

Modelo matemático para predecir la formación de agregados en el proceso de purificación de un anticuerpo monoclonal

Osvaldo Mora-Montes de Oca^{1,2*} ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7354-8427>

Lourdes Zumalacárregui-de Cárdenas^{2**} ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6921-737X>

Ivis Regalado-Fonseca¹ ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7989-8225>

Lourdes Hernández-de la Rosa¹ ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4041-0445>

¹ Centro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba

² Universidad Tecnológica de La Habana “José Antonio Echeverría”, Cuba.

email: lourdes@quimica.cujae.edu.cu

El uso de anticuerpos monoclonales en la lucha contra el cáncer se convierte cada día más en la terapia de elección. Para la introducción de anticuerpos monoclonales en mercados internacionales de alta demanda y con elevados requerimientos de calidad se requiere su producción a gran escala. El incremento de la presencia de dímeros en el producto final afecta su calidad y, por tanto, la eficiencia y eficacia del proceso. El objetivo del presente trabajo fue obtener un modelo matemático que permita relacionar el porcentaje de dímeros con las variables de operación de mayor influencia. Se realizó el ajuste de un modelo de regresión lineal múltiple usando el programa Statgraphics Centurion XVII versión 17.2.00. El modelo se validó con lotes de producción, logrando errores relativos inferiores al 20%. Las variables significativas obtenidas fueron: masa de IgG en el sobrenadante; masa de IgG en el producto de salida del paso de captura de proteína A; pH en el producto de salida del paso de captura de proteína A; pH del producto ajustado y conductividad de salida en la membrana de intercambio aniónico. El modelo permitió encontrar un intervalo de trabajo de las variables de mayor influencia en la formación de dímeros para reducirlos hasta valores inferiores al 3%.

Palabras clave: anticuerpos monoclonales; purificación; análisis de datos; modelo matemático.

Introducción

El cáncer constituye una de las principales causas de muerte en Cuba y en el resto del mundo. Dicha enfermedad recibe especial atención por el Sistema de Salud Pública Cubano debido a que es la segunda causa de muerte en Cuba.⁽¹⁾ El empleo de los anticuerpos monoclonales (AcM) en la lucha contra el cáncer se convierte en la terapia de preferencia.

Nimotuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que se produce en el Centro de Inmunología Molecular. Se obtiene por tecnología de ADN recombinante y se produce en líneas de células de mamíferos. El fármaco reconoce el dominio externo del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y su unión bloquea la interacción de los dos principales ligandos del EGFR: el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento transformante alfa impidiendo el crecimiento de células tumorales de origen epitelial.^(2,3)

Nimotuzumab se usa en la inmunoterapia pasiva contra el cáncer, habiéndose evaluado en pacientes con cáncer avanzado de cabeza y cuello, esófago, páncreas, pulmón, gliomas de alto grado de malignidad y cáncer cervicouterino.⁽⁴⁾ Estudios demuestran que su efecto antitumoral se potencia cuando se combina con radioterapia y quimioterapia, se prolonga la supervivencia y mejora la calidad de vida de los pacientes tanto adultos como niños.⁽⁴⁾

La producción de AcM en general, y de Nimotuzumab en particular, consta de dos etapas fundamentales: el cultivo de células y la purificación. El diseño de los procesos de purificación depende principalmente de las características del crudo de fermentación y de la calidad requerida del producto final. En general, se establece una estrategia de purificación que incluye tres etapas: captura, purificación intermedia y purificación final o pulido. El objetivo de la etapa de captura es aislar, concentrar y estabilizar el producto de interés. En la fase

* Ingeniero Químico, Tecnólogo de II nivel.

** Doctor en Ciencias Técnicas, Profesor Titular.

de purificación intermedia se eliminan otras proteínas contaminantes. Finalmente, en la fase de purificación final o pulido se remueven trazas remanentes de impurezas y el producto alcanza la calidad final.⁽⁵⁾

Durante el desarrollo de fármacos proteicos comúnmente ocurre el fenómeno de agregación. Los agregados pueden existir inicialmente como pequeños dímeros o fragmentos y progresar hacia estructuras más grandes, como partículas sub-visibles o visibles, si dicha transición es termodinámicamente favorable; o sea, que tenga una variación de energía libre de Gibbs, a temperatura y presión constante, menor que cero.⁽⁶⁾

Las proteínas naturalmente tienen regiones hidrófobas, tanto en el exterior como en el interior de sus estructuras, pero cuando estas se despliegan y luego se repliegan incorrectamente, sus estructuras cambian, exponiendo muchos de los “parches” hidrófobos que antes no lo estaban. Estos parches se atraen entre sí, lo que hace que las proteínas mal formadas se agrupen. A veces, la agregación se produce cuando las proteínas permanecen intactas, pero se altera el equilibrio de toda la disolución, lo que provoca una cascada de eventos que desencadenan la agregación de las moléculas de proteína.⁽⁷⁾

Se ha descubierto que casi la mitad de los AcM farmacéuticamente relevantes y los dominios de fusión Fc de dichas proteínas presentan problemas de agregación, luego de la purificación en proteína A.⁽⁶⁾ La inestabilidad de las moléculas de proteínas se manifiesta, a menudo, por la formación de agregados durante el procesamiento y almacenamiento. Los agregados de proteínas muestran una actividad biológica reducida o nula y, lo que es más importante, pueden mostrar una alta inmunogenicidad en la clínica. En consecuencia, es necesario controlar los niveles de agregados y las propiedades de los productos proteicos terapéuticos.⁽⁸⁾ Varios investigadores han obtenido modelos para predecir la agregación en función de la estructura aminoacídica del anticuerpo y otros estudian las partes de la estructura del anticuerpo que pueden modificar para reducir el fenómeno de la agregación.⁽⁹⁾

Los factores conocidos que pueden afectar significativamente la agregación de la proteína pueden clasificarse como internos o externos. Los factores internos se relacionan con cambios en la estructura primaria y secundaria de la proteína. Los externos, incluyen factores medio ambientales que pueden afectar la propensión de una proteína a agregarse; entre estos se incluyen pH, temperatura, concentración de sales, tipo

de tampón, concentración de proteínas, fuerza iónica, efecto de mezcla, cizallamiento, iones metálicos, presión, congelación-descongelación, liofilización y reconstitución.^(10,11)

En el flujo del proceso de purificación del AcM hr3, conocido como Nimotuzumab,⁽¹²⁾ hay varios factores que pueden causar la formación de agregados en las primeras etapas del proceso, entre ellos: la concentración de proteínas, el cambio de pH, la exposición del producto a condiciones de pH cerca del punto isoelectrónico, las condiciones del tampón, el tiempo de mezclado, el flujo de adición de la solución para el ajuste de pH y conductividad, el bombeo, el cizallamiento y el contacto con algunos materiales.

La aplicación de programas estadísticos permite realizar un análisis retrospectivo de los datos históricos de la producción y, de esta manera, obtener un modelo capaz de predecir la formación de estos agregados y así manipular las variables de mayor influencia en la formación de los mismos, con el fin de obtener valores bajos que satisfagan los estándares de calidad. La literatura describe como los límites de agregados se deben mantener en un intervalo entre 1 y 3% en el proceso de purificación, aunque para el producto final hasta un 5% es aceptable;⁽¹³⁾ por otro lado, los estudios de estabilidad realizados al Nimotuzumab demuestran que los valores de agregados aumentan al menos una unidad desde el inicio del estudio hasta el final de este, razón por la cual se hace más importante aún, el controlar los dímeros a valores tan bajos como sean posibles.

Materiales y Métodos

Procesamiento de los datos históricos

Durante todo proceso productivo del AcM Nimotuzumab se genera un gran volumen de información que, en dependencia del análisis que se realice, posibilita la toma de decisiones, tanto para que las variables de control del proceso no alcancen valores fuera de los límites de especificación, como para lograr altas eficiencias productivas y, con ello, altas ganancias generadas por la venta del producto. Se requiere de un enfoque multivariado de datos para evaluar la dependencia de las variables de salida con el cambio en las variables de entrada, en particular, cuando un proceso productivo es complejo. En un trabajo anterior, se aplicó al conjunto de datos integrado por 12 variables y 125 registros de cada una, el análisis de componentes principales (ACP)

utilizando el programa The Unscrambler versión 10.4. Esto permitió conocer, mediante la reducción de la dimensionalidad de los datos, cuáles eran las variables que aportaban mayor variabilidad al proceso. De igual forma, un análisis de expertos permitió seleccionar las variables que más influyen en la formación de dímeros.⁽¹⁴⁾

Metodología empleada para la obtención del modelo matemático

El conjunto de datos de cuatro años de producción del AcM, compuesto por 12 parámetros que se registran para el control de la calidad del proceso y 125 registros para cada uno, normalizados, centrados por el mínimo y escalados por el rango, se redujo a 121 registros luego del ACP.⁽¹⁴⁾

Los 12 parámetros que se registran (variables independientes para el ajuste del modelo de regresión) son: masa de IgG en el sobrenadante (mtsn), pH del tampón de elución (phglic), conductividad del tampón de elución (cdglic), masa de IgG en el producto de salida del paso de captura de proteína A (mepa), pH en el producto de salida del paso de captura de proteína A (phmpa), conductividad en el producto de salida del paso de captura de proteína A (cdmpa), pH del tampón de ajuste (phtphl), conductividad del tampón de ajuste (cdtphl), pH del producto ajustado (phpaj), conductividad del producto ajustado (cdpaj), pH de salida en la de intercambio aniónico (phpsq), conductividad de salida en la membrana de intercambio aniónico (cdpsq). La variable de respuesta es el porcentaje de dímeros (dim).

Se procedió a encontrar un modelo matemático que relacionara el porcentaje de dímeros con las variables de mayor influencia en el proceso. Para ello se utilizó la regresión lineal múltiple, pues esta herramienta alcanza resultados confiables cuando el número de variables es menor de 20, existen pocas correlaciones entre ellas y se tienen más muestras que predictores; tiene la restricción de que sólo puede modelar una variable respuesta a la vez,⁽¹⁵⁾ lo que se cumple en este caso, en que la variable respuesta es el porcentaje de dímeros. El software utilizado fue Statgraphics Centurion XVII versión 17.2.00.

Para la evaluación de las variables en el modelo se utilizó el criterio de la *t* de student y del valor de probabilidad (*p*) para una significación de 0,05. Se emplearon los indicadores coeficiente de determinación múltiple ajustado, error estándar de los estimados, error medio absoluto y se observó la distribución aleatoria de los residuos.

Para la validación del modelo se compararon los valores determinados en los 20 lotes producidos en el 2019, con los obtenidos con el modelo ajustado. Se aceptó un error relativo de validación de un 20%, tomando en cuenta la variabilidad normal en un proceso industrial.

Una vez validado el modelo, se transformó el fichero de datos en un fichero de diseño de experimentos que permitiera aplicar la función de optimización del modelo de regresión lineal múltiple, creando una superficie de respuesta con la que se pudiera proponer un intervalo de operación. Se emplearon los indicadores coeficiente de determinación múltiple ajustado, error medio absoluto y se observó la distribución aleatoria de los residuos.

Resultados y Discusión

Regresión lineal múltiple

En la obtención del modelo matemático que relacione las principales variables del proceso con la formación de dímeros se emplearon 121 muestras y 12 parámetros de calidad. El análisis de varianza reportó un valor de *p* de cero, siendo este menor que 0,05; lo cual significa que el modelo explica más variaciones de la variable de respuesta de lo que podría esperarse de fenómenos aleatorios⁽¹⁵⁾ y que existe una relación estadísticamente significativa entre las variables para un 95% de confianza. Se eliminaron las variables con un valor de *p* mayor que 0,05, por no ser estadísticamente significativos para un 95% de confianza. Dado lo cercano al valor *p* de 0,05 de las variables mtsn y phpaj se decidió mantenerlas en el modelo. En la Tabla 1, se muestran las variables con sus respectivos estimados y estadígrafos, así como el análisis de varianza del modelo.

Este modelo tiene: coeficiente de determinación múltiple ajustado = 86,42%; error estándar de los estimados = 0,1692; error medio absoluto = 0,1259, con una adecuada distribución de residuos.

Las variables más influyentes en la formación de dímeros resultaron ser: el pH del producto de salida en la columna de proteína A y del producto ajustado, la conductividad del producto de salida en la membrana de intercambio aniónico y la masa de IgG en el sobrenadante y en el producto de salida en la columna de proteína A.

En la Figura 1 se muestra el gráfico de los puntos residuales, donde se aprecia que existe una muestra, que corresponde a la 74, con alto valor residual. Durante el proceso de purificación no se reportaron anomalías con esta muestra por lo que no se eliminó, ya que podía contener información significativa para la investigación.

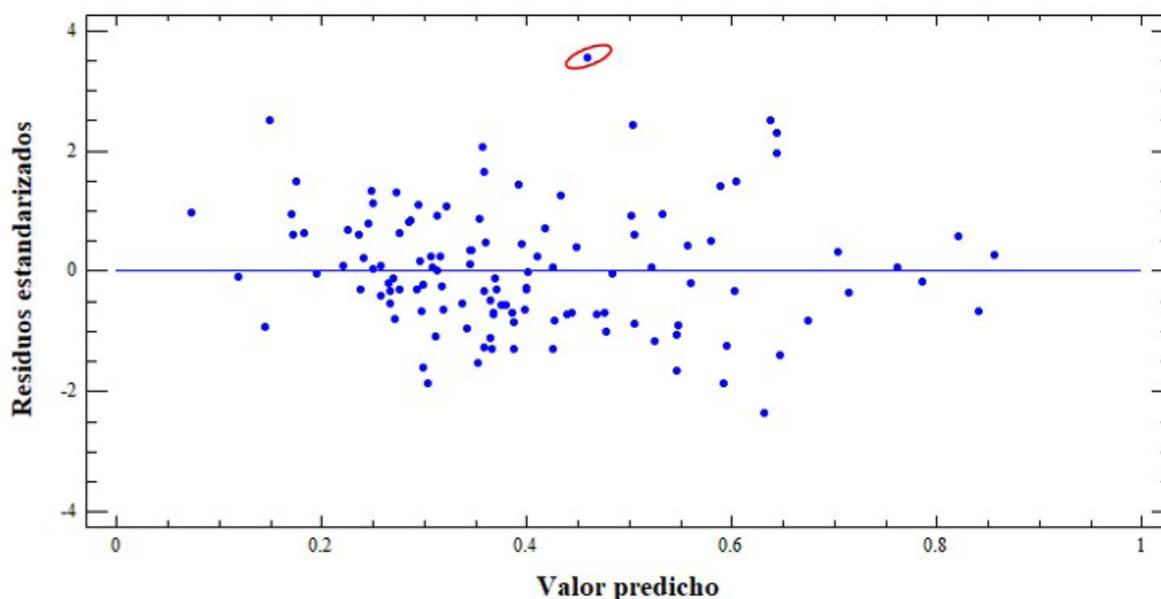
Tabla 1. Variables más influyentes en la formación de agregados.

Parámetro	Estimado	Error estándar	Estadígrafo t	Valor p
mtsn	-0,2476	0,1271	-1,9481	0,0540
mepa	0,3346	0,1424	2,3502	0,0206
phmpa	0,7280	0,1052	6,9226	0,0000
phpaj	-0,1737	0,0913	-1,9037	0,0596
cdpsq	0,4412	0,0843	5,2342	0,0000

Análisis de varianza

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón F	Valor p
Modelo	22,1816	12	1,8485	64,56	0,0000
Residuo	3,1209	109	0,0286		
Total	25,3025	121	1,8771		

mtsn: masa de IgG en el sobrenadante; mepa: masa de IgG en el producto de salida del paso de captura de proteína A; phmpa: pH en el producto de salida del paso de captura de proteína A; phpaj: pH del producto ajustado; cdpsq: conductividad de salida en la membrana de intercambio aniónico.

**Fig. 1.** Puntos residuales para 121 muestras.

En la ecuación 1 se muestra el modelo que relaciona el porcentaje de dímeros (dim) con las variables de mayor influencia del proceso.

$$\text{dim} = -0,2476 \text{ mtsn} + 0,3347 \text{ mepa} + 0,7280 \text{ phmpa} - 0,1737 \text{ phpaj} + 0,4412 \text{ cdpsq} \text{ (ecuación 1)}$$

Se aprecia que las variables: masa de IgG en el sobrenadante y pH del producto ajustado influyen de forma negativa sobre la formación de dímeros, lo que quiere decir que altos valores de ellas disminuyen

la presencia de los agregados. Este resultado entra en contradicción con el reportado por Zangh et al.⁽¹⁶⁾ quienes plantean que la acumulación de altas cantidades de proteína, durante la expresión, puede conducir a la agregación intracelular; lo anterior puede ser causado por las interacciones de las moléculas de proteína desplegadas o debido al reconocimiento ineficiente de la cadena peptídica naciente por los chaperones moleculares responsables del correcto plegamiento. Dichos autores se refieren a la acumulación de altas cantidades de proteína

durante la expresión que conllevaría a altos valores de masa de proteína en el reactor, pero en este trabajo, los altos valores de masa de IgG en el sobrenadante se logran almacenando más volumen de caldo de cultivo y no por mayores crecimientos en el fermentador.

Para el caso del pH del producto ajustado, esta operación se realiza con el objetivo de incrementar el pH del anticuerpo a valores cercanos a los del punto isoeléctrico de la proteína. Con ello se logra que el anticuerpo no se adsorba en la membrana de intercambio aniónico, que es el paso posterior. En la estructura del anticuerpo hay grupos cargados positivo y negativamente. Cuando el anticuerpo se encuentra cercano a su punto isoeléctrico, la distribución de cargas en la superficie puede formar dipolos favoreciendo las interacciones proteína-proteína conduciendo a la formación de agregados.⁽¹⁷⁾ Por lo tanto, los resultados que arroja el modelo corroboran lo descrito en la literatura.

Elevados valores de los parámetros: masa de IgG en el producto de salida en la columna de proteína A, pH del producto de salida en la columna de proteína A y conductividad del producto de salida de la membrana de intercambio aniónico favorecen la formación de los dímeros. Estos resultados se corresponden con los de la literatura consultada en la que se describe que la agregación requiere de colisiones bimoleculares a altas concentraciones de proteínas y que la relación entre la concentración de proteínas y la formación de agregados depende del tamaño de estos últimos, así como del mecanismo de asociación.⁽¹⁸⁾

Acerca de la influencia del pH del producto de salida en la columna de proteína A, Krishnamurthy y Manning⁽¹⁹⁾ concluyeron que a valores bajos de pH (3-3,7) las proteínas pueden enfrentar cambios estructurales que contribuyan a la agregación del producto, lo que se corresponde con lo encontrado en el modelo.

La conductividad del producto aumenta ligeramente desde el paso de ajuste de pH y conductividad hasta el paso de intercambio aniónico. Fesinmeyer et al.⁽²⁰⁾ observaron que hay una correlación entre el aumento de la fuerza iónica y el aumento de los agregados; los iones resultantes de la disolución de sales pueden tener un efecto perjudicial en la estabilidad de la proteína y promover la formación de agregados. De ahí que esta conclusión sea consistente con la aparición de la variable en el modelo.

La variable pH del producto de salida en la columna de proteína A se relaciona directamente con el pH del

tampón de elución. Estas son variables que pueden manipularse en el proceso y así mantener valores para los que el porcentaje de dímeros sea menor. Otros estudios muestran cómo con la adición de un aminoácido al tampón de elución se puede minimizar el efecto de la agregación por el bajo pH.⁽²¹⁾

El pH del producto ajustado varía con el volumen total del tampón de ajuste que se añade, por lo que se puede controlar y establecer el intervalo adecuado para obtener bajos valores de dímeros en el producto intermedio. En el proceso actual no está definido un flujo de adición de este tampón, pues se realiza de forma manual. Es imprescindible automatizar esta etapa y establecer un flujo lo más pequeño posible, con el fin de disminuir la formación de agregados.

La comparación entre las variables incluidas en el modelo y las que reportan los expertos como variables que influyen altamente en la formación de dímeros⁽¹⁴⁾ arroja que existe coincidencia para las variables: masas de IgG en el sobrenadante y del producto de salida de la columna de proteína A, pH del producto de salida en la columna de proteína A y pH del producto ajustado. La conductividad del producto de salida en la membrana de intercambio aniónico, que de acuerdo al análisis estadístico no puede ser eliminada del modelo, no es considerada influyente por los expertos en el anterior trabajo. Esto deberá estudiarse posteriormente para aclarar la diferencia.

Las masas de IgG en el sobrenadante y del producto de salida de la columna de proteína A y la conductividad del producto de salida en la membrana de intercambio aniónico, se reportan como variables que aportan gran variabilidad al proceso, según el ACP presentado por Regalado et al.;⁽¹⁴⁾ al analizar el resultado del modelo de regresión, se aprecia la importancia que tiene el control de dichos parámetros por cuanto tienen incidencia en la aparición de los dímeros.

Las conductividades del producto de salida de la columna de proteína A y del producto ajustado aportan gran variabilidad al proceso, pero no tienen alto peso en la formación de dímeros, según el modelo obtenido.

Obtención de las condiciones de trabajo en la primera etapa del proceso de purificación del AcM

Se calculó el error de predicción del porcentaje de dímeros para cada corrida, comparando el resultado del modelo obtenido según la ecuación 1, con el de la base de datos. El error relativo medio obtenido fue de 36,78%. Con el objetivo de disminuir este error se

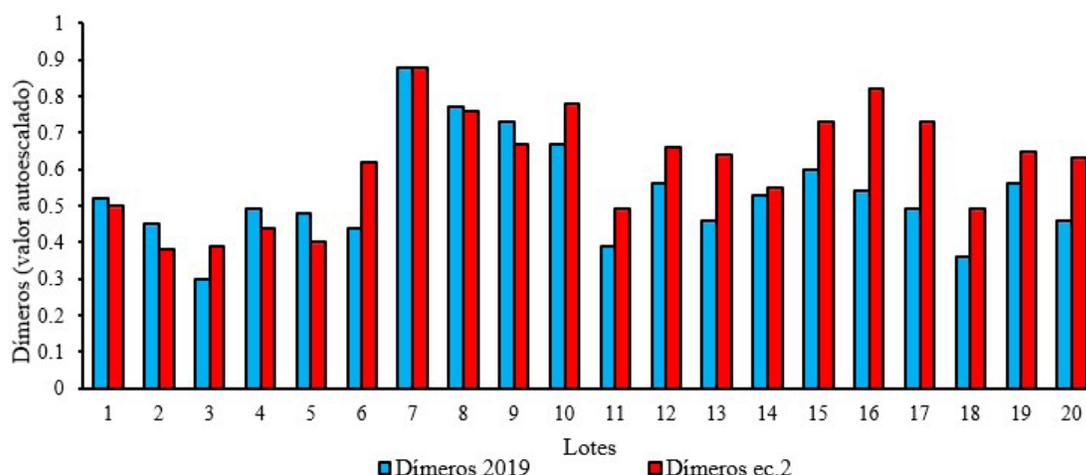


Fig. 2. Comparación entre el contenido de dímeros para los lotes de producción y según el modelo ajustado (ecuación 2).

eliminar las corridas que presentaron un error relativo superior al 40% y con esta base de datos reducida de 83 muestras se repitió el ajuste del modelo.

En este caso se obtuvo el modelo de regresión lineal que se presenta en la ecuación 2.

$dim = 0,0466 - 0,3644 \text{ mtsn} + 0,3219 \text{ mepa} + 0,7194 \text{ phmpa} - 0,2658 \text{ phpaj} + 0,4409 \text{ cdpsq}$ (ecuación 2)

El modelo presenta un coeficiente de determinación múltiple ajustado de 74,91%; un error estándar de estimación de 0,09 y el error medio absoluto es de 0,07. No existe correlación entre los residuos, pues el coeficiente de Durbin-Watson es de 1,29 ($p = 0,0002$),

al nivel de significación de 5,0%. El error relativo medio para el porcentaje de dímeros obtenido (al comparar con los valores de la base de datos) para el conjunto de 83 corridas es 18,48%.

Para la validación del modelo se emplearon los datos del proceso de purificación de los lotes producidos en el año 2019 (20 lotes). La comparación entre el resultado de los dímeros determinados en el proceso luego de aplicar el autoescalado y los calculados utilizando la ecuación 2 se muestran en la Figura 2. Se calculó el error relativo entre ellos para uno de los 20 lotes resultando un error relativo medio de 17,36%.

Tabla 2. Niveles de las variables optimizadas para diferentes porcentajes de dímeros.

% dímeros	mtsn	mepa	phmpa	phpaj	cdpsq
0,183	0,6810	0,3955	0,2041	0,3142	0,4398
0,210	0,6588	0,4016	0,2275	0,3130	0,4394
0,237	0,6401	0,4107	0,2505	0,3109	0,4397
0,265	0,6154	0,4299	0,2723	0,3132	0,4346
0,292	0,6036	0,4461	0,2969	0,3040	0,4286
0,319	0,5831	0,4608	0,3188	0,3024	0,4254
0,347	0,5611	0,4811	0,3419	0,3008	0,4173
0,374	0,5420	0,4873	0,3694	0,3003	0,4131
0,402	0,5209	0,4963	0,3927	0,2963	0,4121
0,429	0,5041	0,5027	0,4136	0,2891	0,4164
0,456	0,4739	0,5137	0,4272	0,2880	0,4218

mtsn: masa de IgG en el sobrenadante; mepa: masa de IgG en el producto de salida del paso de captura de proteína A; phmpa: pH en el producto de salida del paso de captura de proteína A; phpaj: pH del producto ajustado; cdpsq: conductividad de salida en la membrana de intercambio aniónico.

Tabla 3. Intervalo de trabajo recomendado.

Variable	Valor codificado	Valor en unidades originales	Valores actuales del proceso
Masa de IgG en el sobrenadante (g)	0,4739-0,6810	529,65-692,90	262,39-859,07
Masa de IgG del producto de salida en la columna de proteína A (g)	0,3955-0,5137	450,80-541,12	320,85-778,48
pH del producto de salida en la columna de proteína A	0,2041-0,4272	3,37-3,72	3,39-4,19
pH del producto ajustado	0,2880-0,3142	7,80-7,82	7,60-8,10
Conductividad del producto de salida de la membrana de intercambio aniónico (mS/cm)	0,4121-0,4398	2,13-2,22	1,29-8,04

Al contar con un modelo validado con un error inferior al 20% se procedió a la optimización del modelo de regresión lineal múltiple, creando una superficie de respuesta con la que se pudiera proponer un intervalo de operación. Se emplearon los indicadores coeficiente de determinación múltiple ajustado, error medio absoluto y coeficiente de Durbin-Watson, con el objetivo de evaluar la confiabilidad de los resultados obtenidos.

Como se desea que el porcentaje de dímeros sea inferior al 3% y la referencia actual internacional sugiere que este valor se encuentre entre 2-3%, se calculó el conjunto de valores de las cinco variables para alcanzar porcentajes de dímeros entre 0,183 y 0,456, valores de la variable codificada correspondientes al intervalo 2,0-3,0%. En la Tabla 2 se muestra la combinación de niveles de las variables para cada caso.

En la Tabla 3 se presenta el intervalo recomendado, en sus valores originales, para cada una de las variables más influyentes. El modelo obtenido permite identificar el intervalo en que se deberán operar las variables más influyentes, para garantizar la producción de un ingrediente farmacéutico activo con un bajo porcentaje de agregados.

Conclusiones

El modelo matemático obtenido para predecir la formación de dímeros en la primera parte del proceso de purificación del AcM, depende de las variables: pH del producto de salida en la columna de proteína A, del producto ajustado, masas de IgG en el sobrenadante y en el producto de salida de la columna de proteína A y conductividad del producto de salida en la membrana intercambio aniónico.

Se determinó el intervalo en que deberán encontrarse los valores de las variables pH del producto de salida en la columna de proteína A, del producto ajustado, masas

de IgG en el sobrenadante y en el eluato de proteína, y conductividad del producto de salida en la membrana de intercambio aniónico para lograr valores del porcentaje de dimerización entre 2 y 3%.

Conflicto de intereses

Los autores no declaran conflictos de intereses.

Roles de autoría

Oswaldo Mora-Montes de Oca, realizó la conceptualización de la investigación, el trabajo experimental, el análisis de datos y redactó el informe final.

Lourdes Zumalacárregui-de Cárdenas, realizó la conceptualización de la investigación y el análisis de datos, supervisó el desarrollo del trabajo y fue la responsable de la revisión del informe final.

Ivis Regalado-Fonseca, realizó el trabajo experimental y participó en el análisis de datos y participó en la revisión del informe final.

Lourdes Hernández-de la Rosa participó en el análisis de datos y en la revisión del informe final.

Todos los autores revisaron y aprobaron la versión final de este manuscrito.

Referencias

1. Ministerio de Salud Pública Cuba. Anuario estadístico de Salud, 2009. La Habana: Ministerio de Salud Pública; 2020.
2. Pérez-Ruiz L, Rodríguez-Mendoza M, Soto-Molina H, Galán-Alvarez Y, Viada-Gonzalez CE, Collazo-Herrera MM. Nimotuzumab (CIMAher®) en pacientes cubanos con cáncer de cabeza y cuello estadíos III/IV: Análisis de impacto presupuestario. *VacciMonitor*. 2020; 29(1):14-21. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/vac/v29n1/1025-0298-vac-29-01-14.pdf>.

3. Viada C, Vega A, Robaina M, Frías A, Álvarez M, Santiesteban Y, et al. Evaluación de Nimotuzumab para el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello: Meta análisis de ensayos controlados. *Revista Bionatura*. 2020;5:1056-62. Disponible en: <http://revistabionatura.com/files/2020.05.01.8.pdf>.
4. Saborido L, Soriano J, Álvarez S, González Z, Riquelme I. Evaluación del efecto antitumoral del nimotuzumab combinado con radioquimioterapia en tumores de esófago. *Rev Cubana Farm*. 2015;49(2):254-70. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/far/v49n2/far07215.pdf>.
5. Mora O. Impacto de un medio de cultivo alternativo en el proceso de purificación del Nimotuzumab. [Tesis para optar por el título de Ingeniero Químico]. La Habana: Universidad Tecnológica de La Habana “José Antonio Echeverría”; 2015.
6. Courtois F, Agrawal N, Lauer T, Trut B. Rational design of therapeutic mAbs against aggregation through protein engineering and incorporation of glycosylation motifs applied to bevacizumab. *MAbs*. 2016;8(1):99-112. doi: <https://10.1080/19420862.2015.1112477>.
7. González, M. Is your biologic at risk for protein aggregation? Part 1. [monograph on the Internet]. New York: Pfizer CentreOne;2018 Disponible en: <https://www.pharmaceuticalonline.com/doc/is-your-biologic-at-risk-for-protein-aggregation-part-0001>.
8. Liu B, Guo H, Xu J, Qin T, Xu L, Zhang J, et al. Acid-induced aggregation propensity of nivolumab is dependent on the Fc. *Mabs*. 2016;8(6):1107-17. doi: <https://10.1080/19420862.2016.1197443>.
9. van der Kant R, Karow-Zwick A, Van Durme J, Blech M, Gallardo R, Seeliger D et al. Prediction and Reduction of the Aggregation of Monoclonal Antibodies. *J Mol Biol*.2017;429:1244-61. doi: <https://10.1016/j.jmb.2017.03.014>.
10. Singla A, Bansal R, Joshi V, Rathore AS. Aggregation Kinetics for IgG1-Based Monoclonal Antibody Therapeutics. *AAPS J* 2016;18(3):689-702. doi: <https://10.1208/s12248-016-9887-0>.
11. Joshi V, Yadav N, Rathore AS. Aggregation of Monoclonal Antibody Products: Formation and Removal. *BioPharm Int*. 2013;26(3):5. Disponible en: <https://www.biopharminternational.com/view/aggregation-monoclonal-antibody-products-formation-and-removal>.
12. Piña W, Feliu V, Rivas R. Direct Continuous-Time System Identification of the Purification Process of the Nimotuzumab, a Humanized Monoclonal Antibody. *IEEE Latin American Transactions*. 2018;16(1):31-7. doi: <https://10.1109/TLA.2018.8291451>.
13. CMC Biotech Working Group. A-MAb: case study on bioprocess development. Emerville: CASSS; 2009.
14. Regalado I, Mora O, Zumalacárregui L. Aplicación del análisis de componentes principales en la formación de dímeros durante la purificación de un anticuerpo monoclonal. *VacciMonitor*. 2020;29(3):109-17. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/vac/v29n3/1025-0298-vac-29-03-109.pdf>.
15. Jolliffe IT. *Principal Component Analysis*. Second edition. New York:SpringerVerlag;2002.
16. Zhang X., Lester RL, Dickson RC. Pilp and Lsp1p Negatively Regulate the 3-Phosphoinositide-dependent Protein Kinase-like Kinase Pkh1p and Downstream Signaling Pathways Pkc1p and Ypk1p. *J Biol Chem*. 2004;279(21):22030-8.
17. Vázquez M, Lang D. Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes. *Biotechnology and Bioengineering*. 2011;108(7):1494-1508.
18. Manning MC, Chou DK, Murphy BM, Payne RW, Katayama DS. Stability of protein pharmaceuticals: an update. *Pharm Res*. 2010; 27(4):544-75.
19. Krishnamurthy R, Manning M. The Stability Factor: Importance in Formulation Development. *Curr Pharm Biotechnol*. 2002;3:361-71.
20. Fesinmeyer RM, Hogan S, Saluja A, Brych S R, Kras E., Narhi LO et al. Effect of Ions on Agitation- and Temperature-Induced Aggregation Reactions of Antibodies. *Pharm Res*. 2009;26(4):903-13.
21. Mazzer A, Perraud X, Halley J, O'Hara J, Bracewell D. Protein A chromatography increases monoclonal antibody aggregation rate during subsequent low pH virus inactivation hold. *J Chromatogr A*. 2015;1415 (10):83-90. doi: <https://10.1016/j.chroma.2015.08.068>.

Mathematical model for predicting the formation of aggregates in the purification process of a monoclonal antibody

Abstract

The use of monoclonal antibodies in the fight against cancer is becoming more and more the selected therapy. The introduction of monoclonal antibodies highly demanded in international markets, with high quality requirements needs the production of monoclonal antibodies on a large scale. The increase of dimers in the final product affects its quality, therefore, the efficiency and effectiveness of the process. The objective of this work was to obtain a mathematical model to relate the percentage of dimers with the most influential operating variables. A multiple linear regression model was obtained using Statgraphics Centurion XVII version 17.2.00 software. The model was validated with new production data with a mean error of validation below 20%. The significant variables were: supernatant IgG mass; IgG mass in the effluent from Protein A capture column; pH of the effluent from Protein A capture column; pH of the adjusted product and conductivity of the effluent from anionic exchange membrane. A working interval for each of the influential variables were established, in order to reduce dimers below 3%.

Keywords: monoclonal antibodies; purification; data analysis; mathematical model.

Recibido: 5 de octubre del 2020

Aceptado: 10 de febrero de 2021