition conditions and ICH standardized light tests, a full characterization was set up. Worst photo-stress cases were evaluated, 1 and 2 h under direct sunlight through a window, mimicking the ID65 electromagnetic radiation profile. Our results show that only exposition to direct sun irradiance during 2 h, (≈ 150 kluxes•h), increases critically soluble and insoluble aggregates, diminishing T_m , increasing acidic charge variants, and the photooxidation of the Trp (36) in the heavy chain measured by peptide mapping-RP-UPLC-MS. A decrease in CDC below 80% resulted under this condition, which correlates with physicochemical analyses. While inside light-room exposition (similar to ICH test) and ICH conditions do not have any contribution to the degradation of Rituximab measured by these physicochemical and biological analytical methods. These results indicate that exposition of Rituximab to below ≈ 75 kluxes•h of sun light cannot photodegrade critically this biologic inside of its primary container.

Keywords acidic charge variants · photodegradation · photostability · rituximab · solar irradiance

Abbreviations

aa Amino acids

Abs Absorbance

ACN Acetonitrile

BSA Bovine serum albumin

CDC Complement-dependent cytotoxicity

CEX Cation exchange

C_H1 IgG heavy chain domain 1

CQAs Critical quality attributes

Cys Cysteine

DTT Dithiothreitol

DSF Differential scanning fluorometry

EC₅₀ Half maximal effective concentration

EU Emission units

Fab Fragment antigen-binding region

FBS Fetal bovine serum

Fc Fragment crystallizable region

FLR Fluorescence

HMWS High-molecular-weight species

His Histidine

MES 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid

Met Methionine

MS Mass spectrometry

NaCl Sodium chloride

PAP Papain protease

PS80 Polysorbate 80

RSD Relative standard deviation

✉ Néstor O. Pérez
nestor.perez@probiomed.com.mx

¹ Unidad de Investigación y Desarrollo, Probiomed S.A. de C.V., C. P. 52400 Tenancingo, Estado de México, Mexico

² Dirección de Calidad, Probiomed S.A. de C.V., C.P. 11520 Cd. de México, Mexico

³ Universidad Autónoma del Estado de Morelos, C.P. 62210 Cd. de Cuernavaca, Mexico

⁴ Dirección de Operaciones, Probiomed S.A. de C.V., C.P. 11520 Cd. de México, Mexico



RT	Room temperature (15–30°C)
RP	Reverse phase
SE	Size exclusion
SD	Standard deviation
TFA	Trifluoroacetic acid
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosine
UPLC	Ultra-performance liquid chromatography
UV	Ultraviolet

Introduction

Rituximab is a monoclonal antibody (mAb) used in the treatment of rheumatoid arthritis and lymphoma non-Hodgkin, usually administered with methotrexate [1.]. As a highly specialized biotherapeutic, high stability under photostability conditions is desirable (and compulsory) and during storage also [2.]. Biologics are exposed previous to their administration to some stress conditions such as heat, acid-base catalysis, agitation, chemical oxidation (e.g., peroxide oxidation due to PS80 autoxidation), or photodegradation.

Rituximab is sensitive to radiation [3.], and during administration, it can be exposed to fluorescent lamps or natural sun irradiation.

In terms of photodegradation, Rituximab leads to a complex oxidation profile, in which the amino acids His, Trp, Tyr, or Cys are the main targets of electromagnetic fields, due to their capacity to absorb photons by their π electrons bands. Some of the by-products of these amino acids are, but are not limited to, aspartic acid, isoaspartic acid, 4-oxo-histidine, kynurenine, 4-hydroxy tryptophan, kynurenine, N-formylkynurenine, hydroxyformylkynurenine, carbolines, and tryptophandiones [4. , 5.].

Exposition conditions are described in the ICH 1B guidance for Photostability Testing of New Drug Substances and Products. In this guidance, products must be exposed to 1.2 Mluxes•h and 200 W•h/m² for UVA (320–400 nm). Comments for its application established two options for testing products, as exposition to 1.2 Mluxes of light carries a UVA component related to the fluorescent lamp to which drug products are tested in a photostability chamber (not comprised in the guidance), which is indeed higher than the amount established on it. Therefore, researchers expose samples to radiation exposure in the visible and UVA range to cover both requirements. In our example, exposition to 1.2 Mluxes•h at an irradiance level of 0.83 W•h/m²•h for 10 days, using a fluorescent lamp, which included the UVA range.

Conditions described in this guidance, nonetheless, are laboratory conditions, which cannot cover for-actual radiation conditions. Therefore, establishing relevant light sources is not an easy task, due to the diversity of radiation sources

to which biologics can be exposed. For example, sunlight intensity varies throughout the year, primarily by radiation incidence angle or climatic conditions [6.]. Therefore, some considerations must be taken into account. Fortunately, there are some advances in the field, and actual-life light exposure conditions were previously suggested [7.].

Near-UV radiation and blue radiation in the visible range are considered the main deleterious light sources to which biologics can be exposed. ICH recommended conditions, have a high UV component under mild light conditions [7.]. While exposition to UVC and UVB is not expected [3.]; near UVA radiation and visible light can pass all over these materials and photodegrade proteins [8.]. This spectral band is known as ID65 [2. , 7.].

Thus, UV light sources must comply with some specifications, and incident electromagnetic radiation must be measured during drug substance or drug product exposition. On the other hand, visible (i.e., above the blue range) and infrared radiation is considered insignificant for biologics degradation [8.]. Proteins are considered photo-unstable molecules, Rituximab as a drug product is subjected to photodegradation processes when exposed to inside lightroom conditions. During the upstream and downstream production pipeline, it is exposed to fluorescent lamps light inside biopharmaceutical facilities. Additionally, during its shelf life, Rituximab can be exposed to sunlight radiation inside hospitals through their glass windows, when (a) it is administered to patients (1–2 h) and (b) while a nurse or pharmacist delivered the drug product to “in use” areas.

To date, no photosensitivity study was published or reported for Rituximab under radiation “real-life conditions,” and compared to ICH 1QB conditions as previously recommended [2.]. Analyses of samples exposed to radiation were performed using state-of-the-art analytical methods.

Materials and Methods

Materials

During the execution of this study, the following reagents and materials were used: analytical-grade acetonitrile (ACN), citric acid, dithiothreitol (DTT), sodium acetate, sodium citrate, sodium diacid phosphate monohydrated, sodium dibasic phosphate dihydrate, 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES), sodium chloride, sodium phosphate dibasic heptahydrate, and sodium sulfate, from J.T. Baker (Center Valley, PA, USA). Analytical-grade hydrochloric acid, sodium hydroxide, urea, trifluoroacetic acid, and mass spectrometry-grade materials like acetonitrile, water, trypsin, and formic acid were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Bovine serum albumin (BSA)

standard was obtained from Pierce (Rockford, IL, USA). 96-well flat-bottom white polystyrene plates TC-treated and 96–100- μ L-well plates for qPCR were obtained from Corning (Corning, NY, USA). Human serum complement was obtained from Quidel (San Diego, CA, USA). Protein Thermal Shift Kit® was obtained from Applied Biosystems (Waltham, MA, USA). Deionized water used for all analyses (except for MS) was obtained from a Millipore Milli-Q purification system. FBS (CAT SH30071) from Hyclone and RPMI 1640 medium with phenol red, with L-glutamine, without sodium bicarbonate, were obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Rituximab drug product used in this study was produced in-house by Probiomed S.A. de C.V (Mexico City, Mexico). Three batches of this product were used in this study. Rituximab was formulated in citrate buffer (25 mM), NaCl (154 mM), and PS80 (0.18%), at pH 6.5. All solutions were filtered through a 0.2- μ m hydrophilic polypropylene membrane from Merck Group (Darmstadt, Germany) except for DLS and zeta potential samples which were filtered through 0.1 μ m. Alamar blue was from Bio-Rad® (Hercules, CA, USA). WIL2-S cells No. CRL-8885 were from the ATCC cell bank.

Analytical Methods for Rituximab Characterization

Photo Exposition Conditions

The conditions of Rituximab samples exposed to varied irradiation conditions are depicted in Table 1.

Rituximab samples in 50R borosilicate glass vials under ICH conditions were exposed to 1.2 Mluxes during 10 days at 5°C (controlled temperature) inside of a SunTest light

chamber. Under this condition, the UVA component is about 2.5–3 times higher than specified in the ICH 1B [7, 9]. Therefore, this radiation condition is fully covered.

Rituximab samples in their original primary closure container (R6 borosilicate glass vials) were placed in different locations inside of a building during 1 and 2 h, which is approximately the administration time by infusion/perfusion of 770 mg of the drug product to patients.

Samples were tested for photosensitivity to the sunlight itself over the timeframe to which it could be exposed as the worst case. Solar irradiance is represented by the following equation:

$$G = \int_{\lambda=290 \text{ nm}}^{\lambda=2800 \text{ nm}} G \lambda d\lambda$$

Samples were placed to direct sunlight equivalent to 75,537 (1 h) and 145,093 luxes (2 h) after a window of 6 mm wide (SunR samples), 1 m from the window 2 h (DiffR2h samples) and 3 m from the window (control). Samples irradiated inside its secondary closure container were labeled as SecPR2h. Irradiation was performed between 10 am and 12 am at location 18.951876° latitude and – 99.598095° longitude using the Geographic Coordination System, and 2053 m above sea level, on January 28, 2021, on a clear day. The amount of solar radiation a few centimeters out of the building were about 99,800 luxes at the peak of irradiation (10:45 am). These samples were exposed inside their primary container.

Illumination was measured using a luxometer Lutron model LM-81LX and a luxometer Akozon Digital model LX1330B for high intensities; although the UV and IR

Table 1 Exposition Results (in luxes/hs) Obtained from Integrated Functions Within Specified Limits

Section	Photoxidated samples	Acronym	Description	UV and Vis exposition	UV interval (nm)	Conditions
1	Sunlight directly exposed samples	SunR2h	In its primary closure container	Direct exposition to sunlight of drug product through a glass window (6 mm) in its primary container closure.	300–800 (ID65) (UVB and UVA)	2 h, 1 h, 8°C to \approx 37.5 and \approx 39°C, 6R vials
		SunR1h				
		SecP2h	In its secondary and primary closure container	Direct exposition to sunlight of drug product through a glass window (6 mm) (control)	300–800 (ID65) (UVB and UVA)	2 h, 8°C to \approx 22–24°C, 6R vials
	Sunlight indirectly exposed samples	DiffR2h	In its primary closure container	Indirect, 1m distance from window	300–800 (ID65) (UVB and UVA)	2 h, 8°C to 23–24°C, 6R vials
2	Near-UV-exposed samples (NUVE)	SE	Inside of secondary container control	Fluorescent lamp, 1.2 Mluxes	320–400 (UVA)	10 days, calibrated lamp, 5 \pm 3°C, 50R vials
		CO	Aluminum foil-covered sample			
		FO	Photoxidated samples			

component is missing using these instruments, these devices provide us a characteristic measure of the total energy received by samples in the visible range. Functions that describe illumination of samples were as follows:

$$\text{Luxes}/\text{hs} = a \cdot T^6 - b \cdot T^5 + c \cdot T^4 - d \cdot T^3 + e \cdot T^2 - f \cdot T + g$$

Integration of functions gave us the total illuminance within the described timeframe:

$$\int_{T=10}^{T=12} (a \cdot T^6 - b \cdot T^5 + c \cdot T^4 - d \cdot T^3 + e \cdot T^2 - f \cdot T + g) dT$$

where T is the hour of the day, and lowercase letters are the coefficients that describe each empirical function.

At least five decimals were used for coefficients in the functions to get the approximate correct results.

Absorbance at 320 nm

A spectrophotometer DU-650 Beckman was used for the detection of insoluble aggregates using a QS quartz cell with a 1-cm cell path. Samples were analyzed at 10 mg/mL. All samples were sterile filtrated (previous to solar irradiation stress) using a membrane of 0.2 μm , which eliminated big-sized particles that scattered light, which are not related to radiation.

Size Exclusion Chromatography (SEC-UPLC-FLR)

SEC analyses were executed as previously cited [10.]. Briefly, chromatography was executed in an Acquity Waters UPLC system. The column used was a TOSOH TSK gel 3000SWxl 7.8 mm \times 300 mm, 5 μm particle size. The mobile phase was 0.05 M phosphate buffer at pH 6.9 with 0.1 M sodium sulfate. The chromatographic run lasts for 22 min at a continuous flow of 0.7 mL/min. Protein detection was performed using UV at 280 nm and fluorescence with an excitation wavelength of 295 nm and detecting fluorescence emission at 340 nm. Ten microliters of each sample was injected into the chromatographic system at a concentration of 1 and 10 mg/mL. Unmodified samples, SE, and CO were used as controls.

Dynamic Light Scattering

Rituximab size can be measured by dynamic light scattering (DLS). The correlation between speed and size was calculated using the Rayleigh-Gans-Debye limit equation [11., 12.].

Hydrodynamic radius measurements of Rituximab were performed in a Möbius instrument (Wyatt) at a concentration of 1 mg/mL dissolved in buffer, using a 1 cm path length PMP cell. Curves were adjusted to the Regularization

fit model. Measurements were acquired during 15 s ($n = 3$). BSA from Thermo Scientific (2 mg/mL) was used as the hydrodynamic radius reference substance. An unexposed sample was used as the initial hydrodynamic radius reference.

Cation Exchange Chromatography (CEX-UHPLC-UV/FLR) and CEX-UHPLC-Papaine (PAP)

Gradient CEX chromatography was run in an Acquity Waters UPLC System using a Protein Pak SP (sulfopropyl) column 1000 Å, 4.6 \times 100 mm, 7 μm (Waters). The column temperature was set to 30°C. A gradient chromatography using 10 mM MES buffer at pH 6.5 as eluant A and 100 mM phosphate buffer with 500 mM NaCl as eluant B at pH 6.5 was performed. The chromatographic gradient was set as follows: Mobile phase B from 5 to 20% in 17 min, then to 100% in 0.1 min, next 0.9 min to 5%, and another 2 min were added for equilibration. Mobile phase flow was set to 0.8 mL/min. Ten microliters was injected into the chromatographic system at 2 mg/mL and samples were kept at 15°C during the analyses. UV detection was performed at 280 nm and fluorescence with an excitation wavelength of 275 nm and detecting emission at 340 nm. Unexposed radiated were used as controls.

Digestion with papain of Rituximab was performed in a proportion of 1 mg per 25 mg, respectively, in tricine buffer 100 mM, Cys 1 mM, Met 10 mM, EDTA 10 mM, at pH 7.4 during 30 min at 37°C. Later, samples were diafiltered through 3-kDa diafiltration units, and resuspended in the matrix (citrate buffer 25 mM, NaCl 154 mM, polysorbate 80 0.18%, pH 6.5) at 2 mg/mL. Finally, 10 μL was injected into the chromatographic system.

The gradient was as follows: eluant B was taken from 0 to 16% in 17.0 min, next to 100% in 0.1 min, to 0% in another 0.1 min, and finally during 1.8 min at 0% for equilibration. Mobile phases were the same as in CEX analyses.

Zeta Potential

Zeta potential measurements were performed in a Möbius instrument (Wyatt). Samples at a concentration of 1 mg/mL were filtered through 0.1- μm membranes and placed manually in the electrophoretic cell. Electrophoresis was performed at the electric oscillation of 20 Hz at 20°C, 2.5 V during 15 s in low LASER mode (technical plus biological replicates $n = 3 + 3$). After measurement, the cell was also verified for the absence of bubbles.

Peptide Mapping (RP-UPLC-UV/FLR/MS)

Digestion of samples was performed as cited elsewhere [13.]. Briefly, 30 mg (3 mL) of Rituximab were dissolved in

20 mL of a reduction buffer (8 M urea, 20 mM ammonium bicarbonate, and 10 mM DTT) and incubated at 70°C for 3 min.

After this time, samples were cooled to room temperature and mixed with 115 mL of 20 mM ammonium bicarbonate (5 × dilution). A total of 1.5 mg of purified trypsin (1.5 mg trypsin/mL) was added to each sample and incubated for 5 min at 37°C. Samples were quenched with 11.5 µL of TFA 10% after reverse-phase analyses were performed. Mobile phases were: eluant A, 0.1% TFA in purified water (Milli Q 0.069µS/cm) and eluant B 0.1% TFA in ACN. The flow was set up to 0.2 mL/min. The gradient was performed as follows: Eluant B at 1% during 5 min, from 1 to 45% in 115 min, from 45 to 100% in 10 min, at 100% during 10 min, from 100 to 1% in 1 min and equilibration for 9 min.

Detection was performed using UV light at 214 nm.

TOF MS was adjusted in the range of 50 to 3500 Da, positive polarity, within collision energy of 6 V to 38 V. Cone voltage was adjusted to 40 V. Formic acid was used for MS chromatographic eluants instead of TFA including quenching Rituximab tryptic digestions.

CDC Activity

WIL-2S cells were used as target cells in the complement-dependent cytotoxicity (CDC) assay. Cells were seeded in RPMI 1640 culture media supplemented with 10% FBS. Serial dilutions of Rituximab were prepared in the presence of target cells (50,000 cells, 50 µL/well) and human serum complement (Quidel A113) at a dilution of 1:5 (50 µL per well). Final concentrations of Rituximab in the assay were from 0.114, 0.0651, 0.0372, 0.0213, 0.0122, 0.00695, 0.00397, and 0 µg/well in serial dilutions of 1:1.75 in a total of 150 µL/well. Ninety-six-well flat-bottom black polystyrene plates (Corning), loaded with samples were incubated at 37°C, 5% of CO₂ for 2 h. After this time, 20 µL of Alamar Blue was added to each well. Plates were incubated for another 24 h at 37°C and fluorescence was measured in a Spectramax M3 spectrophotometer exciting at 530 nm and detection performed at 590 nm (biological replicates; *n* = 3).

Protein Thermal Shift by Differential Scanning Fluorometry

Denaturation of unmodified (control) Rituximab-photodegraded species was executed through Sybr Green adsorption (25×, 2 mL each well) and fluorescence in a temperature ladder of 1°C every 31 s from 24 to 93°C (70 cycles). Temperature gradient was performed in a 7500 Applied biosystems thermocycler using the protocol provided by the manufacturer (Applied Biosystems). The final volume was adjusted to 40 µL. The quantity of protein was about 38 µg per well. T_m was calculated using the Boltzmann equation adjusted

within the limits of each sigmoidal curve and results were averaged (*n* = 6) using the Origin-Lab software® version 8.1 SR2.

Structural stability and resistance to thermal-induced denaturation were evaluated comparatively for the unmodified (control) and the Rituximab exposed directly to sunlight. Technical replicates: *n* = 6.

Statistical Analyses and Graphics Design

Statistical analyses, figures, and graphics were performed with the OriginLab software® version 8.1 SR2. The number of biological and technical replicates is described in each figure and graph captions. Biological replicates refer to independent vials radiated with solar energy. While technical replicates indicate analyses from the same vial.

Results

Photodegraded Rituximab Samples Under ICH Q1B [2.] Conditions

We incubated Rituximab samples using two different perspectives (Table I). First, we incubated drug products using ICH conditions, that is, exposed to 1.2 Mluxes for 10 days, with temperature control at 5°C in 50R borosilicate vials. Secondly, to expose samples to actual conditions.

Characterization analyses of these samples are depicted in Table S1. The samples suffer limited physicochemical and biological changes, from the results of these analyzes, only tiny differences were achieved between the FO sample and controls (ES, CO). Abs at 320 nm, SEC-UHPLC-UV/FLR, CEX-UHPLC UV/FLR, CEX-PAP-UHPLC UV/FLR, zeta potential, DLS, DSF, and CDC could not detect any differences within these samples. Only photodegradation of the one peptide from the FO sample was detected to change, but not enough to affect biological activity.

Samples at 10 mg/mL, were measured in a spectrophotometer for detecting insoluble aggregates using a quartz cell. No differences can be detected between ES, FO, and CO (NUVE samples) as shown in Table S1.

Although photodegraded samples have a smaller zeta potential than controls, (that is below 1 mV) these results are within the analytical method uncertainty, which has a standard dispersion of about 50% [14.].

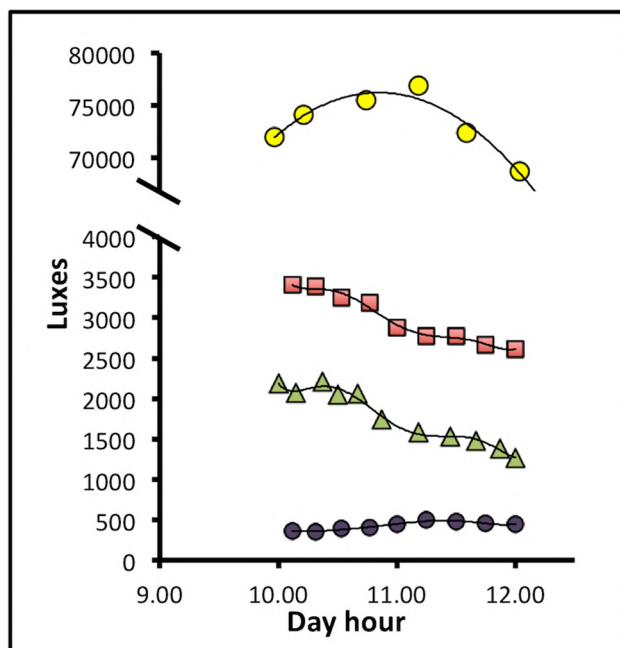
DSF analyses of the T_m for samples FO and CO denoted a *p* of about 0.04, however, the difference of 0.37°C between them, is small, as determined before by some authors who stated that differences less than 1–3°C are insignificant [15.].

SEC analyses showed a *p* of about 0.05 between SE and FO samples, but the 1.13% amount of aggregates in the FO

samples is far from the specification limit of aggregates, which is stated in 3–5% for biologics, in which 0.9% of aggregates for Rituximab is considered an acceptable quantity [16.]. Moreover, the difference in the number of aggregates between SE and FO samples (1.09 and 1.13%, respectively) does not have a deleterious effect on its CDC potency. A reference of Harvard University accounts for 6.5% of aggregates for a mAb [15.], which apparently is a standard amount of aggregates that do not impact over mAbs efficacy. On the contrary, it is accepted that it can impact over its safety [17., 18.].

CEX analyses showed a difference of 2.6% for basic charge variants between SE and FO samples, although the p of 0.07 denotes an important change, this difference does not account for biological effects. The reason for a low p can be understood in the context of analytical method accuracy, samples can be statistically different, but this difference does not affect the product quality. Understanding that a 5% difference is statistically important.

Exposition to a calibrated near-UV lamp equivalent to 1.2 Mluxes does not lead to significant changes tracked by CDC (Table S1). Although, this condition leads to approximately 2–3 times the near-UV exposition, is not enough to degrade



Graph 1 Ten milliliters of Rituximab drug product at 10 mg/mL was filled in 6R vials and exposed to direct and diffuse solar radiation. **A** SunR samples were exposed to direct solar radiation (white circle). **B** DiffR samples (square), 1 m far away from the window, and SecP2h samples (triangle) exposed to direct solar radiation inside both, primary and secondary containers. Control was exposed to a fluorescent lamp during 2 h (black circle). Measurements were done with a calibrated luxometer (Lutron, LT, LM-81LX) each \approx 15 min during the 2 h. This graph shows a light profile that must prevail around Mexico City during the winter season, also depicted the hours of the day (about 10 to 12 am) where solar radiation is highest

Rituximab during 10 days (\approx 0.8 W/h). Any effect over CDC biological activity was detected, which is the main effector function of Rituximab [19., 20.].

Photodegraded Rituximab Samples Under Sun Radiation Conditions

Rituximab solutions on its primary closure container (6R vials) were exposed to solar radiation throughout a window and at different distances from it. Two conditions were tested over this scheme, direct solar irradiation and diffuse radiation denoted throughout this article as SunR (sun direct light) and DiffR (sun indirect light) samples, respectively. Some other parameters, e.g., latitude, longitude, date, and hour of the day, were recorded, as all of them influence the solar irradiation over the mAb [6.] (for details see “Materials and Methods”).

In order to characterize the irradiation, we measured the luxes that reached the samples during direct sunlight (SunR), indirect sunlight (DiffR), and the control; as we can see in Graph 1, the intensity (luxes) changes drastically. Functions that describe illuminance inside this building in different places are of quadratic form. Integration of those functions within 10 to 11 am and 10 to 12 am gave total illuminance exposed to samples (Table II).

Physicochemical Analyses of SunR, DiffR, and SecPR Samples

Table II shows the samples and conditions used for the experimentation. Briefly, the samples SunR were exposed to sunlight through a glass window with and without, secondary container (SecPR2h), and indirect light at 1 m from the window (DiffR2h). The NUVE samples were presented earlier.

Aggregates Generated After Rituximab Irradiation

Insoluble Aggregates Absorbance at 320 nm was measured for detecting insoluble aggregates, which are large particles that scatter light, which differ from soluble proteins that do not scatter light at this wavelength.

Sunlight window filtered direct solar irradiated samples (SunR) showed that there is an important increase in insoluble aggregates after 2 h, compared to 1 h ($p = 0.040$) about 20% of the total Abs at 320 nm of SunR2h sample (Fig. 1A). However, no differences were observed between SunR 1 h and non-direct sunlight samples exposed during 2 h (DiffR2h samples), respectively ($p = 0.45$). A comparison of SunR 2h samples is different from its respective control (SecPR2h) ($p = 0.016$) in about 12.6%. This shows that a secondary container helps to inhibit aggregation in Rituximab by filtering direct solar radiation (ID65). Considering that $p < 0.05$ means significant, the radiated SunR 2h sample has a measurable change in insoluble aggregates.

Table II Distribution of Samples Analyzed in This Work

Package	Photoxidated samples	Acronym	Amount of illuminance exposed to samples	Time limits
6R Glass Vials	Sunlight directly exposed samples (SunR)	SunR2h	145093	10 to 12 am
		SunR1h	75537	10 to 11 am
6R glass vials plus cardboard package		SecP2h	3514	10 to 12 am
6R glass vials	Sunlight indirectly exposed samples (DiffR2h)	DiffR2h	5993	10 to 12 am
	Control	Control	834	10 to 12 am

Interestingly, analyses of samples by DLS show other molecules with higher-molecular-weight species (HMWS) in addition to Rituximab itself (Table III); however, they are not present in the three independent samples. The last column in Table III shows some of these aggregates. Aggregates in sample SunR 2h appear to have about 2.5 μm in accordance with measurements at 320 nm. Differences related to HMWS within technical replicates can be explained because insoluble aggregates can flocculate and precipitate. Therefore, no homogeneous suspensions are generated.

Zeta Potential of Photodegraded Samples

Results of solar radiated samples also show any detectable change in zeta potential (Fig. 1B).

Photodegradation Effect over Thermal Stability of Rituximab

Rituximab (SunR2h) melting temperature (T_m) decreased about 0.8°C after 2 h of exposition to direct sun irradiation (ID65) compared to the SunR1h sample (Fig. 1C) and 1.02°C with respect to the control. Control T_m is similar to the DiffR sample in this experiment.

Rituximab Complement-Dependent Cytotoxicity Activity Changes After Sun Exposure Through the Glass Window

It is generally believed that common laboratory conditions after exposition to fluorescent lamps lead to photodegraded drug products [21]. After 2 h of sunlight equivalent to $\approx 150,000$ luxes, CDC potency changed (Fig. 1D). Differences between the other samples were less than 5%, which indeed is not enough to define significant damage to molecules.

Soluble Aggregates

Soluble aggregates were detected using size exclusion chromatography (SE-UV/FLR-UHPLC) technology.

Differences between SunR2h and SunR1h samples (sun irradiated) with the control (cardboard packed, SecPR2h) are about 1.14% and 0.14% of aggregates, respectively (Fig. 2A). While difference between SunR 2h and 1h with DiffR 2h samples are even higher. Ranging from 1.23% (SunR 2h vs DiffR 2h), 0.24% (SunR 1h vs DiffR 2h).

Acidic and Basic Charge Variants Generated After Rituximab Exposition to Solar Radiation

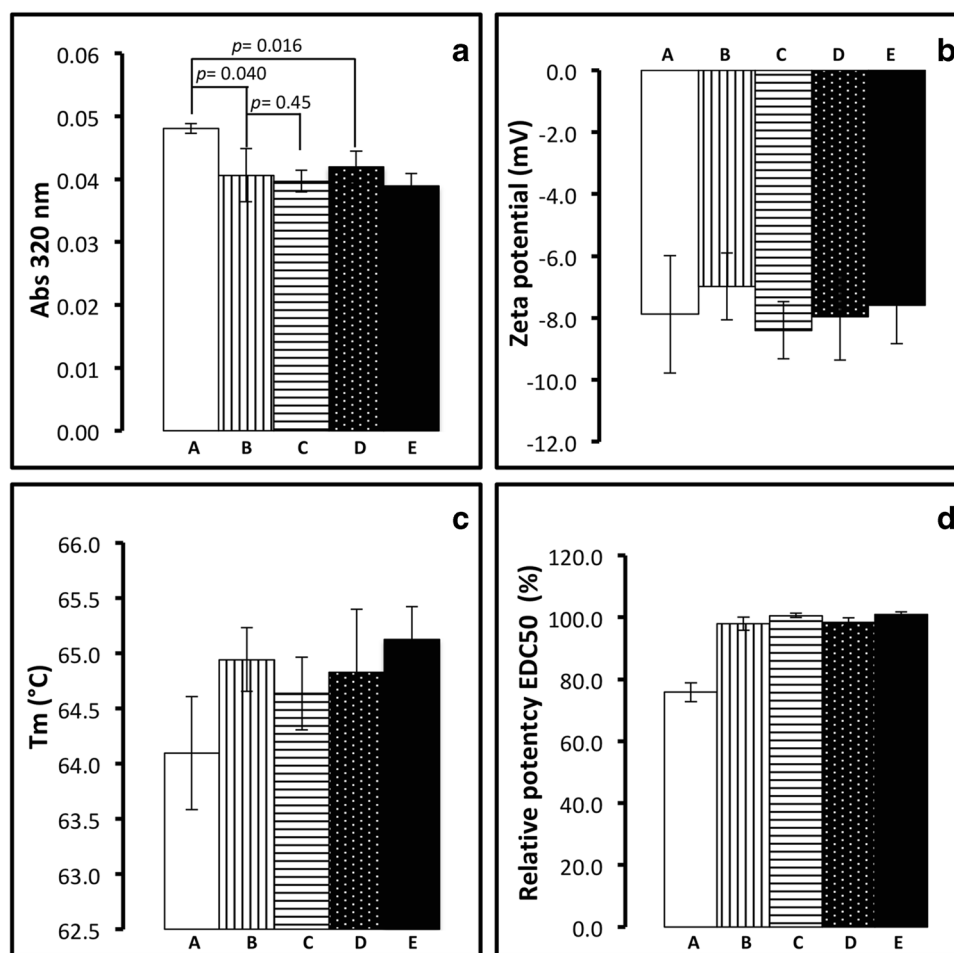
Analyses of acidic species in Rituximab show a larger change between SunR 2h and SunR 1h samples ($33.3 \pm 1.4\%$ to $37.3 \pm 0.7\%$) when detected by UV absorption (280 nm) than detected by FLR ($32.8 \pm 0.2\%$ to $36.3 \pm 0.7\%$) (295 nm ex, 340 nm em) (Figs. 3A and 4A, whereas p is bigger using FLR detection ($p = 0.001$) than UV detection system ($p = 0.01$) between SunR samples.

We did not observe any difference between basic charge variants detected by UV and FLR (data not shown). Results showed that basic charge variants have Trp as aromatic amino acids, and these Trp's present in those charge variants are not affected by this amount of radiation, maybe due to the stabilization of amino acids in its vicinity. This can be explained as those amino acids could be present inside of the molecule, stabilizing internal amino acid bonds by salt bridges [22].

Comparison of acidic, and the main peak of Rituximab in SunR2h samples with SunR 1h samples showed p values of 0.001, and differences of 3.5 and 5.9% correlative to acidic, and principal peaks of Rituximab (Fig. 4A and B) are higher in comparison to the following photodegradation level, e.g., DiffR2h samples, in which those differences range in about 1.0 and 0.9%, respectively.

CEX-UPLC results show that Rituximab is prone to degradation when the sample is radiated and heated than just radiated. At the end of the exposition, SunR2h samples reached $\approx 39^\circ\text{C}$ while SunR 1h $\approx 37.5^\circ\text{C}$. This temperature was promptly reached, as in time “zero” samples had 8°C and after about 30 min were about 33°C . The other samples radiated with reflected solar radiation (DiffR and control) were at $22\text{--}25^\circ\text{C}$ after 2 h (RT). Samples were exposed to

Fig. 1 Analyses of SunR2h, SunR1h, DiffR2h, and SecP2h samples. **A** Abs 320-nm analyses. $n = 3$. **B** Zeta Potential analyses $n = 3$. **C** T_m analyses by DSF $n = 6$. **D** CDC analyses $n = 3$. Error bars are in SD. Depicted SunR2h samples as A, SunR1h samples as B, DiffR2h samples as C, SecP2h samples as D and Control as E. Some error bars are smaller than the size of markers. Biological replicates are mentioned in each analysis



solar radiation without temperature control to simulate real-life photodegradation conditions (Figs. 3 and 4).

Interestingly, differences between acidic charge variants of SunR 2h with SunR 1h samples, seem to be higher, detected by UV than FLR (4.0 vs 3.5%), meaning that (1) other aromatic amino acids are affected by radiation dose (differences between ULPC detectors), but (2) not by the heat itself, as the temperature difference at the end of the exposition time between DiffR samples and SunR 1h samples was about 12.5°C and between SunR 2h and SunR 1h about 1.5°C.

Principal peak of Rituximab has proportionally inverse behavior to acidic species (Figs. 3B and 4B).

Fc of Rituximab Is More Susceptible to Photodegradation than Fab

Measurements of SunR samples showed similar behavior to the other analyses. Showing that Fc is more susceptible than Fab to photodegradation (Fig. 5A and B). Comparison of p values between SunR 1h samples to DiffR 2h (Fc $p = 0.021$ vs Fab $p = 0.62$ samples suggest a greater difference of degradation in Fc fragment than in Fab. Although the number of Trps in Fc (8 in

466 aa corresponding to 1.72% of the fragment) is lower than in Fab (18 in 874 aa corresponding to 2.06%), in proportion, (7LBL and 2VJA PDB structures) it suggests a lower stability of Trps in the Fc fragment.

Peptide Mapping Analyses of Rituximab After Photodegradation

Results show that some peptides are mainly affected after 2 h (Fig. S1).

Table III DLS Measurements of Radiated Rituximab Samples ($n = 3$). Aggregates Were Detected Just in Some Independent Samples, as Depicted

Samples	Rh (nm)	RSD	% Mass	Aggregates (nm)
SunR2h	5.47	1.1	99.8	2532
SunR1h	5.10	3.9	99.9	46.3, 240.2
SecP2h	5.30	1.9	99.9	–
DiffR2h	5.23	1.1	99.8	30.3, 83.6
Control	5.27	1.1	100.0	32.4

Fig. 2 Analyses of SunR2h, SunR1h, DiffR2h, and control samples by SEC-UPLC-FLR analyses induced by direct solar radiation. The first points close to 0 luxes, represent the control and DiffR2h, samples. **A** Induced aggregates $n = 3$. **B** Rituximab monomer analyses. **C** (a) SunR2h sample $\approx 150,000$ luxes, (b) SunR1h sample $\approx 75,000$ luxes, (c) DiffR2h samples < 6000 luxes; $n = 3$. *P* bars compare DiffR2h with SunR1h; and SunR1h with SunR2h samples, respectively. Error bars are in SD. Some error bars are smaller than the size of markers

Also, samples show that there are some amino acids prone to be degraded at low radiation energies, due to an abrupt increase in the area of those peptides' peaks compared to radiation absent control.

Discussion

Rituximab Photodegradation Under ICH 1B Conditions

The main objective of this work is to investigate, whether under controlled and real photo exposition conditions, Rituximab can be affected by near UV-Vis radiation, modifying Rituximab physicochemical properties and compromising its efficacy.

An important difference between light and radiation must be stated; as light refers to the visible spectrophotometric radiation, defined as illuminance equal to visible radiation over a specific area, whereas radiation comprises the complete UV, Vis, or even IR range also. Irradiation refers to sun radiation over a specific area, or a sample.

Our results showed that Rituximab is not photo-sensitive under ICH 1B conditions (Table S1), just as radiated samples with 1.2 Mluxes have a UV component of approximately 2.5–3 times higher than established in the regulation [9, 23]. The analyses showed any important change, neither physicochemical nor biological analysis. Authenticating, the comparability between photo-exposed samples and controls.

By contrast, Sreedhara and collaborators showed that ICH conditions degrade five different proteins [7]. It is known that the amount of radiation delivered to any sample must comprise a frame of time in which photons, kinetic, or chemical energy affect a drug product. They exposed five different mAbs to 1.2 Mluxes•h, but during 24 h instead of 10 days, like our experiment. Exposition to 1.2 Mluxes•h written in the ICH 1B is an illuminance measure that comes from the exposition of samples to 500 luxes (fluorescent lamps of laboratories, stability chambers, or office rooms) during 100 days, 24 h a day, [23.] approximately 3 months. The dose (of photons) that receives a sample (1.2 Mluxes•h) during two different timeframes (e.g., 2 h, or a week) is not the same, mainly because activation energies for some amino

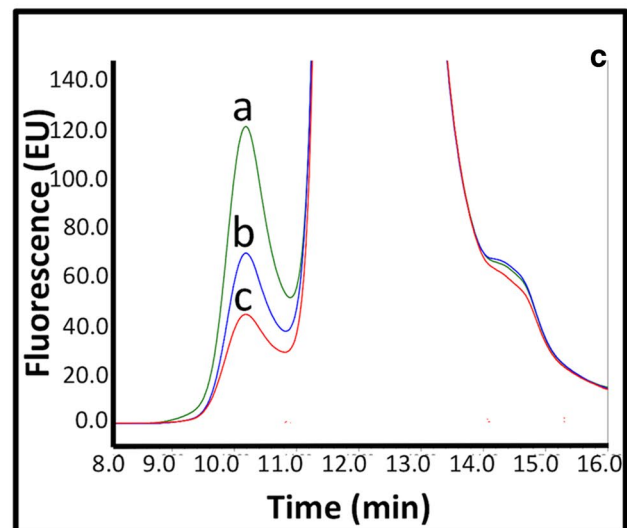
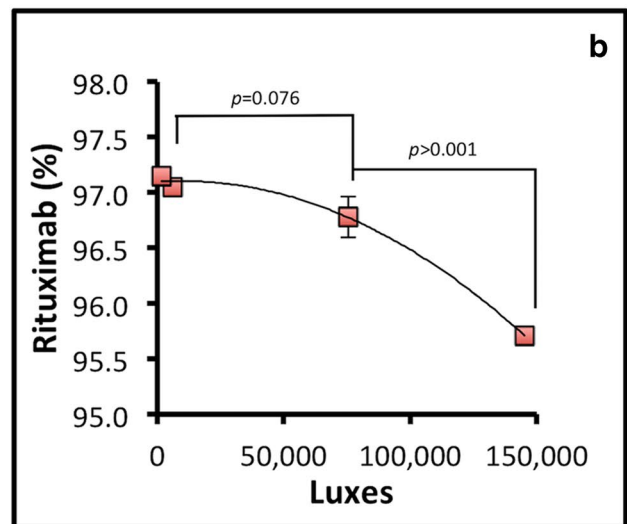
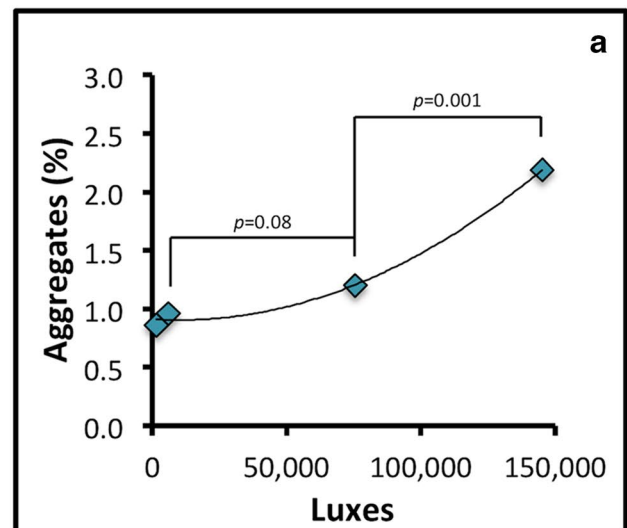


Fig. 3 Analyses of SunR2h, SunR1h, DiffR2h, and control samples by CEX-UHPLC-UV analyses of **A** acidic charge variants area; **B** the principal peak of Rituximab area; **D** (a) and **E** (f) SunR2h sample $\approx 150,000$ luxes; **C** (b) and **D** (e) SunR1h sample $\approx 75,000$ luxes; **C** (c) and **D** (d) DiffR2h < 6000 -lux samples; $n = 3$. Error bars are in SD. Some error bars are smaller than the size of markers. There were no changes in basis charge variants. p values of graphs are calculated for DiffR2h-SunR1h groups, and DiffR2h-SunR2h groups

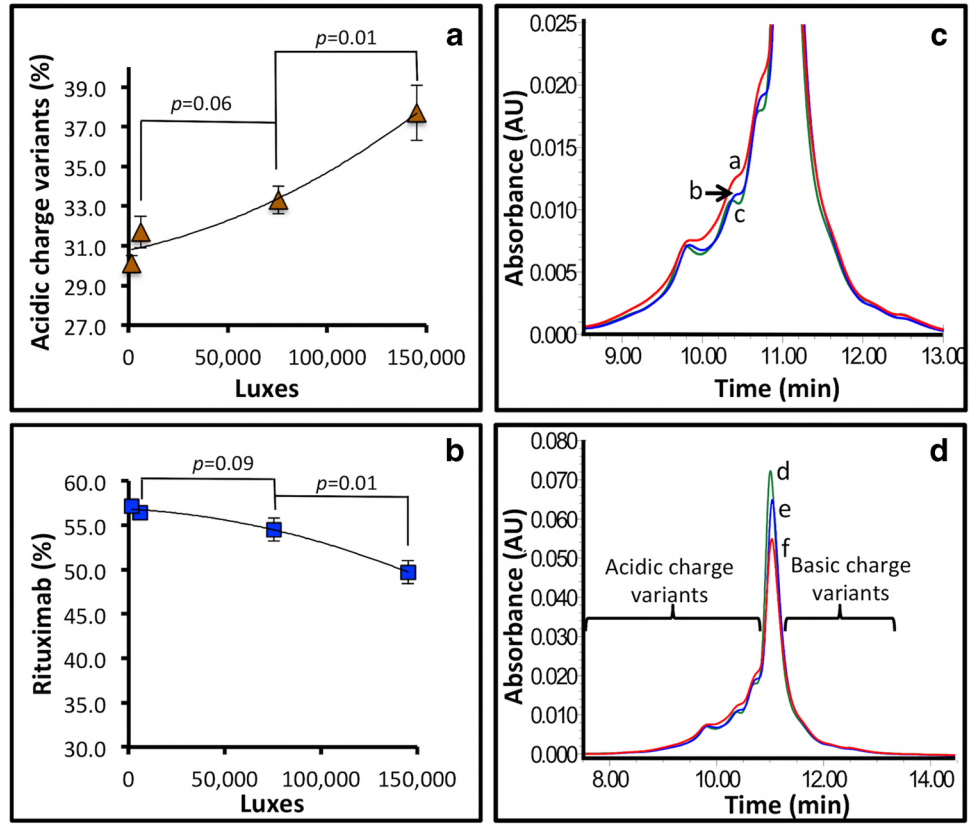


Fig. 4 Analyses of SunR2h, SunR1h, and DiffR2h samples. CEX-UHPLC-FLR analyses of **A** acidic charge variants; **B** basic charge variants; **C** the principal peak of Rituximab; **D** (a) and **E** (f) SunR2h sample $\approx 150,000$ luxes; **D** (b) and **E** (e) SunR1h sample $\approx 75,000$ luxes; **D** (c) and **E** (d) < 6000 -lux samples; $n = 3$. Error bars are in SD. Some error bars are smaller than the size of markers. p values are depicted when differences between groups are not clear. p values of graphs are calculated for DiffR2h-SunR1h groups, and DiffR2h-SunR2h groups

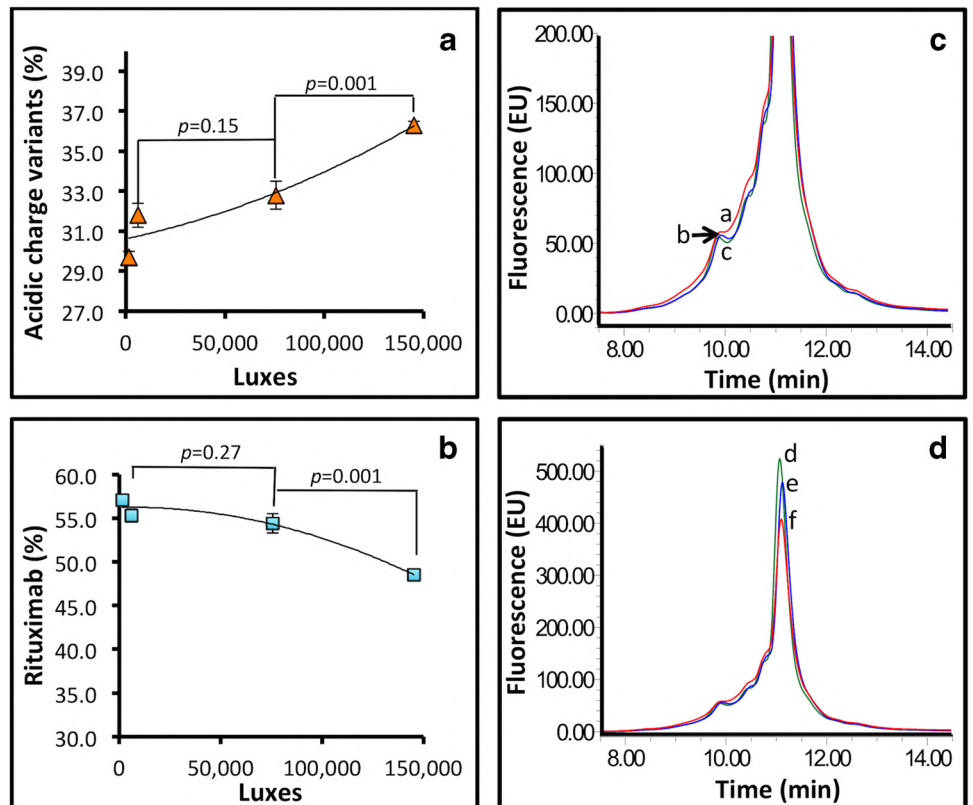
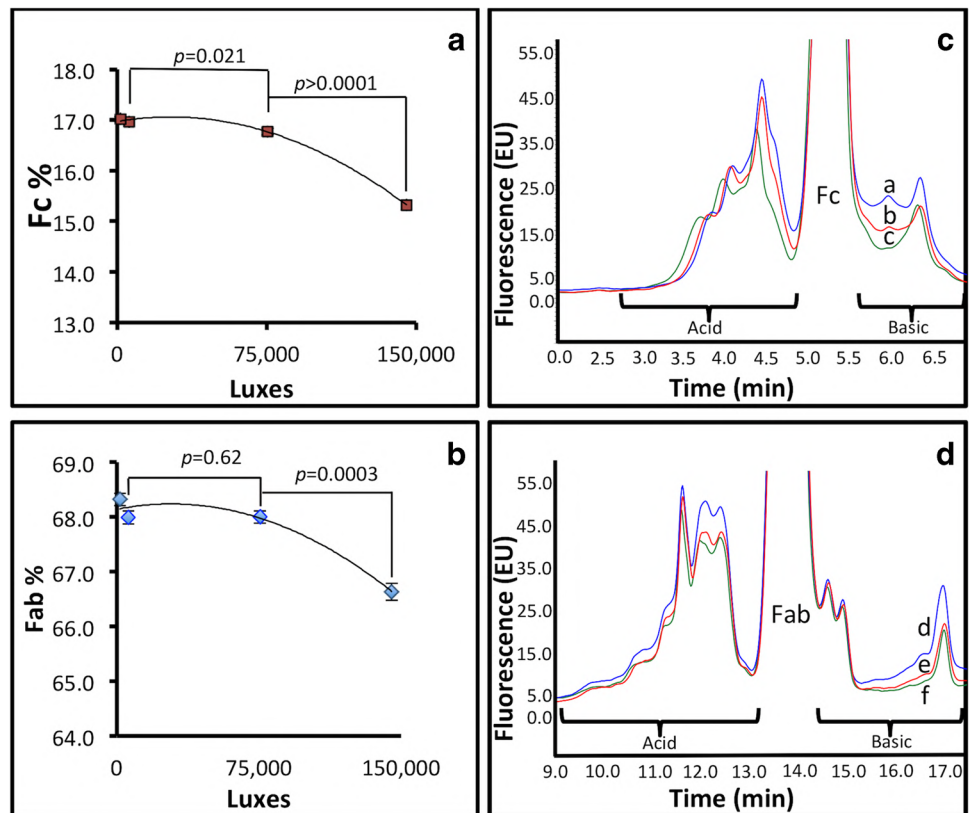


Fig. 5 Analyses of SunR2h, SunR1h, and DiffR2h samples by CEX-PAP-UHPLC-FLR analyses. area percentage decrease of mAb Fc and Fab fragments, while acidic and basic charge variants increase for each domain. **A** Fc; **B** Fab; **C** (a) and **D** (d) SunR2h sample $\approx 150,000$ luxes; **C** (b) and **D** (e) SunR1h sample $\approx 75,000$ luxes; **C** (c) and **D** (f) < 6000 luxes samples; $n = 3$; error bars are in SD. Some error bars are smaller than the size of markers. p values of graphs are calculated for DiffR2h-SunR1h, and SunR2h-DiffR2h groups



acids cannot be reached when the photon flux is low, even though the dose is the same. In this case, the triplet state of chromophore residues cannot be reached, inhibiting a reaction with diatomic oxygen with the following formation of the reactive singlet oxygen 1O_2 [24.].

Therefore, it seems that both results are valid. Controversy on ICH 1B conditions was explored before [9. , 25.] finding potential errors, some like exposition time, spectral intensity, and spectral profile, which are not established in the regulation. Probable differences between other photodegradation studies remain elusive, as some researchers expose directly proteins to UVB radiation (280–320 nm) and UVC radiation (200–280 nm), conditions to which biologics are not on a daily basis exposed, unless accidentally. Therefore, exposition to expected conditions related to the geographical location in which drug products will be stored and used must be explored.

Rituximab Photodegradation Under Real Photo Exposition Conditions Changed Its Properties

Indeed, the next step was to investigate if local radiation conditions can affect significantly the properties of this mAb (Table I). Also, determining a connection between different radiation amounts and Rituximab degradation can be useful

for its characterization and determine its susceptibility to photodegradation.

Some articles about photodegradation set exposition radiation conditions to 8000 luxes/h for 30 h, or 78 h [26.]; these conditions, although correct as referred to in ICH 1B, cannot fit our purposes, as the light of our fluorescent lamps in our manufacturing facilities illuminates at a rate between 650 to 1000 luxes. These conditions fit with the experimental design of other researchers in which ambient light conditions were set to 300–750 lux, laminar flow hood with 3000 luxes [7.], or room light at 500 to 1000 luxes as described in the work of Du and collaborators [8.]. Moreover, the biologics are usually protected from light and under refrigeration in an obscure cold chamber during manufacturing time-out. It is relevant to point out that our radiation experiments reach about ≈ 3600 luxes by diffuse irradiation at peak hours in the day.

Therefore, we wanted to explore conditions, which can be out of our control (e.g., in a hospital throughout window), in which unexpected radiation conditions can take place, moving forward, prevent those scenarios and analyze those risks.

However, solar irradiation is not the same depending on latitude, altitude, the hour of the day, and season. Also, climatic conditions like water vapor, cloudiness, and suspended particles can affect the amount of radiation incident over a drug product.

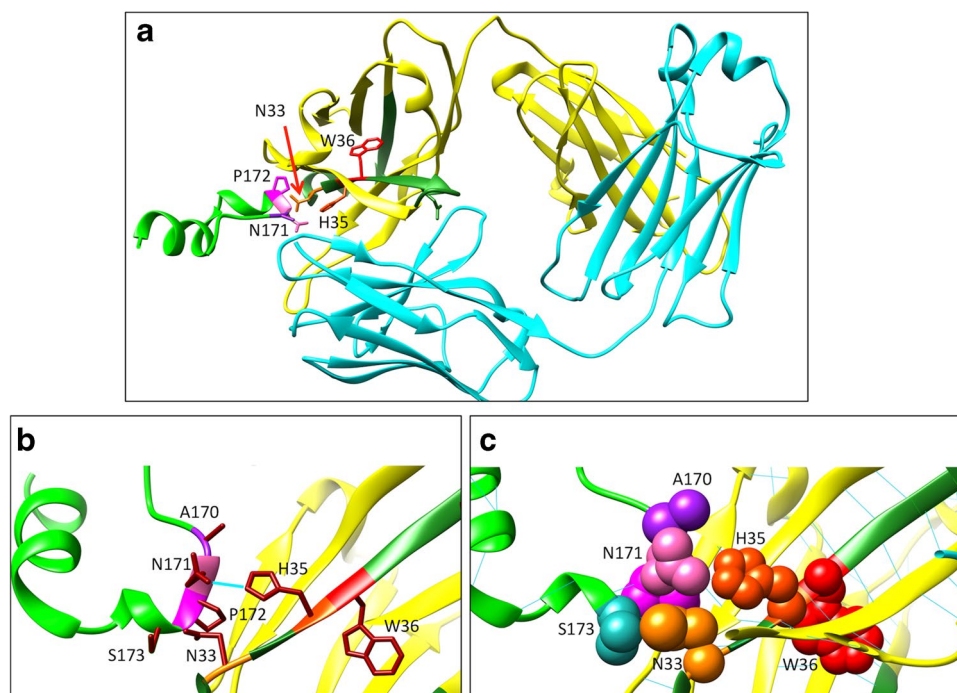


Fig. 6 Cartoon of Rituximab Fab interacting with CD20 lymphocyte B antigen. The heavy chain of Rituximab is depicted in yellow, while the light chain in cyan, CD20 antigen is light green. **A** Cartoon of Rituximab Fab fragment showing the Ag-Ab interaction site. **B** Zoom of the Ag-Ab interaction site where H35 interacts with N171 by a hydrogen bond (depicted in cyan). **C** Residues related to Ag-Ab interaction represented by atom spheres. Ab residues = W36 is depicted in red, H35 in tangerine, and N33 in orange, Ag residues = A170 in purple, N171 in French pink, P172 in magenta, and S173

in cyan. Figures were designed in Chimera USFC version 10.1 [45.], using the PDB structure 2OSL (Protein Data Bank) [46.]. Cartoons show the position of potential interaction residues. Oxidated W36 can modify H35 interaction with N171 by disrupting the structural conformation of the interaction pocket and surrounding residues. Also, deamidated N33 (now D33) can repulse S173 that is immediate at its side, inhibiting interaction. It is possible that these post-translational modifications are relevant for the weakening of the interaction between both molecules

Therefore, we selected the worst conditions related to our geographical location, during winter when radiation can enter better to a building (due to the solar zenith angle), on a clear day, close to noon, and in a city without dust and low human pollution. These conditions are detailed in “[Materials and Methods](#)”.

Physicochemical Analyses

Table III shows the effect over Rituximab samples with ID65 illuminance exposition. We can see slight differences in the *Rh* and mass of the samples, but the main differences are in the presence of aggregates.

Zeta potential can quantify charge changes in samples, for example, histidine (positive charged) can be photooxidated to aspartate (negative charged) [27.], leading to a change in its zeta potential o electrophoretic profile and therefore affecting its stability due to change of electrostatic conditions *in situ*. Interestingly, any change was detected, probably due to the sensitivity of the method and/or polysorbate effect over samples, which can mask small changes in the mAb.

DSF experiments quantify the T_m of proteins indicating potential destabilized charge variants related to stress conditions to which drug products have been exposed. Therefore, T_m is a constant that correlates with the degree of stabilization of drug products. In which higher T_m means a more stable product. DSF could only detect differences between SunR 2h and SunR 1h samples (Fig. 2C).

The main targets of UV radiation and blue light are tryptophan, tyrosine, phenylalanine, histidine, cysteine, and cistine [8. , 28. , 29.]. Photodegradation of these amino acids can produce varied degradation species (e.g., 2-oxo-histidine, cross-linked adducts, N-formylkynurenine, kynurenine, 3 α -hydroxypyrrroloindoles, dityrosines, orto-tyrosine, meta-tyrosine, aspartate, methionine sulfoxide [5.], and tryptophan dimers [30.], changing its surface polarity, electric potential, and spectroscopic profile [31.].

Aggregated species detected by absorbance at 320 nm were only observed after 2 h under direct solar radiation (ID65). Covalent bonds can be formed between mAb molecules due to radiation and promoting aggregates formation, e.g., dityrosines, [32. , 33.] and Trp dimers [34.]. It is expected that the formation of aggregates can induce more aggregates.

Results of SEC-UHPLC-FLR of samples incubated after 3 months at 2–8°C, after radiation exposition, remain almost the same (data not shown). Some authors have explored this possibility before, with any aggregate induction [35.]. Some other researchers determined that after photodegradation, aggregates can function as nucleation sites [36.].

Concern about these structures relies on the fact that immune response is activated (after phagocytosis) by denatured, or protein aggregates [37., 38.]. It is still not clear if 2% of aggregates after 2 h of solar radiation can induce any immune response strong enough to neutralize mAb function, additionally, if multiple doses of this sample can increase this response. Research in this regard is a fruitful area under investigation.

As radiation can affect any amino acid of Rituximab in the inner core of the molecule, contrary to chemical oxidation, or deamidation, which is mainly surface degradation reactions, further mildly digestion of samples can elucidate a more detailed difference between photo-exposed samples than just CEX analyses. Papain (PAP) is an endoprotease that cleaves the hinge in mAbs between Fc and Fab domains [39.].

CEX-UHPLC-UV; FLR and PAP-FLR analyses also detected similar behavior to aggregation analyses, whereas direct solar radiation can increase acidic species and decrease principal peak only after 2 h of solar radiation demonstrated by differences beyond the standard deviation and small *p* values between SunR2h and SunR1h samples (Figs. 3, 4, and 5).

The rationale for detecting degradation by UV in comparison to FLR was to measure Trp degradation differentially. Trp has the higher extinction coefficient of all amino acids; therefore, radiation must affect predominantly this residue [40.].

The amount of Trp with respect to the other amino acids in the mAb is small, affecting to a lower degree the total percentage of charge variants.

CEX-UPLC results show that UV-FLR detection difference means that other aromatic amino acids besides Trp are affected by solar radiation (compare Figs. 3 and 4).

Photodegradation of amino acids in proteins must be stochastically located all over the molecule, as electromagnetic waves can pass throughout all the primary closure containers filled with the drug products and through the solutions and proteins.

Biological Analyses

CDC Activity of Rituximab Did Not Change After Photodegradation Using ICH Conditions but Solar Irradiation

Results in Fig. 1D show that only after 2 h of solar irradiation (equivalent to $\approx 150,000$ luxes/2h) filtered through a window (ID65) can affect the biological activity of Rituximab.

The other samples do not have an important decrease in CDC potency, where important means about $\pm 9\text{--}10\%$ [41.] from its original value. Protection of Rituximab with the secondary container, is efficient against the decrease in potency, as the CDC potency was above 90% (SecPR 2h samples) Fig. 1D. This value is considered a valid limit for validation of analytical methods [42.] and in-process control. Worth to mention, the formation of aggregates was inhibited in these samples (SecPR2h) (Fig. 1A), a critical attribute of safety in biologics.

CDC analytical result is comparable to the physico-chemical analyses, in which all the samples have critical differences after 2 h of radiation and moderately change after 1 h. Comparison with the other samples revealed any change.

It is clear that diffuse irradiation of about ≈ 6000 luxes (illuminance) throughout 2 h is safe for drug products (corresponding to 6–12 h under fluorescent light, e.g., in a manufacturing facility).

Mass Spectrometry Analyses

RP-UPLC-MS ESI analysis of photo stressed 2 h Rituximab sample (SunR 2h) showed that the peptide MSCK-ASGYTFTSYNMHWVKQTPGR (depicted in color forest green in Fig. 6) increased its mass by + 21 Da. Probably corresponding to one N deamidation (+ 1, N33, bolded) and the formation of a 3OH-Kynurenine (+ 19.99, W36, bolded) corresponds to a mass of 2801.2349 Da. This peptide increased its intensity threefold by comparing the irradiated sample against the control (30,645 versus 10,177) (Fig. S2). The W36, included in this peptide, is aside from the His35 (2OSL PDB | Chain B), which interacts directly with N171 of the CD20 antigen (Ag). This domain interacts with the CD20 of lymphocytes B, indicating a perturbation effect of this post-translational modification, partially disrupting the interaction and diminishing Rituximab CDC activity (Fig. 6). Also, deamidation of N33 (transformed to D33) in Rituximab HC induce repulsion between molecules were initially this negative charge was absent.

This result match with previous results by Pei (2008) in which a Trp in the CDR region of the light chain was oxidated, and biological activity was lost [43.]. Moreover, results by Wei (2007) showed that oxidation of Trp 105 in the heavy chain CDR of an antiviral mAb loses biological activity after radiative exposition. This Trp is the most solvent-exposed moiety in that molecule [44.]. In this work, oxidation of W(36) was the unique difference between un-irradiated control and SDL2h, and we assumed that diminished CDC activity was related only to the Fab-Ag interface disruption.

The location of this Trp, which is also on the surface, confirms additionally to other reports, that the dissolved oxygen is the main oxidation force over biologics nor the light itself in the photodegradation process. In addition, this Trp does not abolish the interaction with the Ag but diminishes this interaction. Differences in results within research groups point out differences in electromagnetic energy applied to samples with specific affected/degraded residues.

Conclusions

After photooxidation of Rituximab to ICH conditions, any significant physicochemical differences were detected exposed to 1.2 Mluxes for 10 days.

Results show that Rituximab can be exposed to solar radiation directly inside a building in its primary closure container for 1 h on its primary container, or 2 h on its secondary container without any significant change, under described conditions, and only after 2 h of solar irradiance, its main biological function, CDC, can be significantly affected, which indeed correlate to physicochemical analyses.

Results also reveal that diffuse solar irradiance is not deleterious for Rituximab efficacy at least, during short periods (≤ 2 h).

Also, these radiation doses can help to set up formulation studies under significant photodegradation conditions in which we know which CQAs are affected and the degree of degradation of Rituximab samples.

Glossary

Illumination	Exposition of a specific area to electromagnetic waves, which comprise 380 to 700 nm.
Irradiation	Exposition of an entity to electromagnetic waves, which comprises the wavelengths created by the sun.
Light	Electromagnetic waves, which comprehend the visible range (380–700 nm)
Photon	Particle-wave which carries the energy of radiation, the carrier of electromagnetic force.
Radiation	Electromagnetic waves comprehending any detectable range.
Critical quality attributes (CQA)	Physical, chemical, biological, or microbiological properties or characteristics that fit within an appropriate limit, range, or distribution to ensure the desired product quality.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1208/s12249-022-02412-8>.

Acknowledgements The authors thank Ana Karen Olmos López for her valuable contribution to the CDC experimental work.

Author Contribution VPMM and NOPR who are scientists of The National Research System (SNI) conceived the study; VPMM executed Abs at 320 nm, CEX, CEX-PAP-UPLC, DLS, DSF, peptide mapping, SEC-UHPLC, and zeta potential; LCJB executed the peptide identification by MS; AOL executed CDC studies; VPMM, MCR, CEEG, AM, and NOPR wrote the manuscript.

Funding This work was supported by the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT), Grant FINNOVA-CONACYT 174104.

Declarations

Conflict of Interest Víctor Pérez Medina Martínez, Carlos E. Espinosa-de la Garza, Laura Carmina Juárez-Bayardo, Miriam S. Cedillo Robles, and Néstor O. Pérez are all employees of Probiomed S.A. de C.V., which is developing, manufacturing, and marketing biosimilar products. Angélica Meneses declares no conflict of interest.

References

1. Sebastiani M, Anelli MG, Atzeni F, Bazzani C, Farina I, Fedele AL, Favalli EG, Fineschi I, Cino N, Dal Forno I, Gasparini S, Cassarà E, Giardina R, Bruschi E, Addimanda O, Cassone G, Lopriore S, Sarzi-Puttini P, Filippini M, *et al.* Efficacy and safety of rituximab with and without methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis patients: results from the GISEA register. *Jt Bone Spine.* 2014;81(6):508–12. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2014.06.011>.
2. ICH, Q1B. Stability testing: photostability testing of new drug substances and products. *Fed. Reg.* 62:27115-27122. Accessed April 16, 2021, at: <http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/>.
3. Miyahara Y, Shintani K, Hayashihara-Kakuhou K, *et al.* Effect of UVC irradiation on the oxidation of histidine in monoclonal antibodies. *Sci Rep.* 2020;10:6333. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63078-5>.
4. Ahmad I, Ahmed S, Anwar Z, Ali Sheraz M, Sikorski M. Photostability and photostabilization of drugs and drug products. *Int J Photoenergy.* 2016;2016:Art ID 8135608:1-19. <https://doi.org/10.1155/2016/8135608>.
5. Grassi L, Cabrele C. Susceptibility of protein therapeutics to spontaneous chemical modifications by oxidation, cyclization, and elimination reactions. *Amino Acids.* 2019;51(10-12):1409–31. <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02787-2>.
6. Bhatia SC. 2 - Solar radiations. In: Bhatia SC, editor. *Advanced renewable energy systems*: Woodhead Publishing India; 2014. p. 32–67, ISBN 9781782422693. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-269-3.50002-4>.
7. Sreedhara A, Yin J, Joyce M, Lau K, Weckler AT, Deperalta G, Yi L, John Wang Y, Kabakoff B, Kishore RS. Effect of ambient light on IgG1 monoclonal antibodies during drug product processing and development. *Eur J Pharm Biopharm.* 2016;100:38–46. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.12.003>.

8. Du C, Barnett G, Borwankar A, Lewandowski A, Singh N, Ghose S, Borys M, Li ZJ. Protection of therapeutic antibodies from visible light induced degradation: use safe light in manufacturing and storage. *Eur J Pharm Biopharm.* 2018;127:37–43. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.02.007>.
9. Baertschi SW, Alsante KM, Tønnesen HH. A critical assessment of the ICH guideline on photostability testing of new drug substances and products (Q1B): recommendation for revision. *J Pharm Sci.* 2010;99(7):2934–40. <https://doi.org/10.1002/jps.22076>.
10. Pérez Medina MV, Tierrablanca-Sánchez L, Espinosa-de la Garza CE, Juárez-Bayardo LC, Piña-Lara N, Gonzalez Santoyo G, Pérez NO. Functional analysis of glycosylation in Etanercept: effects over potency and stability. *Eur J Pharm Sci.* 2020;153:105467. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105467>.
11. Garcia-Lopez AC, Snider AD, Garcia-Rubio LH. Rayleigh-Debye-Gans as a model for continuous monitoring of biological particles: part I, assessment of theoretical limits and approximations. *Opt Express.* 2006;14(19):8849–65. <https://doi.org/10.1364/oe.14.008849>.
12. Zhao Y, Ma L. Applicable range of the Rayleigh-Debye-Gans theory for calculating the scattering matrix of soot aggregates. *Appl Opt.* 2009;48:591–7. <https://doi.org/10.1364/AO.48.000591>.
13. Wang Y, Li X, Liu YH, Richardson D, Li H, Shameem M, Yang X. Simultaneous monitoring of oxidation, deamidation, isomerization, and glycosylation of monoclonal antibodies by liquid chromatography-mass spectrometry method with ultrafast tryptic digestion. *MAbs.* 2016;8(8):1477–86. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1226715>.
14. Levin AD, Alenichev MK, Masalov VM, *et al.* Developing of standard reference materials of the electrokinetic (zeta) potential of nanoparticles. *Nanotechnol Russ.* 2018;13:90–5. <https://doi.org/10.1134/S1995078018010068>.
15. Koch Tyree J. Aggregation propensity: characterization of monoclonal antibody stability. Master's thesis, Harvard Extension School; 2015.
16. Farrell A, Schefer K, Cook K, Samonig M, Muñoz D, Schwahn A, Bones J. Thermofisher Scientific BioPharma Applications Compendium. Characterisation and Comparability Laboratory, NIBRT, Dublin, (1)1-337; 2017.
17. Sharma B. Immunogenicity of therapeutic proteins. Part 3: impact of manufacturing changes. *Biotechnol Adv.* 2007;25(3):325–31. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.01.007>.
18. Singh SK. Impact of product-related factors on immunogenicity of biotherapeutics. *J Pharm Sci.* 2011;100(2):354–87. <https://doi.org/10.1002/jps.22276>.
19. Di Gaetano N, Cittera E, Nota R, Vecchi A, Grieco V, Scanziani E, Botto M, Inrona M, Golay J. Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J Immunol.* 2003;171:1581–7.
20. Golay J, Cittera E, Di Gaetano N, Manganini M, Mosca M, Nebuloni M, van Rooijen N, Vago L, Inrona M. The role of complement in the therapeutic activity of rituximab in a murine B lymphoma model homing in lymph nodes. *Haematologica.* 2006;91:176–83.
21. Blessy M, Patel RD, Prajapati PN, Agrawal YK. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—a review. *J Pharm Anal.* 2014;4(3):159–65. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2013.09.003>.
22. Bosshard HR, Marti DN, Jelesarov I. Protein stabilization by salt bridges: concepts, experimental approaches and clarification of some misunderstandings. *J Mol Recognit.* 2004;17(1):1–16. <https://doi.org/10.1002/jmr.657>.
23. Zielnik A. Photostability testing. Shedding light into a not well understood guideline. *Int Pharm Ind.* 2013;5(2):50–6.
24. Davies MJ. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;305(3):761–70. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00817-9](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00817-9).
25. Tsentelovich YP, Snytnikova OA, Forbes MDE, Chernyak EI, Morozov SV. Photochemical and thermal reactivity of kynurenine. *Exp Eye Res.* 2006;83(6):1439–45. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2006.07.022>.
26. Qi P, Volkin DB, Zhao H, Nedved ML, Hughes R, Bass R, Yi SC, Panek ME, Wang D, DalMonte P, Bond MD. Characterization of the photodegradation of a human IgG1 monoclonal antibody formulated as a high-concentration liquid dosage form. *J Pharm Sci.* 2009;98:3117–30. <https://doi.org/10.1002/jps.21617>.
27. Tomita M, Irie M, Ukita T. Sensitized photooxidation of histidine and its derivatives. Products and mechanism of the reaction. *Biochemistry.* 1969;8(12):5149–60. <https://doi.org/10.1021/bi00840a069>.
28. Davies MJ, Truscott RJW. Photo-oxidation of proteins and its consequences, Chapter 12 2001. In: Sun protection in man.
29. Pattison DI, *et al.* Photo-oxidation of proteins. *Photochem Photobiol Sci.* 2012;11(1):38–53. <https://doi.org/10.1039/c1pp05164d>.
30. Sormacheva ED, *et al.* Dimerization and oxidation of tryptophan in UV-a photolysis sensitized by kynurenic acid. *Free Radic Biol Med.* 2017;113:372–84. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.007>.
31. Li Y, Polozova A, Gruia F, Feng J. Characterization of the degradation products of a color-changed monoclonal antibody: tryptophan-derived chromophores. *Anal Chem.* 2014;86(14):6850–7. <https://doi.org/10.1021/ac404218t>.
32. Malencik DA, Anderson SR. Dityrosine formation in calmodulin. *Biochemistry.* 1987;26(3):695–704. <https://doi.org/10.1021/bi00377a006>.
33. Guptasarma P, Balasubramanian D. Dityrosine formation in the proteins of the eye lens. *Curr Eye Res.* 1992;11(11):1121–5. <https://doi.org/10.3109/02713689209015084>.
34. Fukunaga Y, Katsuragi Y, Izumi T, Sakiyama F. Fluorescence characteristics of kynurenine and N'-formylkynurenine. Their use as reporters of the environment of tryptophan 62 in hen egg-white lysozyme. *J Biochem.* 1982;92(1):129–41. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133909>.
35. Kiese S, Pappenberger A, Friess W, Mahler HC. Equilibrium studies of protein aggregates and homogeneous nucleation in protein formulation. *J Pharm Sci.* 2010;99(2):632–44. <https://doi.org/10.1002/jps.21858>.
36. Buell AK. Chapter five - the nucleation of protein aggregates - from crystals to amyloid fibrils. In: Sandal M, editor. *International review of cell and molecular biology*, vol. 329. Academic Press; 2017. p. 187–226. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.08.014>.
37. Rosenberg AS. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *AAPS J.* 2006;8(3):E501–7. <https://doi.org/10.1208/aapsj080359>.
38. Fishman M. Antibody formation in vitro. *J Exp Med.* 1961;114(6):837–56. <https://doi.org/10.1084/jem.114.6.837>.
39. Porter RR. The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem J.* 1959;73:119–26. <https://doi.org/10.1042/bj0730119>.
40. Mach H, Middaugh CR, Lewis RV. Statistical determination of the average values of the extinction coefficients of tryptophan and tyrosine in native proteins. *Anal Biochem.* 1992;200(1):74–80. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90279-g](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90279-g).
41. Montacir O, Montacir H, Eravci M, Springer A, Hinderlich S, Saadati A, Parr MK. Comparability study of rituximab originator and follow-on biopharmaceutical. *J Pharm Biomed Anal.* 2017;140:239–51. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.03.029>.
42. Jenke DR. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. I. General concepts and guidelines. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 1996;19(5):719–36. <https://doi.org/10.1080/10826079608005533>.

43. Pei Q, Volkin DB, Zhao H, Nedved ML, Hughes R, Bass R, Yi SC, Panek ME, Wang D, Dalmonte P, Bond MD. Characterization of the photodegradation of a human IgG1 monoclonal antibody formulated as a high-concentration liquid dosage form. *J Pharm Sci.* 2009;98(9):3117–30. <https://doi.org/10.1002/jps.21617>.
44. Wei Z, *et al.* Identification of a single tryptophan residue as critical for binding activity in a humanized monoclonal antibody against respiratory syncytical virus. *Anal Chem.* 2007;79:2797–805.
45. UCSF Chimera a visualization system for exploratory research and analysis. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. *J Comput Chem.* 2004;25(13):1605–12.
46. Du J, Wang H, Zhong C, Peng B, Zhang M, Li B, Huo S, Guo Y, Ding J. Structural basis for recognition of CD20 by therapeutic antibody Rituximab. *J Biol Chem.* 2007 May 18;282(20):15073–80. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701654200>.

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

Springer Nature or its licensor holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Miriam Silvia Cedillo Robles

Título de la tesis: “Caracterización de la degradación de Rituximab por efecto de la luz”

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Jesús Rivera Islas

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

- Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Jesús Rivera Islas

Firma del miembro del jurado

3 de noviembre de 2022

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JESUS RIVERA ISLAS | Fecha:2022-11-03 17:53:48 | Firmante

gKganFHPYwDEXg2fVoxknz3m3mxl64wGdDnk45xL1qUwn4QES2WkEB9XIA6lj5YfoTwcBZhZnBMze0J+LsekSx3qj5VZGsk3QDk1DIBVtGOrUmr86g+0Jx5UmNAviqPsm/TigWt
xuYnH2dlWTVJH/+OeRUMwSZ4WiiPyYp8+Lgiayg4j5wKbEaBlcJtGdbBV7O6Wtly96yN/XoWxtRKtV6OX968a8EJCxeVMXpofM2ul35k6DPhL4HDoiwC0rbV1sOymb5jWR1Vmov
LDs2TqdbD49A+Ulg6yDon9rZbZITsU6OoXxnAKahcWICZFgJX+3Qq/lcm+HWrGMnL5OygA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[g7T0XCNJi](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/w9yGnZ0dB9bHN0h8nw6zAUjsUox5vnRT>





**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Miriam Silvia Cedillo Robles

Título de la tesis: “Caracterización de la degradación de Rituximab por efecto de la luz”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Erick Ayala Calvillo

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

4/noviembre/2022

Firma del miembro del jurado

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ERICK AYALA CALVILLO | Fecha:2022-11-04 21:37:44 | Firmante

uG19464Ak3a68jrc4d4Xhohn3elkSYrEnfx+TmwN/vUorfL/kVmtja+TSIj9/zNcPqgZmpcC5GP3zKICJZz3Btx32r3YN9+9Kd9B9FRC1N5i0Q4ep6pE5ySQxT96iPORbSOXX53D/7d6A
mxC2XWvvQxxzy87luxA/eWYGeu83ulLxYVKEkOlyL4jibGHs54IqAiBtXrXB3O4WZDWTsM0LVXch/CISF/M7+qalma7D844knNKUnjtPW2+WwlesIDvVE/5cqPTOx6cmIISGulhUq2
3IMTr2oMKvBU9QwZGFsqOetri8/nBT7C2yyBeWvahPSh5lwVXqSxBCM3tS7T1NA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[JcLodOZIQ](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/8Cjy3XvjtYk8P4gcEPCpCKrsv5xuMYUL>





**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Miriam Silvia Cedillo Robles

Título de la tesis: “Caracterización de la degradación de Rituximab por efecto de la luz”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: M. en C. Lilitiana Joachín Rodríguez

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

M en C. Lilitiana Joachín Rodríguez

Firma del miembro del jurado

04/11/2022

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

LILIANA JOACHÍN RODRÍGUEZ | Fecha:2022-11-04 13:43:13 | Firmante

LzMSV3NgAqrpD9VuLDp3B/o6886wf1Yq7i8Zi85/Ckxi+KdDMRDBWRxTpiRmNLIqLVJVQDQs+zF0xbEphgnGJsuqpJQVgDCiSP5kk1CmgaSMiho81Dpx51YvHV5tz0Q9xSkraJYxwS6umvuu6ZqTjSLCxibsl3hiNdCVydG/WIntS6i5+WMXC2eHOqv55uG5EbDBq4gfo3crme+N6mSfTG9ytvvsY6ZF84xfgGp6weu/HDCQzGXneRpJ32aT21dK/QqHmVa6Oskj84xnHUh1Im7Dx480Apt5/9djsqxr2mu6dqYNrCsf+DVO9rDsbzGZWGQ1bszQJEY156zu9ZmpVw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[2SJ8qdofh](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/T8wBvdW5sTP6nvMQkZaf0tmawfo9HP5>





**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Miriam Silvia Cedillo Robles

Título de la tesis: “Caracterización de la degradación de Rituximab por efecto de la luz”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Sergio Alcalá Alcalá

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

e-firma UAEM

Firma del miembro del jurado

07-11-2022

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha:2022-11-07 14:09:23 | Firmante

EdMw2jhQFWDIn+0R4rrde329TvTRKwqdZQ4jRKvwkjO6AFq6fSqHm8DK8Kb2EtHBf+zSdcTYMqIpoKEDbBXjF0jNfyqVKkinP4xIBo3NwLhTf9mijnwIBoNoFRIAT8vUphdS9zDCIY aL43xf+8ccP7uug0HHvzwLLycD4Cd3wluRpT7+oUt/+b5MjBxAAAp6Un77s0jIYhLEvdZLxG97QGskv6+errRzNhUlrU0IzsNE3wJjrAA+/yaVt47L1cvloarHKEAp0AdwwfmBm7h6W q+/7ioLDzfo4bBX3u1BWY/13uZRTibOTqIUobxpK7nfmOlfWC9kOAe8fAXIpvzJQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[4QVpfUgew](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/JKM16wqbS4Wea0t7bhtMw0ZlgarPbepH>



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Miriam Silvia Cedillo Robles

Título de la tesis: “Caracterización de la degradación de Rituximab por efecto de la luz”

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Néstor Octavio Pérez Ramírez

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

Dr. Néstor Octavio Pérez Ramírez

Firma del miembro del jurado

04/11/2022

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

NÉSTOR OCTAVIO PÉREZ RAMÍREZ | Fecha:2022-11-04 14:36:16 | Firmante

LGtbbJW654J7Z8pxBFJVEyu/GzOEXla+0aTbqhEhMrDiEjIvH8izoZLIVj2w0guy3RXAAeQhP7zXjmB4UY5vTNDZslitSDyPz5CNhgVNQf9p6b1MJze4Oh5ypfLVC9yCU0RN/uNVG2DttPhtSeNwqO16EGSq6AVWO7W6LqW2a4M/P1pXp8lxkn2QZudxClkxPY9RhhohNOyYBnLiVAGEYpiP50gWnY740SliUMr1821269NkrBwikVaMai2vvHKL7VPtwsYv9PenXclV5m80AD7vqqt7BflyCuOVKR7LEhZ0xQ2zWOLw0ooiNB0u+MOGmlCu0VKJJ7yW7Wylh6vJw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[pnmzi7rHf](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/BKZm98k8zYz4uVMcKMIQIZLxGeJZz22d>

