

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 744**

51 Int. Cl.:

G01N 30/38 (2006.01)

G01N 30/72 (2006.01)

G01N 30/84 (2006.01)

H01J 49/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2008 E 12175163 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2013 EP 2508880**

54 Título: **Sistema para derivar un eluyente de cromatografía de líquidos**

30 Prioridad:

24.08.2007 US 966116 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

07.01.2014

73 Titular/es:

**EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)
290 Concord Road
Billerica, MA 01821, US**

72 Inventor/es:

**JIANG, TONGBO;
FOLLO, CHERYL y
PHELAN, MAURICE G.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 436 744 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistema para derivar un eluyente de cromatografía de líquidos

Solicitud relacionada

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EE.UU. No. 60/966.116 registrada el 24 de agosto de 2007.

Antecedentes de la invención

10 Los dispositivos filtrantes se usan extensamente para separar partículas y microorganismos o purificar proteínas de productos biofarmacéuticos. Durante la filtración, podrían extraerse materiales de un dispositivo filtrante en un producto y afectar a su eficacia y seguridad. La FDA requiere la evaluación de productos extraíbles del filtro para productos tipo fármacos tanto para seres humanos como animales.

15 Los compuestos extraíbles del filtro son mezclas complejas que principalmente consisten en bajas concentraciones de oligómeros y aditivos de diversas propiedades físicas y químicas. Puesto que la concentración de otros componentes del producto biofarmacéutico será mayor, la señal analítica de los compuestos extraíbles del filtro puede estar enmascarada y, por lo tanto, hacer su presencia indetectable. Convencionalmente, se usa el Enfoque de la Corriente Modelo (en inglés "Model Stream Approach") (Stone, T.E.; Goel, V.; Leszczak, J. *Pharmaceutical Tech.* 1994, 116-130) para estudiar los compuestos extraíbles presentes tras la etapa de filtración. Durante este método, el dispositivo filtrante se somete a un disolvente modelo que estimula efectos químicos específicos de una disolución farmacéutica. Bajo este principio, los disolventes modelo se seleccionen para que representen los extremos del entorno (pH alto o bajo, altas concentraciones salinas, o disolventes orgánicos) al cual el dispositivo filtrante puede ser expuesto, pero que no son idénticas al contenido real del producto biofarmacéutico. Puede crearse un "escenario del peor de los casos" en condiciones agresivas en las que se maximiza el contenido de compuestos extraíbles del filtro. Para detectar la presencia de compuestos extraíbles en el disolvente modelo durante el procedimiento de ensayo se emplean técnicas analíticas, tales como la cromatografía de líquidos con detección UV (LCUV), la cromatografía de gases - espectrometría de masas (GCMS) y la espectrometría de infrarrojos con transformada de Fourier.

20

25

La Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. No. 2007/048187 A1 proporciona un método y aparato para optimizar un sistema de cromatografía de líquidos/espectrometría de masas para la elución en gradiente. Se determinan un perfil de temperatura y un perfil de flujo basados en las características de una matriz cuando la matriz eluye desde una columna a una interfase de ionización a presión atmosférica.

30 La Patente de EE.UU. No. 5.703.360 proporciona un sistema de calibración automatizado para usar en un aparato de separación de líquidos/espectrometría de masas. El sistema de calibración se presuriza neumáticamente para mover forzosamente un líquido de referencia desde el sistema de calibración a una fuente de iones. La fuente de iones está en comunicación fluida con una válvula de conmutación y con un espectrómetro de masas. La válvula de conmutación comunica el efluente de un sistema de separación de líquidos con la fuente cuando la válvula de conmutación está en una primera posición, y comunica los líquidos de referencia del sistema de calibración con la fuente cuando la válvula de conmutación está en una segunda posición.

35

Compendio de la invención

40 Según la presente invención, se proporciona un desviador para cromatografía de líquidos para reducir o eliminar los componentes interferentes de la matriz en un producto biofarmacéutico en un sistema de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas, que comprende: una válvula de inyección de seis puertos;

Un puerto de la válvula de inyección de seis puertos de entrada del eluyente, estando el puerto de entrada del eluyente en conexión mediante un flujo de líquido con una columna de cromatografía de líquidos; y

45 Un puerto de la válvula de inyección de seis puertos de salida al espectrómetro de masas, estando el puerto de salida al espectrómetro de masas en conexión mediante un flujo de líquido con un espectrómetro de masas;

Un medio para conmutar automáticamente la válvula entre una configuración de flujo a residuos y una configuración de flujo a la fuente, derivando la configuración de flujo a residuos un flujo completo desde el puerto de entrada del eluyente para que se dirija a residuos, y dirigiendo la configuración de flujo a la fuente el flujo completo desde el puerto de entrada del eluyente para que se dirija al espectrómetro de masas;

El sistema derivador que además comprende un bucle de flujo de calibración entre dos puertos adyacentes de la válvula de inyección de seis puertos, dirigiendo la configuración de flujo a residuos el flujo de un líquido de calibración a través del bucle de flujo de calibración y al espectrómetro de masas, y dirigiendo la configuración de flujo a la fuente el flujo del líquido de calibración a residuos y formando un bucle de flujo cerrado que incluye el bucle de flujo de calibración.

Así, la válvula de inyección de seis puertos está configurada para que se conmute automáticamente entre una configuración de flujo a residuos y una configuración de flujo a la fuente, derivando la configuración de flujo a residuos un flujo completo desde el puerto de entrada del eluyente para que se dirija a residuos, y dirigiendo la configuración de flujo a la fuente el flujo completo desde el puerto de entrada del eluyente para que se dirija al espectrómetro de masas.

En otras realizaciones relacionadas, el puerto de salida al espectrómetro de masas puede ser un puerto de la válvula de inyección de seis puertos adyacente al puerto de entrada del eluyente, y un puerto a residuos puede ser otro puerto adyacente al puerto de entrada del eluyente. La configuración de flujo a residuos puede dirigir el flujo completo desde el puerto de entrada del eluyente a residuos vía el puerto a residuos, y la configuración de flujo a la fuente puede dirigir el flujo completo desde el puerto de entrada del eluyente al espectrómetro de masas vía el puerto de salida al espectrómetro de masas.

También se describe un método para reducir o eliminar los componentes interferentes de la matriz en un producto biofarmacéutico en un sistema de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas. El método comprende derivar a residuos el flujo completo de un eluyente que emerge de la cromatografía de líquidos de una muestra durante un período de tiempo para separar los contaminantes que provoquen interferencia de la matriz en una extensión suficiente para permitir la exactitud deseada en la detección de un compuesto extraíble; y, después del período de tiempo, dirigir el flujo completo del eluyente a un espectrómetro de masas para detectar la presencia del compuesto extraíble.

El método puede comprender dirigir el flujo de un líquido de calibración al espectrómetro de masas durante el período de tiempo; y puede comprender dirigir el flujo del líquido de calibración a residuos después del período de tiempo. Derivar el eluyente a residuos durante el período de tiempo y dirigir el eluyente al espectrómetro de masas después del período de tiempo puede realizarse usando una válvula de inyección de seis puertos. El método puede comprender dirigir el flujo completo del eluyente a un puerto de la válvula de inyección de seis puertos que es adyacente tanto a (i) un puerto desde el cual el líquido fluye directamente a un espectrómetro de masas; como a (ii) un puerto desde el cual el líquido fluye directamente a residuos. Dirigir el flujo del líquido de calibración al espectrómetro de masas durante el período de tiempo y dirigir el flujo del líquido de calibración a residuos después del período de tiempo puede realizarse usando una válvula de inyección de seis puertos. El método puede comprender dirigir el flujo del líquido de calibración al espectrómetro de masas durante el período de tiempo por medio de un bucle de flujo entre dos puertos adyacentes de la válvula de inyección de seis puertos.

Breve descripción de los dibujos

Lo precedente será evidente a partir de la siguiente descripción más particular de realizaciones ejemplo de la invención, que se ilustran en los dibujos acompañantes en los cuales los mismos caracteres de referencia se refieren a las mismas partes en todas las diferentes vistas. Los dibujos no están necesariamente a escala, poniéndose el énfasis en su lugar en realizaciones ilustrativas de la presente invención.

La FIG. 1A es un diagrama esquemático de un patrón de flujo de líquidos cuando se usa una válvula de inyección convencional en una técnica de cromatografía de líquidos/espectrometría de masas, con la válvula de inyección en la posición "residuos".

La FIG. 1B es un diagrama esquemático de un patrón de flujo de líquidos cuando la válvula de inyección convencional de la FIG. 1A es conmutada a la posición "fuente".

La FIG. 2A es un diagrama esquemático de un patrón de flujo de líquidos a través de un sistema derivador de cromatografía de líquidos según una realización de la invención, con el sistema derivador en la posición "residuos".

La FIG. 2B es un diagrama esquemático de un patrón de flujo de líquidos a través de un sistema derivador de cromatografía de líquidos según una realización de la invención, con el sistema derivador en la posición de "fuente".

La FIG. 3 es el cromatograma de picos base de la etapa de separación por cromatografía de líquidos del patrón de compuestos extraíbles del filtro superpuesto sobre el cromatograma del testigo.

La FIG. 4 es el espectro de masas de los dos picos identificados en el cromatograma de la etapa de cromatografía de líquidos del patrón.

5 La FIG. 5 es la superposición de los cromatogramas del patrón de compuestos extraíbles, un producto fármaco basado en pequeñas moléculas y el producto fármaco basado en pequeñas moléculas fortificado con el patrón de compuestos extraíbles.

La FIG. 6 es la superposición de los cromatogramas del patrón de compuestos extraíbles, un producto fármaco basado en grandes moléculas y el producto fármaco basado en grandes moléculas fortificado con el patrón de compuestos extraíbles.

Descripción detallada de la invención

10 Sigue una descripción de realizaciones ejemplo de la invención.

Según la invención, se proporciona un sistema derivador para cromatografía de líquidos, que ayuda a reducir la presencia de compuestos interferentes en una muestra que se tiene que analizar por espectrometría de masas. La invención permite a un usuario medir la cantidad de compuestos extraíbles en un producto fármaco o biofarmacéutico, reduciendo la presencia de compuestos interferentes que pudieran enmascarar picos de compuestos extraíbles en el análisis por espectrometría de masas.

A modo de ilustración del sistema derivador para cromatografía de líquidos según una realización de la invención, se describe en primer lugar el uso de una válvula de inyección convencional en un contexto similar. Las válvulas de inyección convencionales pueden ser conmutadas entre una posición de "residuos" y una posición de "fuente", las cuales alteran el patrón de flujo de líquido entre puertos de la válvula de inyección.

20 La FIG. 1A es un diagrama esquemático de un patrón de flujo de líquidos cuando se usa una válvula de inyección convencional en una técnica de cromatografía de líquidos/espectrometría de masas, con la válvula de inyección en la posición "residuos". El líquido a analizar fluye desde una bomba 101 al automuestreador 102, y desde allí a columna 103 de cromatografía de líquidos. Después, el líquido viaja a través de la columna 103 de cromatografía de líquidos, el eluyente 104 de cromatografía de líquidos entra en un primer puerto 105 de una válvula de inyección de seis puertos convencional. El eluyente 104 incluye compuestos extraíbles del filtro, los cuales interesa detectar en el producto fármaco o biofarmacéutico, así como compuestos que interfieren con la medida de los compuestos extraíbles. Con la válvula de inyección de seis puertos convencional en la posición de "residuos", el eluyente fluye directamente desde el primer puerto 105 al segundo puerto 106 de la válvula, y desde allí directamente al espectrómetro de masas 111. Mientras tanto, un líquido de calibración fluye desde una bomba de jeringa 112 a un quinto puerto 109 (contando en sentido antihorario alrededor de la válvula de inyección de seis puertos) de la válvula. El líquido de calibración fluye entonces a un sexto puerto 110, y desde allí a través de un bucle de flujo 113 que está posicionado en una relación de flujo en serie entre el sexto puerto 110 y un tercer puerto 107 de la válvula de seis puertos. Desde el tercer puerto 107, el líquido de calibración se desplaza a un cuarto puerto 108 y desde allí a residuos 114.

35 La FIG. 1B es un diagrama esquemático de un patrón de flujo de líquidos cuando la válvula de inyección convencional de la FIG. 1A es conmutada a la posición "fuente". Como en la FIG. 1A, el líquido fluye inicialmente desde la bomba 101 al automuestreador 102, y a través de la columna 103 de cromatografía de líquidos para producir el eluyente 104, el cual se introduce en el primer puerto 105. Con la válvula de seis puertos en la posición de "fuente", el eluyente 104 se dirige entonces al sexto puerto 110, y a través del bucle 113 de flujo al tercer puerto 107. Debido a que el bucle 113 de flujo previamente contenía líquido de calibración en la posición "residuos" de la FIG. 1A, parte del líquido de calibración es barrido junto con el eluyente cuando fluye a través del bucle 113 de flujo. Desde el tercer puerto 107, el eluyente fluye a continuación al segundo puerto 106, y luego directamente al espectrómetro de masas 111. Debido a que parte del líquido de calibración es transportado con el eluyente, el líquido de calibración es introducido al espectrómetro de masas 111 junto con el eluyente, para permitir la calibración de masas. Mientras tanto, el líquido de calibración procedente de la bomba de jeringa 112 es dirigido al quinto puerto 109, y desde allí vía el cuarto puerto 108 a residuos 114.

50 Usando la válvula de inyección de seis puertos convencional como en las FIGS. 1A y 1B, la válvula puede ser conmutada vía segmentos de tiempo en el método de adquisición entre la posición de "residuos" de la FIG. 1A y la posición de "fuente" de la FIG. 1B. Sin embargo, en ambas posiciones de la válvula de inyección de seis puertos convencional, el eluyente 104 de cromatografía de líquidos es continuamente introducido en el espectrómetro de masas 111, y, por lo tanto, porta con él compuestos que interfieren en, o son incompatibles con, el análisis por espectrometría de masas. Por lo tanto, es difícil detectar y medir exactamente la presencia de productos extraíbles

del filtro en una muestra de un fármaco usando la válvula de inyección de seis puertos convencional de las FIGS. 1A y 1B.

Por el contrario, la FIG. 2A es un diagrama esquemático de un patrón de flujo de líquidos a través de un sistema derivador de cromatografía de líquidos según una realización de la invención, con el sistema derivador en la posición "residuos". Al contrario que en la válvula de inyección de seis puertos convencional de las FIGS. 1A y 1B, el sistema derivador de las FIGS. 2A y 2B incluye un bucle de flujo 215 entre puertos adyacentes de una válvula de inyección de seis puertos, e introduce el eluyente 204 de cromatografía de líquidos por un puerto 207 que es adyacente tanto al puerto 206 que conduce al espectrómetro de masas 211 como al puerto 208 que conduce a los residuos 214. En la posición de "residuos", el líquido de calibración fluye desde la bomba de jeringa 212 al quinto puerto 209 de una válvula de inyección de seis puertos, y desde allí al sexto puerto 210. Usando el bucle de flujo 215 añadido entre el sexto puerto 210 adyacente y el primer puerto 205, el líquido de calibración fluye entonces al primer puerto 205. Desde allí, el líquido de calibración se dirige al segundo puerto 205, y al espectrómetro de masas 211. Mientras tanto, el eluyente 204 de la columna 203 de cromatografía de líquidos entra en el sistema derivador por el tercer puerto 207, y se dirige al cuarto puerto 208, y desde allí se dirige a residuos 214. Por lo tanto, en la posición de "residuos", usando el sistema derivador de la realización de la FIG. 2A, todo el eluyente 204 de la columna de cromatografía de líquidos fluye al residuo 214. Así, en la posición de "residuos", todos los compuestos interferentes, los cuales están presentes en el eluyente 204, son asimismo dirigidos a residuos 214 junto con el eluyente; mientras que el espectrómetro de masas 211 está recibiendo sólo líquido de calibración.

La FIG. 2B es un diagrama esquemático de un patrón de flujo de líquidos a través de un sistema derivador de cromatografía de líquidos según una realización de la invención, con el sistema derivador en la posición de "fuente". Aquí, el eluyente 204 que emerge de la columna de cromatografía de líquidos 203 entra en el tercer puerto 207 y se dirige al segundo puerto 206, y desde allí es directamente llevado al espectrómetro de masas 211, para permitir el análisis de los compuestos extraíbles del filtro en el eluyente. El flujo desde el sexto puerto 210 al primer puerto 205 se hace para que forme un bucle cerrado con el bucle de flujo 215, ya que la ruta de flujo entre el primer puerto 205 y el segundo puerto 206 está cerrada, como lo está la ruta del flujo entre el quinto puerto 209 y el sexto puerto 210. Mientras tanto, el líquido de calibración que fluye desde la bomba de jeringa 212 se dirige desde el quinto puerto 209 al cuarto puerto 208, y desde allí a residuos 214.

Usando el sistema derivador de la realización de las FIGS. 2A y 2B, la válvula puede ser conmutada vía segmentos de tiempo en el método de adquisición entre la posición de "residuos" de la FIG. 2A y la posición de "fuente" de la FIG. 2B. Sin embargo, al contrario que en la técnica que usa la válvula convencional de las FIGS. 1A y 1B, la realización de las FIGS. 2A y 2B permite que el eluyente 204 de la cromatografía de líquidos sea completamente dirigido a residuos, en la posición de "residuos"; y luego sea completamente dirigido al espectrómetro de masas, en la posición de "fuente". De esta forma, el sistema derivador de las FIGS. 2A y 2B puede ser conmutado a la posición de "residuos" durante un período de tiempo, tal como, por ejemplo, los primeros diez minutos de flujo eluyente de cromatografía de líquidos – tiempo durante el cual son eluidos la mayoría o casi todos los compuestos que interfieren en, o son incompatibles con, la medida de compuestos extraíbles por espectrometría de masas. Luego, una vez que la mayoría o casi todos los compuestos interferentes han sido eluidos y enviados a residuos, el sistema derivador de las FIGS. 2A y 2B puede ser conmutado a la posición de "fuente" para dejar que el eluyente de cromatografía de líquidos fluya directamente al espectrómetro de masas para permitir la medida de los compuestos extraíbles sin interferencia de los compuestos interferentes. Así, el sistema derivador para cromatografía de líquidos de las FIGS. 2A y 2B permite una detección más exacta y la medida de la presencia de compuestos extraíbles en una muestra biofarmacéutica o de un fármaco.

Según la realización de las FIGS. 2A y 2B, el periodo de tiempo durante el cual el sistema derivador está en el modo "residuos" y el eluyente de cromatografía de líquidos es directamente enviado a residuos puede determinarse analizando los tiempos a los cuales son eluidos la mayor parte de los compuestos interferentes, en comparación con los tiempos a los cuales son eluidos los compuestos extraíbles. Por ejemplo, puede observarse un pico en espectrometría de masas para los compuestos interferentes durante un cierto período de tiempo, seguido por la aparición de un pico para los compuestos extraíbles. Idealmente, el sistema derivador debe ser conmutado de "residuos" a "fuente" en el último momento posible antes de que el primer compuesto extraíble característico de interés emerja en el eluyente de cromatografía de líquidos. Como se advirtió anteriormente, diez minutos es un ejemplo de un período de tiempo útil para usar la posición "residuos" del sistema derivador, pero pueden usarse otros períodos de tiempo dependiendo de la naturaleza del material filtrante, de los compuestos extraíbles, de los compuestos interferentes, del protocolo del ciclo del autoclave usado para esterilizar el dispositivo filtrante, del contenido del producto fármaco o biofarmacéutico, y de otros factores. En general, el eluyente debe derivarse durante un período de tiempo para separar los contaminantes que provoquen interferencia de la matriz en una extensión suficiente que permita la exactitud deseada en la detección del compuesto extraíble.

Según una realización de la invención, la válvula de inyección de seis puertos usada con el sistema derivador de las FIGS. 2A y 2B puede, por ejemplo, estar basada en una válvula de inyección de seis puertos disponible en Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA, modificada para añadir el bucle de flujo 215 y usar el patrón de flujo de una realización según la invención. El líquido de calibración puede, por ejemplo, fluir a un caudal de 2-10 microlitros por minuto. El espectrómetro de masas 211 puede, por ejemplo, ser un sistema de espectrometría de masas micrOTOF disponible en Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA.

El sistema derivador precedente de la invención puede usarse, en una técnica que use cromatografía de líquidos-espectrometría de masas, para detectar la presencia de compuestos extraíbles en un producto biofarmacéutico, tales como compuestos extraíbles del filtro introducidos por filtración de un producto biofarmacéutico u otros compuestos extraíbles que pueden surgir de materiales que entren en contacto con el producto en la fabricación y procesado del producto biofarmacéutico, tales como plásticos. En contraste con la tecnología actual para analizar compuestos extraíbles, el método descrito en la presente memoria puede usarse para detectar la presencia de compuestos extraíbles del filtro y de otros compuestos extraíbles en el producto biofarmacéutico real, más que usando un sistema disolvente modelo. La detección de compuestos extraíbles del filtro y de otros compuestos extraíbles en el producto fármaco proporciona una exacta caracterización del perfil de compuestos extraíbles que probablemente sean introducidos en el paciente humano o animal mediante el producto biofarmacéutico procesado.

Otro aspecto es un método para detectar compuestos extraíbles en un producto biofarmacéutico preparando una muestra de referencia de un producto biofarmacéutico sin ningún compuesto extraíble, a la cual se añade un patrón de compuestos extraíbles. La muestra de referencia se separa a continuación por cromatografía de líquidos (LC). Tras la separación, la muestra se deriva a residuos durante un período de tiempo para separar los componentes de la muestra de referencia que causen interferencia de la matriz con la detección de los compuestos extraíbles. La muestra de referencia restante se procesa por medio de un espectrómetro de masas para obtener un espectro de masas de referencia. Similarmente, se prepara una muestra de ensayo. La muestra de ensayo es el producto biofarmacéutico que puede contener compuestos extraíbles introducidos por filtración del producto biofarmacéutico o mediante uno de sus procedimientos de fabricación. Para separar la muestra de ensayo se usa la cromatografía de líquidos. Tras la separación, la muestra de ensayo se deriva a residuos durante un período de tiempo para separar los componentes de la muestra de ensayo que causen interferencia de la matriz con la detección de los compuestos extraíbles. La muestra de ensayo restante se procesa por medio de un espectrómetro de masas para obtener un espectro de masas de ensayo. El espectro de masas de la muestra de ensayo se compara con el espectro de masas de la muestra de referencia para verificar la presencia o ausencia de los compuestos extraíbles en la muestra de ensayo. En un aspecto, los compuestos extraíbles son compuestos extraíbles del filtro que son introducidos por filtración del producto biofarmacéutico. En otro aspecto, los compuestos extraíbles pueden ser cualquier cosa que pueda ser lixiviada en el equipo, materiales o superficies usadas para fabricar y procesar el producto biofarmacéutico o los productos intermedios, tales como plásticos. En un aspecto particular, los compuestos extraíbles del filtro pueden ser de membranas soporte de polipropileno (PP) o membranas microporosas de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) (tales como de filtros y membranas comercialmente disponibles con el nombre Durapore® (Millipore® Corporation)).

En otro aspecto, puede determinarse la cantidad de los compuestos extraíbles presentes en el producto biofarmacéutico por LCMS.

Otro aspecto se dirige a un método para usar la cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LCMS) para detectar compuestos extraíbles del filtro usando tiempos de retención característicos de productos extraíbles del filtro. Un aspecto adicional es usar tiempos de retención medios de aproximadamente 11,5 y aproximadamente 12,4 minutos.

Otro aspecto se dirige a un método para usar la cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LCMS) para detectar iones característicos de productos extraíbles del filtro. Un aspecto adicional es para detectar iones a aproximadamente 329,2 y aproximadamente 357,2 M/Z.

En otro aspecto, la muestra se separa por LC y a continuación se deriva a residuos durante un período de tiempo antes de ser procesada mediante el MS. En otro aspecto, el tiempo que la muestra se deriva a residuos tras la separación por LC depende del tipo de filtro usado, de las condiciones de esterilización y filtración, y del contenido del producto biofarmacéutico. En otro aspecto, la derivación debe ocurrir en el último momento posible antes de que el primer compuesto extraíble diana característico del filtro de interés sea eluido en la etapa de LC. En otro aspecto, el período de tiempo es de hasta 10 minutos. En otro aspecto, el tiempo de derivación a residuos es 10 minutos.

En otra realización de la invención, los componentes que causan interferencia de la matriz se seleccionan de un grupo que consiste en ingredientes farmacéuticos activos; agentes amortiguadores del pH; sales; conservantes; solubilizantes; agentes quelantes; ácidos; bases; azúcares; proteínas, péptidos, y combinaciones de los mismos.

La Food and Drug Administración (FDA) requiere la evaluación de productos extraíbles del filtro durante el procedimiento de aprobación de una droga que se pretende sea para uso de seres humanos o de animales. Según la FDA, el disolvente usado para extraer los compuestos extraíbles del filtro del dispositivo filtrante sería idealmente el producto fármaco en sí mismo, obteniendo así el mismo perfil de extracción cualitativo (Guidance for Industry: "The Container Closure Systems for Packaging Human Drugs and Biologics." 1999; Attachment C: Extraction Studies). Sin embargo, la detección de los compuestos extraíbles del filtro es difícil de conseguir en la disolución biofarmacéutica real, principalmente porque la concentración de los compuestos extraíbles del filtro en el producto fármaco filtrado es con frecuencia un orden de magnitud menor que la de otros componentes de la disolución. Para salvar este obstáculo analítico, el método actual para la detección de compuestos extraíbles del filtro se consigue a través del Enfoque de la Corriente Modelo (del inglés "Model Stream Approach") (Stone, T.E.; Goel, V.; Leszczak, J. Farmaceutical Tech. 1994, 116-130). En este protocolo, se emplea un sistema disolvente sustituto para someter al dispositivo de filtración a condiciones químicas extremas, las cuales no son necesariamente representativas de las condiciones que son del producto biofarmacéutico. El fin de usar disolventes alternativos es producir un escenario del peor caso para mostrar todos los posibles compuestos extraíbles de un dispositivo filtrante dado. Aunque el Model Stream Approach proporciona información útil, no puede usarse para detectar los compuestos extraíbles del filtro reales presentes en el producto biofarmacéutico para uso de seres humanos o animales. La capacidad para detectar los compuestos extraíbles del filtro realmente presentes en el producto biofarmacéutico ayudaría a determinar la seguridad y la eficacia del fármaco.

Un método que usa la presente invención permite la detección de productos extraíbles del filtro en el producto biofarmacéutico real, más que en un sistema disolvente modelo. El método utiliza la cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LCMS) para detectar iones característicos de compuestos extraíbles introducidos por filtración de los productos biofarmacéuticos. Aunque los ejemplos posteriores ilustran métodos para detectar compuestos extraíbles del filtro, los métodos son en general aplicables a cualquier compuesto extraíble que se introduzca en un producto biofarmacéutico durante la fabricación o el procesado, tales como plásticos lixiviables de las carcasas de los filtros u otros equipamiento potencialmente lixiviable que entre en contacto con el producto biofarmacéutico. Así, los métodos que usan la invención permiten la detección de compuestos extraíbles, en general, en un producto biofarmacéutico.

Los métodos convencionales, tales como LCUV y FTIR, no son capaces de detectar compuestos extraíbles directamente en un producto biofarmacéutico debido a una sensibilidad limitada o a una fuerte interferencia de la matriz. Sin embargo, la detección de compuestos extraíbles puede ahora conseguirse directamente en el producto biofarmacéutico según los métodos que usan esta invención debido al descubrimiento de un sistema para reducir o eliminar la interferencia de la matriz. La reducción o eliminación de componente(s) dentro del producto biofarmacéutico que contribuye(n) a la interferencia de la matriz permitirá la detección de concentraciones bajas o traza de compuestos extraíbles usando la espectrometría de masas que de otra manera serían enmascarados por los componentes interferentes. Aplicando dichos métodos ahora es posible la detección de los compuestos extraíbles del filtro en productos biofarmacéuticos, y así proporciona efectivamente una necesidad insatisfecha a la industria que ensaya e informa a la FDA.

Los métodos descritos en la presente memoria son útiles para detectar, identificar y opcionalmente cuantificar contaminantes en un producto biofarmacéutico, el cual puede contener compuestos extraíbles, lixiviables o impurezas. Los compuestos extraíbles son compuestos que pueden extraerse de componentes elastómeros o plásticos del material que entra en contacto con el producto en presencia de un disolvente. Los lixiviables son compuestos que son extraídos en la formulación de componentes elastómeros o plásticos del material que entra en contacto con el producto. Las impurezas son compuestos que están presentes en el producto biofarmacéutico o pueden ser introducidos en el producto biofarmacéutico. Como se pone de manifiesto en la presente memoria, se pretende que la expresión "compuestos extraíbles" cubra los compuestos que son considerados lixiviables. Para un tratamiento sencillo, los métodos se describirán con respecto a los compuestos extraíbles pero también se contemplan los lixiviables y las impurezas. Los compuestos extraíbles son mezclas complejas que principalmente consisten en oligómeros y aditivos de diversas propiedades físicas y químicas y que con frecuencia están presentes en concentraciones mucho más bajas que cualquier otro ingrediente del producto biofarmacéutico, haciendo difícil la detección de su presencia. La FDA requiere la evaluación de los compuestos extraíbles para su impacto en la seguridad y eficacia de los productos biofarmacéuticos.

Los productos biofarmacéuticos incluyen productos tipo fármacos para uso de seres humanos o animales. El producto biofarmacéutico comprende un ingrediente farmacéutico activo (API) y excipientes. El API es cualquier componente que se pretende proporcione actividad farmacológica u otro efecto directo en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecte a la estructura o a cualquier función del cuerpo de los hombres o de los animales. El término "API" incluye aquellos componentes que pueden experimentar un cambio químico en la fabricación del producto fármaco y que estén presentes en el producto fármaco en una

forma modificada que se pretende proporcione la actividad o efecto especificado. Ejemplos de API adecuados para usar con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, pequeñas moléculas orgánicas, grandes moléculas orgánicas, ácidos nucleicos, aminoácidos y proteínas. Las pequeñas moléculas orgánicas tienen típicamente un peso molecular inferior a 500 Daltons, mientras que grandes moléculas orgánicas superan los 500 Daltons. La interferencia de la matriz es con frecuencia más fuerte cuando están presentes grandes moléculas orgánicas. Cuando están presentes grandes moléculas orgánicas, puede ser necesario incluir una etapa de pretratamiento antes de la etapa de LCMS. Más adelante se describen etapas de pretratamiento representativas, tales como la precipitación.

Los productos biofarmacéuticos pueden además comprender excipientes, que incluyen, pero no se limitan a, agentes amortiguadores del pH, ácidos, bases, sales, solubilizantes, conservantes, agentes quelantes, azúcares, aminoácidos, proteínas y disolventes. Uno, varios o todos estos componentes pueden estar presentes en el producto biofarmacéutico. Muchos de estos ingredientes, si no todos, contribuyen en parte a la interferencia de la matriz con la señal detectable de los compuestos extraíbles y deben ser eliminados del o reducidos en el producto biofarmacéutico antes para detectar los compuestos extraíbles. Pueden usarse métodos conocidos para separar o reducir la cantidad de componentes que contribuyen a la interferencia de la matriz, tales como la precipitación de las proteínas. Por ejemplo, puede añadirse acetona a una disolución de proteínas en una relación en volumen de 4 a 1. Después de 15 minutos de reacción, la disolución se centrifuga durante 10 minutos a 15.000 RPM. A continuación, se separa el sobrenadante que contiene el o los analitos de interés para un análisis posterior. También pueden conseguirse métodos para reducir o separar los componentes interferentes de la matriz usando el nuevo método y sistema de derivación descrito en detalle más adelante.

En el curso de la producción, los productos biofarmacéuticos pueden extraer compuestos químicos de los recipientes o dispositivos de filtración con los cuales están en contacto. El período de tiempo que el producto biofarmacéutico está en contacto, la temperatura a la cual se produce el contacto, así como otros disolventes o solutos presentes en el producto biofarmacéutico impactan todos en la cantidad y tipo de compuesto extraíble que puede estar presente en el producto biofarmacéutico. Los compuestos extraíbles engloban una o múltiples especies y pueden surgir en diferentes etapas durante la producción del producto biofarmacéutico. Por ejemplo, los compuestos extraíbles pueden ser introducidos por filtración cuando el producto biofarmacéutico se hace pasar a través de un dispositivo filtrante. Los dispositivos filtrantes se usan para separar partículas y microorganismos o purificar proteínas de productos biofarmacéuticos. Ejemplos representativos incluyen membranas microporosas de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) y membranas soporte de polipropileno (PP) tales como el filtro Millipore® Durapore®; las membranas microporosas de vidrio de borosilicato y las membranas soporte de polipropileno tales como el filtro Millipore® Lifegard®; membranas microporosas de polipropileno y membranas soporte de polipropileno (PP) tales como el filtro Millipore® Poligard®; membranas microporosas de politetrafluoroetileno y membranas soporte de polipropileno tales como el filtro Millipore® Opticap®; y membranas microporosas hidrófilas de poliétersulfona y membranas soporte de polipropileno tales como el filtro Millipore Express®.

En otro ejemplo, los fármacos pueden extraer componentes de sus recipientes durante estudios de vida útil, llegando de este modo a estar contaminados con compuestos extraíbles. Ejemplos representativos incluyen películas de recipientes de procesado en las cuales el fluido entra en contacto con un material que está fabricado de polietileno de baja densidad (ULDPE); la barrera a los gases está fabricada de copolímeros de polietileno y alcohol vinílico (EVOH); y las capas externas están fabricadas de copolímeros de etileno y acetato de vinilo (EVA) y ULDPE tales como la película para recipientes de procesado Millipore® PureFlex®. Durapore®, Lifegard®, Poligard®, Opticap®, Millipore Express®, PureFlex® y Millipore® son marcas comerciales registradas de Millipore Corporation, Billerica, MA.

El método para detectar compuestos extraíbles en un producto biofarmacéutico implica comparar el espectro de masas de una muestra de ensayo con una muestra de referencia. Como se usa en la presente memoria, la "muestra de referencia" es una muestra del producto biofarmacéutico que no tiene ningún compuesto extraíble introducido durante la producción, pero a la cual se añade un patrón de compuestos extraíbles. Por ejemplo, la muestra de referencia puede ser una muestra del producto biofarmacéutico que no ha sido filtrada y a la cual se añade un patrón de compuestos extraíbles. El patrón de compuestos extraíbles es una mezcla de compuestos extraíbles que puede ser introducida en un producto biofarmacéutico por medio del uso de un recipiente o dispositivo filtrante particular. El perfil del patrón de compuestos extraíbles de un material que entra en contacto con el producto, tal como un dispositivo filtrante, se determinaría por métodos previamente establecidos. Por ejemplo, el Enfoque de la Corriente Modelo puede aplicarse en un amplio intervalo de condiciones (que incluyen temperaturas extremas, intervalos de pH extremos, o disolventes reactivos que incluyen disolventes orgánicos, largos tiempos de extracción, repetición de ciclos en el autoclave) a un componente particular del procedimiento de producción, tal como un dispositivo filtrante. El disolvente a escoger se seleccionará para que mimétice al disolvente del producto biofarmacéutico a ensayar. En muchos casos, el disolvente a escoger será el agua u otros disolventes acuosos porque la mayor parte de los

productos biofarmacéuticos están presentes en un medio acuoso. Los análisis de los componentes encontrados durante este procedimiento pueden indicar los productos químicos que pueden ser extraídos o lixiviados de los materiales usados en la producción del producto biofarmacéutico y proporcionar un perfil de compuestos extraíbles en el producto biofarmacéutico. El patrón de compuestos extraíbles contendría estos componentes conocidos en concentraciones apropiadas.

Cuando se usa en la presente memoria, la "muestra de ensayo" es un producto biofarmacéutico que puede contener compuestos extraíbles a determinar. Por ejemplo, la filtración del producto biofarmacéutico puede introducir compuestos extraíbles, y así sería una muestra de ensayo apropiada.

La preparación previa a la inyección de la muestra de referencia o de la muestra de ensayo puede preformarse. Una posible preparación podría implicar calentar la muestra o añadir dodecilsulfato de sodio (SDS) para desnaturalizar y/o precipitar cualquier proteína presente. Algunos productos biofarmacéuticos pueden contener otros ingredientes que pueden separarse por extracción en fase sólida, o alteración del pH o de la fuerza iónica de la disolución. Pueden usarse otras técnicas de preparación de muestras para los métodos descritos. Un método de analizar la concentración de los compuestos extraíbles en disolventes modelo es el análisis del residuo no volátil. Las muestras pueden ser diluidas para conseguir una concentración apropiada antes de la inyección en la LCMS.

La cromatografía de líquidos se usa para separar independientemente las muestras de referencia y de ensayo. Las fases móviles, la fase estacionaria, el caudal, la temperatura y el volumen de inyección deben optimizarse durante el desarrollo de método. Tras la separación por LC, el eluyente de la muestra se deriva a residuos durante un período de tiempo. El proceso de derivación separa o reduce los componentes que pueden provocar la interferencia de la matriz, la cual interfiere con la ejecución del método de ensayo tal que no se pueden generar datos fiables. La interferencia de la matriz es provocada por muestras con valores extremos de pH, altas concentraciones de sales, constituyentes químicos reactivos, o altas concentraciones de compuestos no diana. Los siguientes párrafos describen las categorías generales de componentes de productos biofarmacéuticos que pueden provocar la interferencia de la matriz.

El Ingrediente farmacéutico activo (API) del producto biofarmacéutico es una fuente de interferencia de la matriz. En algunas situaciones, el API eluye a un tiempo anterior que el compuesto extraíble diana, y puede ser derivado fuera del MS usando los métodos de derivación que se describen en la presente memoria.

Otra causa común de interferencia de la matriz son los agentes amortiguadores del pH. Una lista de posibles agentes amortiguadores del pH incluye, pero no se limita a, ACES, acetato, ADA, hidróxido de amonio, AMP (2-amino-2-metil-1-propanol), AMPD (2-amino-2-metil-1,3-propanodiol), AMPSO, BES, BICINE, bis-tris, BIS-TRIS propano, borato, CABS, cacodilato, CAPS, CAPSO, carbonato, CHES, citrato, DIPSO, EPPS, HEPPS, etanolamina, formiato, glicina, glicilglicina, HEPBS, HEPES, HEPPSO, histidina, hidrazina, imidazol, malato, maleato, MES, metilamina, MOBS, MOPS, MOPSO, fosfato, piperazina, piperidina, PIPES, POPSO, propionato, piridina, pirofosfato, succinato, TABS, TAPS, TAPSO, taurina (AES), TES, tricina, trietanolamina, Trizma.

Las sales son otro componente de un producto biofarmacéutico que pueden introducir interferencia de la matriz en la detección. Sales representativas incluyen sales de acetato, bencenosulfonato, benzoato, bicarbonato, bitartrato, bromuro, edetato de calcio, camsilato, carbonato, cloruro, citrato, dihidrocloruro, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gliceptato, gluconato, glutamato, glicilarsanilato, hexilresorcinato, hidrobromuro, hidrocloreuro, hidroxinaftoato, yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, metilsulfato, mucato, napsilato, nitrato, pamoato, pantotenato, fosfato/difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, sulfato, tannato, tartrato, teoclatato, tosilato, y trietiyoduro. También están incluidas las sales de metales alcalinos (especialmente de sodio y potasio), sales de metales alcalino-térreos (especialmente de calcio y de magnesio), sales de aluminio y sales de amonio, así como sales fabricadas de bases orgánicas fisiológicamente aceptables tales como trimetilamina, trietilamina, morfina, piridina, piperidina, picolina, dicitohexilamina, N,N'-dibenciletlenodiamina, 2-hidroxi-etilamina, bis-(2-hidroxi-etil)amina, tri-(2-hidroxi-etil)amina, procaína, dibencilpiperidina, dehidroabietilamina, N,N'-bisdehidroabietilamina, glucamina, N-metilglucamina, colidina, quinina, quinolina, y aminoácidos básicos tales como lisina y arginina.

Con frecuencia se añaden conservantes a productos biofarmacéuticos para alargar la vida útil. Una lista representativa incluye ácido ascórbico, ácido benzoico, bencil alcohol, cloruro de benzalconio, ácido eritórbito, ácido propiónico, ácido sórbico, ácido tiopropiónico, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ascorbato de calcio, propionato de calcio, sorbato de calcio, tiopropionato de dilaurilo, goma de guayaco, metilparabén, metabisulfito, m-cresol, parabén, bisulfito de potasio, metabisulfito de potasio, sorbato de potasio, galato de propilo, propilparabén, escorbato de sodio, benzoato de sodio, bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, propionato de sodio, sorbato de sodio, sulfito de sodio, cloruro estannoso, dióxido de azufre, tocoferoles.

Con el fin de disolver y mantener en disolución el API pueden añadirse solubilizantes al producto biofarmacéutico, pero estos solubilizantes también pueden causar interferencia de la matriz. PEG, Tween, CMC, y SDS son todas posibilidades de agentes usados como solubilizantes.

5 Los agentes quelantes también pueden ser una fuente de interferencia de la matriz e incluyen, pero no se limitan a, ácido cítrico, ácido tartárico, acetato de calcio, cloruro de calcio, citrato de calcio, diacetato de calcio, gluconato de calcio, hexametáfosfato de calcio, fosfato monobásico de calcio, fitato de calcio, fosfato de dipotasio, fosfato de disodio, citrato de isopropilo, ácido málico, citrato de monoisopropilo, citrato de potasio, citrato de sodio, diacetato de sodio, gluconato de sodio, hexametáfosfato de sodio, metafosfato de sodio, fosfato de sodio, pirofosfato de sodio, pirofosfato de tetrasodio, tartrato de sodio, tartrato de sodio y potasio, tiosulfato de sodio, tripolifosfato de sodio, citrato de estearilo, y etilendiamino tetraacetato de tetrasodio.

10 Con frecuencia se añaden ácidos y bases a los productos biofarmacéuticos para ajustar el pH o para aumentar la eficacia, pero su presencia es una fuente de interferencia de la matriz. Ácidos representativos incluyen ácido nítrico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido perclórico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido acético, ácido ascórbico, ácido bórico, ácido butanoico, ácido carbónico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido heptanoico, ácido hexanoico, ácido cianhídrico, ácido fluorhídrico, ácido láctico, ácido nitroso, ácido octanoico, ácido oxálico, ácido pentanoico, ácido fosfórico, ácido propanoico, ácido sulfuroso, y ácido úrico. Bases representativas incluyen hidróxido de litio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de magnesio, hidróxido de calcio, alanina, amoníaco, dimetilamina, etilamina, glicina, hidrazina, metilamina, y trimetilamina.

15 También pueden ser fuentes de interferencia de la matriz los azúcares, incluyendo glucosa (dextrosa), fructosa, galactosa, ribosa, sacarosa, lactosa, maltosa, trehalosa, celobiosa, arabitol, eritritol, glicerol, isomalta, lactitol, maltitol, manitol, sorbitol, y xilitol, proteínas tales como albúmina, y péptidos.

Un ejemplo de aminoácido usado como un excipiente es L-histidina.

Un ejemplo de proteína usada como un excipiente es albúmina de suero bovino (BSA).

20 La derivación del eluyente de la muestra implica canalizar la muestra lejos del espectrómetro de masas inmediatamente después de la etapa de cromatografía de líquidos en el método. El procedimiento de derivación continuará durante un período de tiempo preestablecido, basado en determinaciones experimentales previas. La muestra debe ser derivada inmediatamente antes del tiempo de retención conocido del primero de los compuestos extraíbles del patrón. El tiempo de derivación dependerá de los componentes del producto biofarmacéutico que se está ensayando, de la naturaleza de los compuestos extraíbles que probablemente estén presentes, y del tipo de dispositivo a partir del cual se originan los compuestos extraíbles.

25 Después de la etapa de derivación, la muestra de referencia restante se procesa por medio de un espectrómetro de masas para obtener un espectro de masas de referencia. El espectro de masas de referencia es la representación gráfica de la intensidad vs. m/z (relación masa a carga) de la muestra de referencia, esto es, la muestra que no contiene ningún compuesto extraíble procedente de la producción del producto biofarmacéutico. Los iones encontrados en el espectro de masas de referencia son debidos al patrón de compuestos extraíbles añadido a la muestra de referencia antes de la inyección en la LCMS.

30 Similarmente, la muestra de ensayo restante se procesa por medio de un espectrómetro de masas para obtener un espectro de masas de ensayo. El espectro de masas de ensayo es una representación gráfica de la intensidad vs. m/z (relación masa a carga) de la muestra de ensayo, esto es, el producto biofarmacéutico que ha estado en contacto con un recipiente o dispositivo de filtración, y, por lo tanto, puede contener compuestos extraíbles. El espectro de masas de la muestra de ensayo se compara con el espectro de masas de la muestra de referencia para detectar la presencia o ausencia de los compuestos extraíbles del filtro en la muestra de ensayo. Los iones, si se encuentran, del espectro de masas de ensayo son debidos a los compuestos extraíbles lixiviados del material durante la producción del producto biofarmacéutico.

35 El aspecto del o los picos en el cromatograma LC o en el espectro de masas de la muestra indica que está presente un compuesto extraíble. La detección de los compuestos extraíbles se consigue descubriendo la presencia de un pico o unos picos en el cromatograma LC o en el espectro de masas. La comparación del espectro de masas de la muestra de ensayo y el espectro de masas de la muestra de referencia indicará la presencia o ausencia de los compuestos extraíbles en la muestra de ensayo. Los picos que aparecen tanto en el espectro de masas de ensayo como en el de referencia se tomarán para indicar la presencia de los compuestos extraíbles del filtro en el producto biofarmacéutico. Los picos que sólo aparecen en el espectro de masas de referencia, pero no en el espectro de masas de ensayo, se tomarán para indicar la ausencia de los compuestos extraíbles del filtro en el producto biofarmacéutico.

Otra realización de este método es cuantificar, o determinar el número de compuestos extraíbles del filtro discretos así como la concentración a la cual están presentes los compuestos extraíbles totales en el producto biofarmacéutico. La etapa de cuantificación puede incluir la medida de las alturas de los picos en el cromatograma LC.

5 Ejemplos

Ejemplo 1: Aislamiento y detección de productos extraíbles del filtro

Tras un ciclo en el autoclave de 126°C durante 60 min, un filtro Durapore® de 25,4 cm y 0,22 mm se extrajo en agua Milli-Q® durante 24 h a temperatura ambiente. Durapore® y Milli-Q® son marcas comerciales registradas de Millipore Corporation, Billerica, MA. Se preparó un testigo usando agua Milli-Q® sin el filtro en las mismas condiciones. A continuación, las disoluciones se analizaron mediante un análisis del residuo no volátil, diluidas 10 veces usando agua Milli-Q® antes de la inyección en la LCMS.

En la FIG. 3 se muestran cromatogramas con los picos base de los compuestos extraíbles y del testigo. Cuando se comparan con el testigo, se encontró que los compuestos extraíbles contenían dos picos característicos del filtro Durapore®. El espectro de masas de las especies responsable de los dos picos vistos en el cromatograma de la FIG. 3 se representa en la FIG. 4. Los picos a M/Z 329 y 357 corresponden a compuestos que se sabe se originan a partir de los compuestos extraíbles del filtro. Los picos fueron tentativamente identificados como antioxidantes de tipo fenólico usados en el procedimiento de fabricación de la membrana. Puesto que estos compuestos existen en concentraciones extremadamente bajas, la LCMS proporciona el mejor modo para detectar su presencia.

Ejemplos 2 y 3: Aislamiento y detección de productos extraíbles del filtro en un producto biofarmacéutico

Se fortificaron productos tipo fármaco con un patrón de compuestos extraíbles en concentraciones de ppm. En la aplicación para moléculas grandes, se precipitan aminoácidos o proteínas del producto biofarmacéutico, y a continuación la muestra se inyecta en la LCMS. Al mismo tiempo, se prepararon los productos tipo fármacos sin fortificar de la misma manera antes de ser inyectados.

En la FIG. 5 (molécula pequeña) y en la FIG. 6 (molécula grande) puede verse la superposición de los cromatogramas del patrón de compuestos extraíbles, de un producto fármaco y del producto fármaco basado en moléculas pequeñas fortificado con el patrón de compuestos extraíbles. Los resultados demostraron que a pesar de la supresión de la matriz, los compuestos extraíbles pudieron ser detectados en presencia de los ingredientes del fármaco en las muestras fortificadas. Este método se aplicó a una amplia gama de ingredientes biofarmacéuticos y demostró que es sensible y robusto en la mayoría de las aplicaciones. El método permitió por primera vez la verificación de la presencia o ausencia de los compuestos extraíbles directamente en el producto biofarmacéutico. Por el contrario, ninguno de los métodos convencionales permite tal detección.

Aunque esta invención ha sido particularmente mostrada y descrita con referencias a sus realizaciones ejemplo, los expertos en la técnica entenderán que en la misma pueden hacerse varios cambios en la forma y en los detalles sin apartarse del alcance de la invención abarcada por la reivindicaciones adjuntas.

35

REIVINDICACIONES

1. Un sistema derivador para cromatografía de líquidos para reducir o eliminar componentes interferentes de la matriz en un producto biofarmacéutico en un sistema de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas, que comprende: una válvula de inyección de seis puertos;
- 5 Un puerto de la válvula de inyección de seis puertos de entrada del eluyente, estando el puerto de entrada del eluyente en conexión mediante un flujo de líquido con una columna de cromatografía de líquidos; y
 Un puerto de la válvula de inyección de seis puertos de salida al espectrómetro de masas, estando el puerto de salida al espectrómetro de masas en conexión mediante un flujo de líquido con un espectrómetro de masas;
- 10 Un medio para conmutar automáticamente la válvula entre una configuración de flujo a residuos y una configuración de flujo a la fuente, derivando la configuración de flujo a residuos un flujo completo desde el puerto de entrada del eluyente para que se dirija a residuos, y dirigiendo la configuración de flujo a la fuente el flujo completo desde el puerto de entrada del eluyente para que se dirija al espectrómetro de masas;
- 15 El sistema derivador que además comprende un bucle de flujo de calibración entre dos puertos adyacentes de la válvula de inyección de seis puertos, dirigiendo la configuración de flujo a residuos el flujo de un líquido de calibración a través del bucle de flujo de calibración y al espectrómetro de masas, y dirigiendo la configuración de flujo a la fuente el flujo del líquido de calibración a residuos y formando un bucle de flujo cerrado que incluye el bucle de flujo de calibración.
- 20 2. Un sistema derivador para cromatografía de líquidos según la reivindicación 1, donde el puerto de salida al espectrómetro de masas es un puerto de la válvula de inyección de seis puertos adyacente al puerto de entrada del eluyente.
3. Un sistema derivador para cromatografía de líquidos según la reivindicación 2, donde un puerto a residuos es un puerto adicional adyacente al puerto de entrada del eluyente.
4. Un sistema derivador para cromatografía de líquidos según la reivindicación 3, donde la configuración de flujo a residuos dirige el flujo completo desde el puerto de entrada del eluyente a residuos vía el puerto a residuos.
- 25 5. Un sistema derivador para cromatografía de líquidos según la reivindicación 1, donde la configuración de flujo a la fuente dirige el flujo completo desde el puerto de entrada del eluyente al espectrómetro de masas vía el puerto de salida al espectrómetro de masas.

FIG. 1A

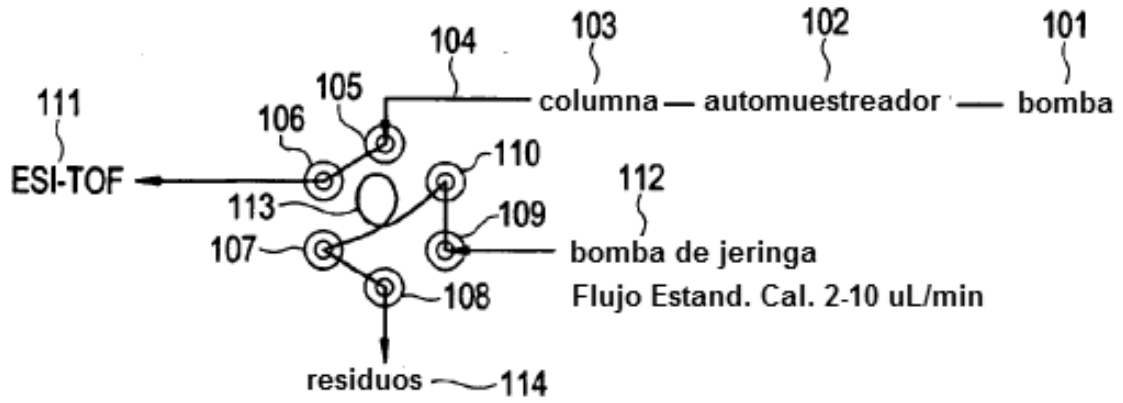


FIG. 1B

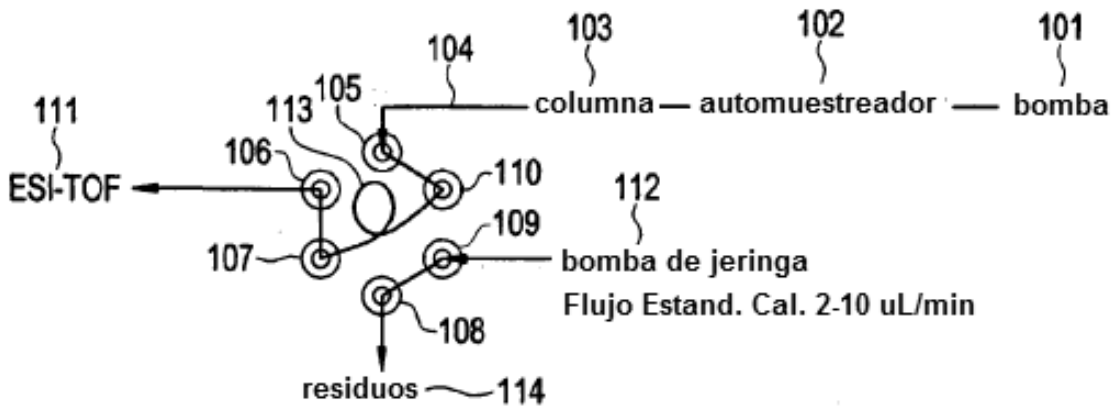


FIG. 2A

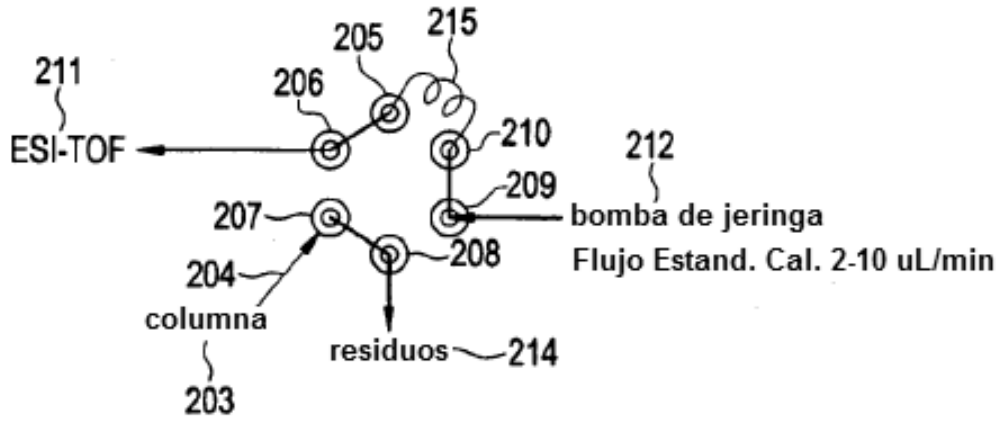
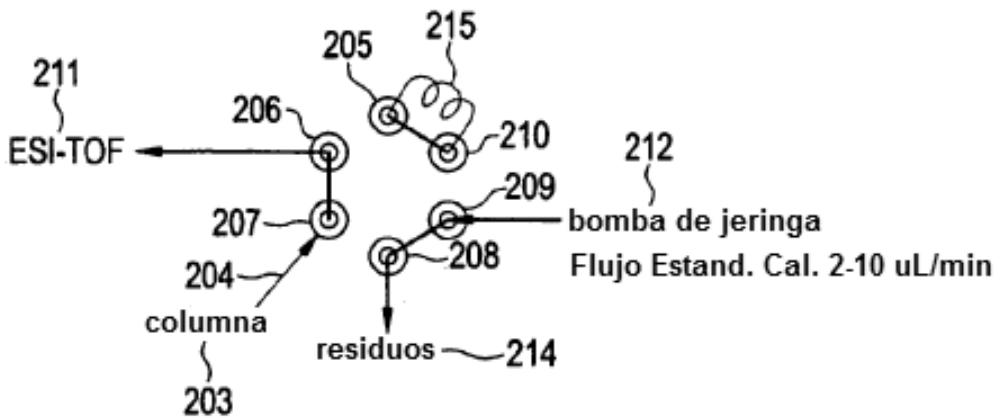


FIG. 2B



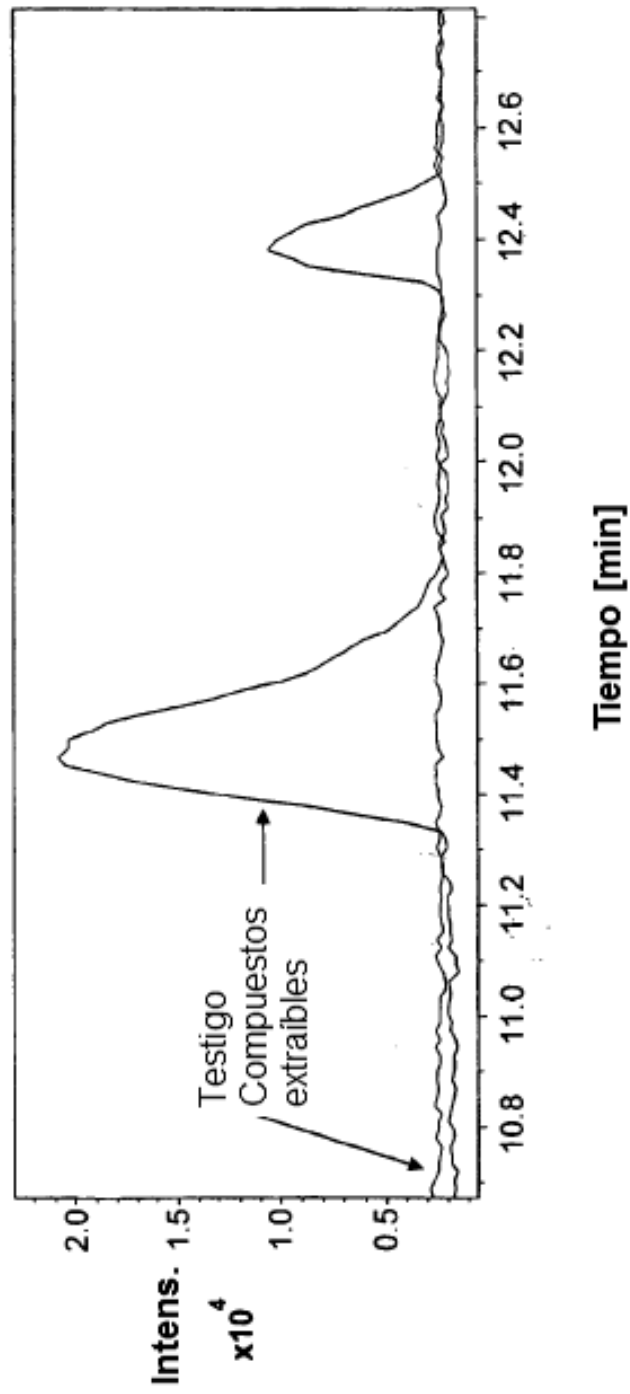
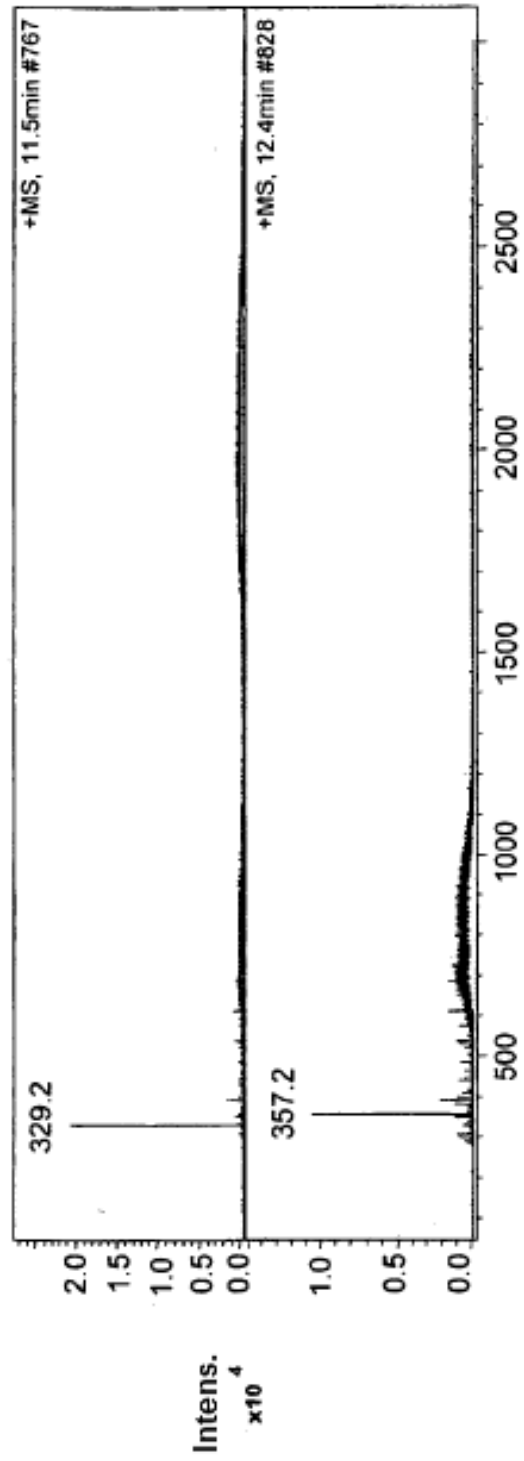


FIG. 3



m/z

FIG. 4

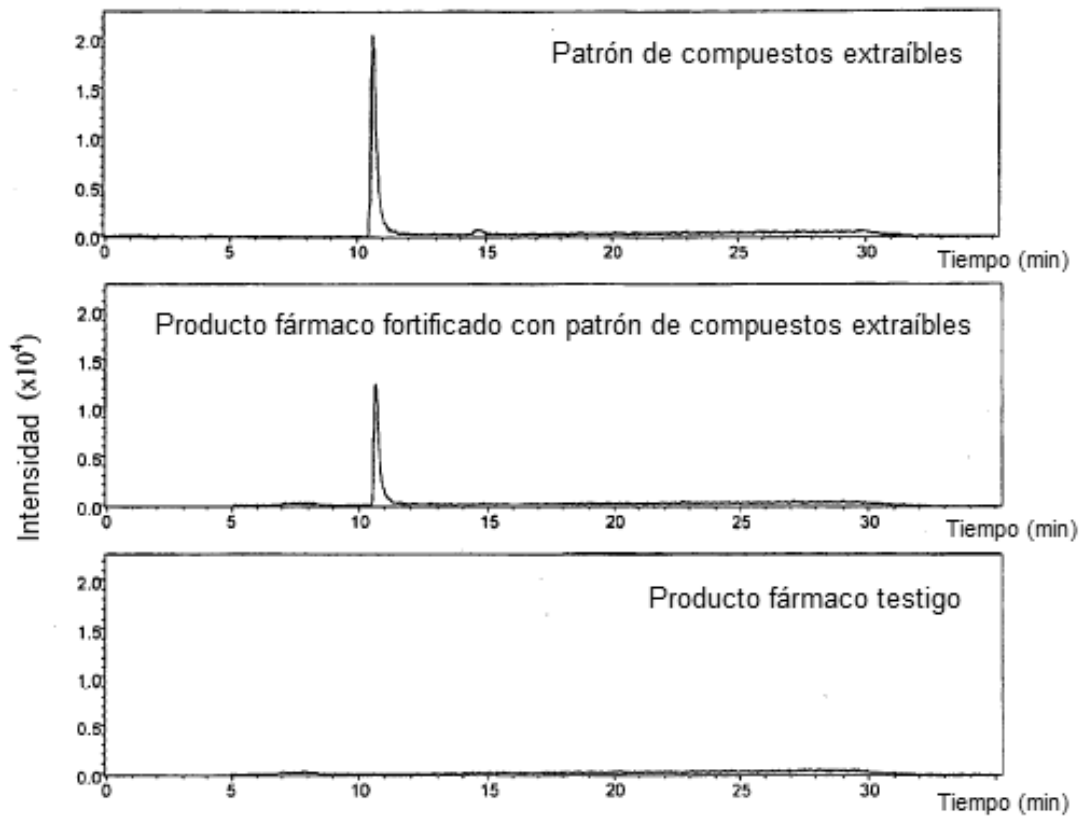


FIG. 5

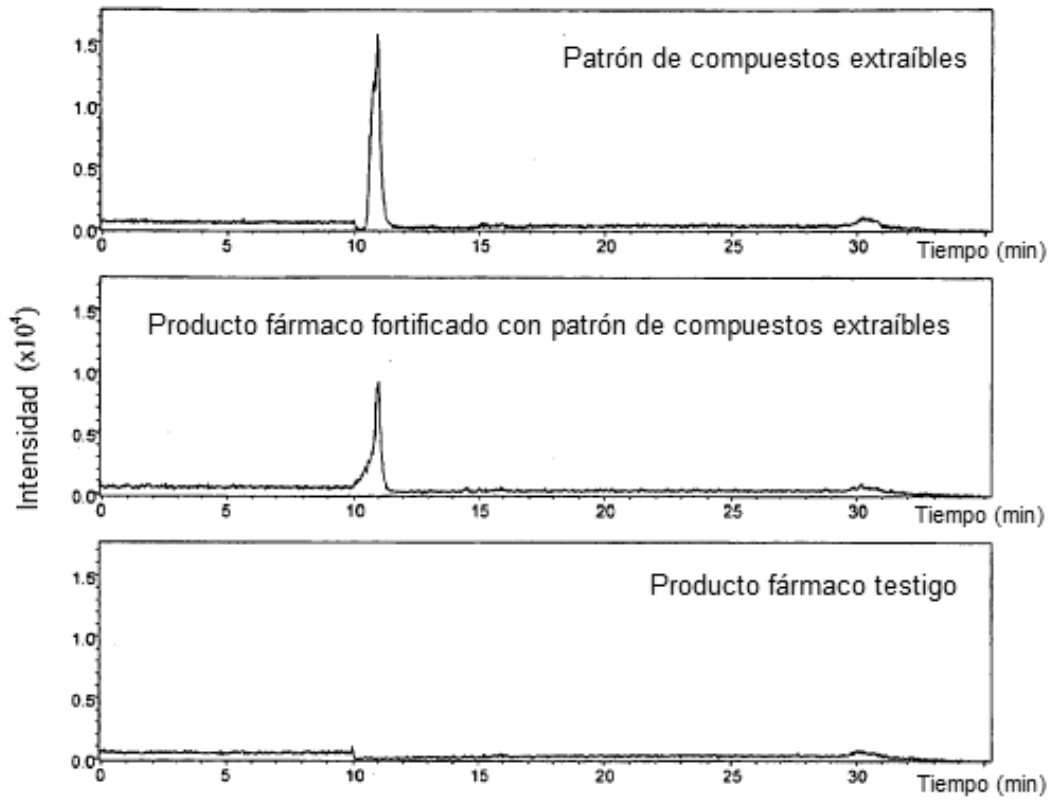


FIG. 6