

Caracterización físico-química y biológica de un biosimilar de pembrolizumab obtenido en diferentes medios de cultivo

Autores: Marianne Machado Vega, Elianis María Álvarez Alboláez, Haila de la Carida García Ramírez, Midalys Cabrera Mena, y Kathia Rashida de la Luz Hernandez.

1. INTRODUCCIÓN

El Pembrolizumab (Keytruda®), es el líder de los anticuerpos monoclonales terapéuticos en términos de indicaciones aprobadas y ventas de mercado. El Centro de Inmunología Molecular (CIM) desarrolló un biosimilar de pembrolizumab en la línea celular CHO-K1. El objetivo de esta investigación es analizar la influencia de los cambios en el medio de cultivo en las características físico-químicas y biológicas del fármaco.

➤ Cultivo de perfusión semicontinua :

Cinco medios diferentes

● Condición 1(C1): MB02/MB03 80/20 (CIM)

● Condición 2(C2): CIM + 2 % de A + 0,2 % de B

● Condición 3(C3): CIM + 4 % de A + 0,4 % de B

● Condición 4(C4): CIM + 6 % de A + 0,6 % de B

● Condición 5(C5): CIM + 8 % de A + 0,8 % de B

➤ Purificación : Proteína A → Exclusión molecular

➤ Control Positivo(CP): Lote liberado de Pembrolizumab .

2. METODOLOGÍA

Pureza: SDS-PAGE, SEC-HPLC, DLS

Identidad: Western Blot, icIEF.

Actividad biológica: ELISA de inhibición.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Jaffar-Aghaei M, Barzegar-Jalali M, Adibkia K, Hamishehkar H, Valizadeh H. QbD-guided pharmaceutical development of pembrolizumab biosimilar candidate PSG-024. Eur J Pharm Sci. 2022;173:106171
- Torkashvand F, Vaziri B. Main quality attributes of monoclonal antibodies and effect of cell culture components. Iran Biomed J. 2017;21(3):131–141.
- Na Z, Yeo SP, Bharath SR, Bowler MW, Balıkcı E, Wang CI, et al. Structural basis for blocking PD-1-mediated immune suppression by therapeutic antibody pembrolizumab. Cell Res. 2017;27(1):147-150.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

Pureza

Tabla 1. Pureza del monómero determinada por HPLC, diámetro promedio e índice de polidispersidad de las partículas obtenidos por DLS.

Muestras	Pureza del monómero (%)	Diámetro promedio (nm)	Índice de polidispersidad	Polidispersidad
CP	99,42	11,1 ± 0,17	0,052 ± 0,0030	Monodispersa
C1	99,19	21,43 ± 2,83	0,28 ± 0,044	Heterodispersa
C2	99,39	351,26 ± 5,89	0,22 ± 0,011	Heterodispersa
C3	99,40	11 ± 0,17	0,067 ± 0,015	Monodispersa
C4	99,51	12,1 ± 0,35	0,13 ± 0,017	Heterodispersa
C5	99,53	188,45 ± 13,081	0,211 ± 0,009	Heterodispersa

*Perfil electroforético similar entre condiciones y con el CP. No mostrado.

Identidad por Western Blot

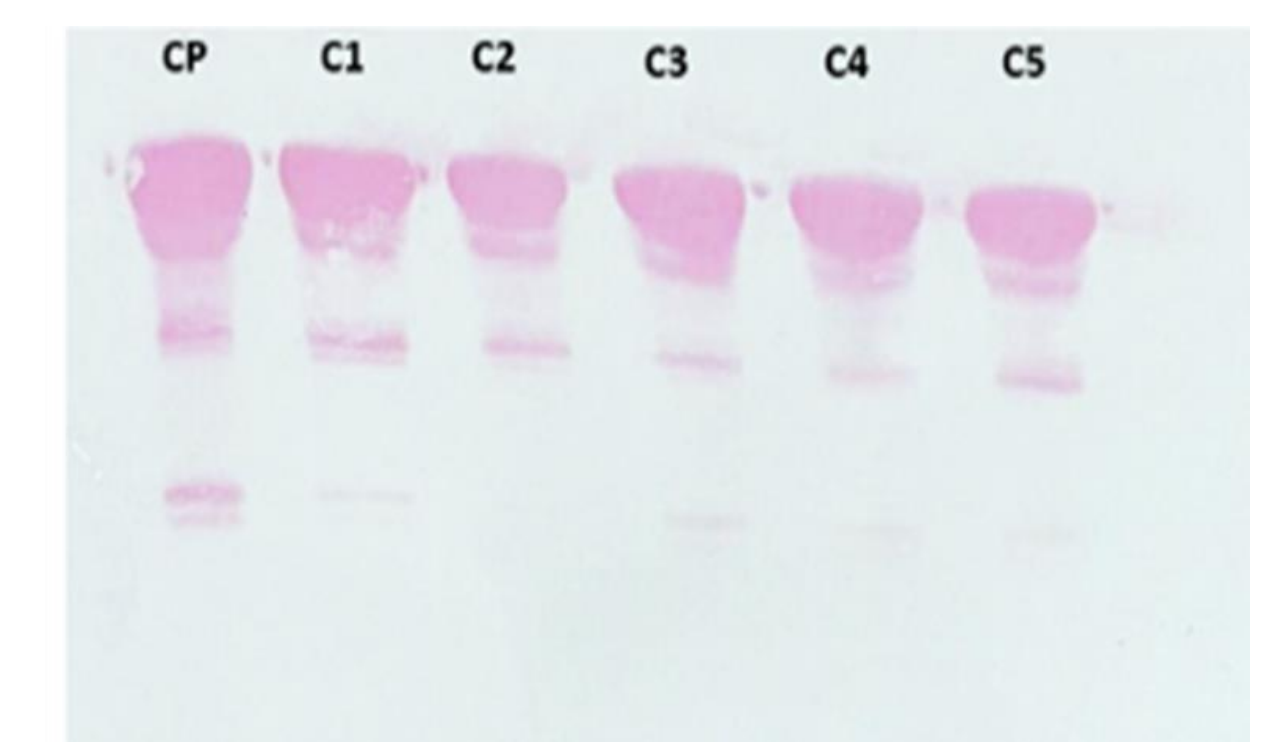


Figura 1. Evaluación de la identidad por Western Blot del AcM Pembrolizumab.

Perfil de isoformas

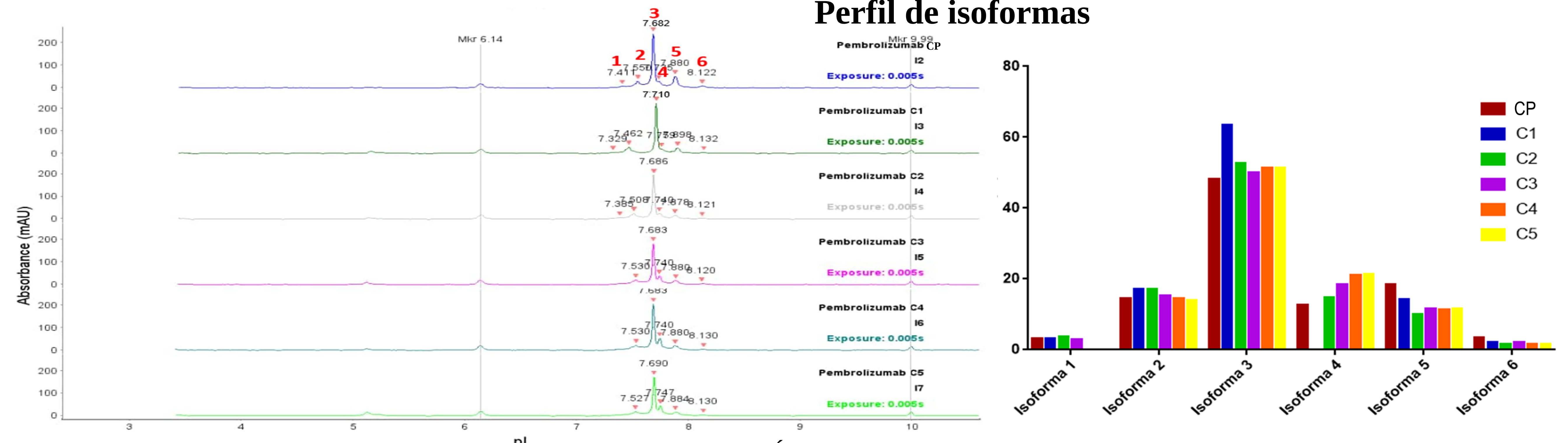


Figura 2.(A) Perfil de isoformas obtenido por icIEF. (B) Área (%) que representa cada isoformas por muestra.

Inhibición de la unión PD-1/PD-L1

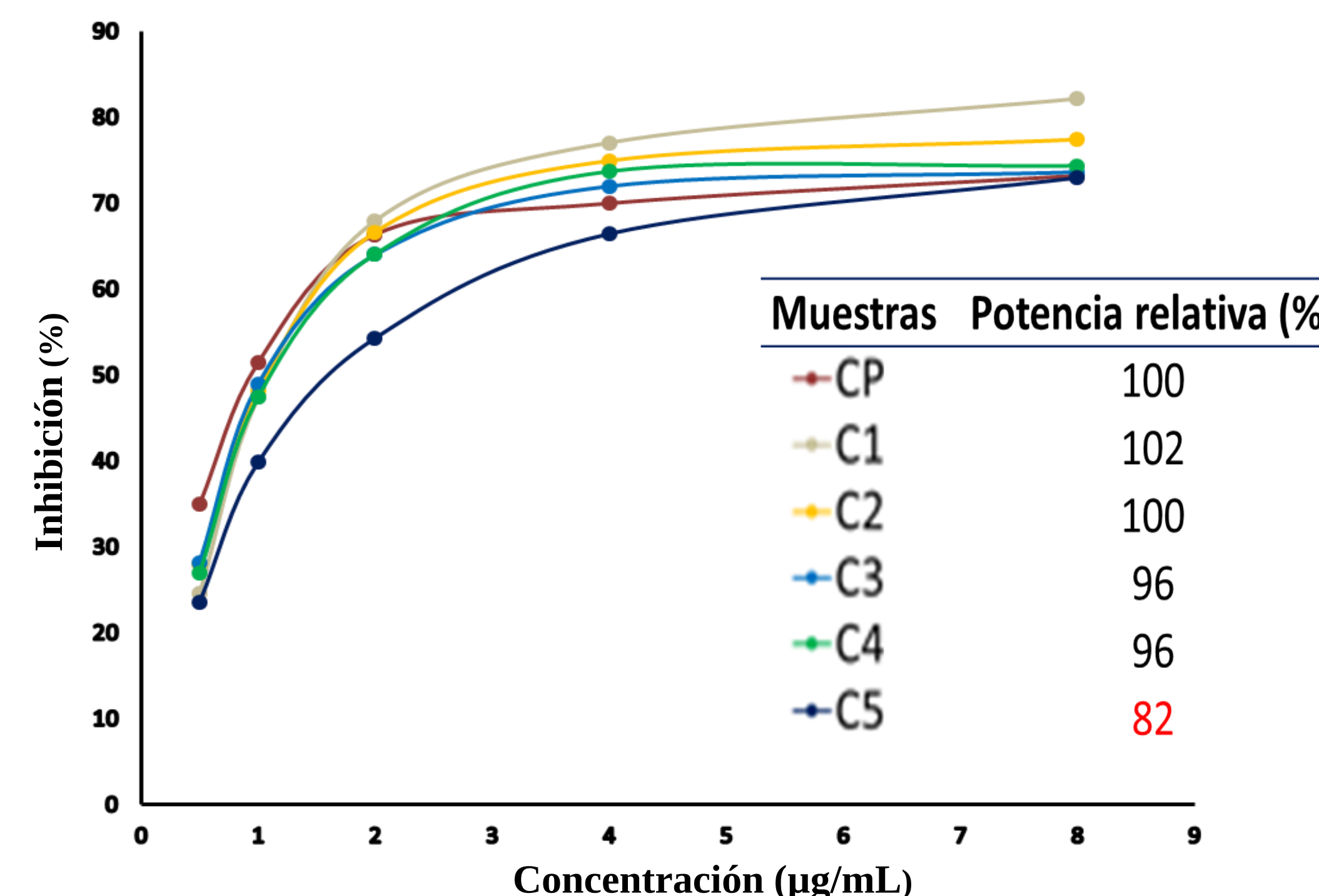


Figura 3. Porcentaje de inhibición de cada muestra según su concentración y su potencia relativa con respecto al CP determinado por un ELISA de inhibición.

4. CONCLUSIONES

- El biosimilar de pembrolizumab obtenido presentó un porcentaje de pureza elevado mayor al 99 % y las diferencias se encontraron en la agregación y la microheterogeneidad de carga.
- La potencia relativa se encontró entre un 80-120 % por lo que cumple con los criterios de aceptación aprobados por el CIM.
- Los cambios en el medio de cultivo no impactaron en las propiedades físico-químicas y biológicas del biosimilar de pembrolizumab, excepto en el perfil de isoformas.