

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 614**

51 Int. Cl.:

G01N 21/552 (2014.01)

G01J 3/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2013** **E 13745180 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016** **EP 2852828**

54 Título: **Procedimiento de determinación de una concentración de una especie de polisorbato en una mezcla**

30 Prioridad:

23.05.2012 US 201261650735 P

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

21.06.2016

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)
Rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

GBAGUIDI, BENEDICTE;
GERMAY, OLIVIER C. y
LARDAU, SONIA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 574 614 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

Procedimiento de determinación de una concentración de una especie de polisorbato en una mezcla

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de medición de polisorbatos, tales como polisorbato 80, usando espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (ATR-FTIR).

Antecedentes

10 Las técnicas que existen en la técnica para cuantificar polisorbatos, incluyen procedimientos basados en colorimetría, separación por HPLC, cromatografía de gases (GC) y GC con detección por espectroscopía de masas (MS). Sin embargo, puede darse una interferencia con tales procedimientos de ensayo debido a los constituyentes o condiciones presentes en las muestras de ensayo (interferencia de la matriz). Esto puede requerir una preparación específica de la muestra de ensayo, a veces compleja y que consume mucho tiempo.

Sumario de la invención

15 Un aspecto de la presente invención es un procedimiento para determinar la concentración de una especie de polisorbato en una mezcla que se sabe que contiene una única especie de polisorbato, obteniendo una muestra de ensayo de la mezcla, añadiendo un patrón interno a la muestra de ensayo, obteniendo un espectro de Reflectancia Total Atenuada (ATR) del infrarrojo medio de la muestra de ensayo, identificando a partir del espectro de reflectancia un número de onda correspondiente al pico C=O de dicha especie de polisorbato y un número de onda correspondiente al pico del patrón interno, calculando el área bajo la curva para el número de onda C=O (normalizada mediante el área del pico del patrón interno), y comparando dicha área normalizada con una curva de calibrado para determinar la concentración de dicha especie de polisorbato en la muestra de ensayo.

20 En una realización la muestra de ensayo comprende un antígeno, tal como un antígeno proteico o un antígeno polisacárido.

En una realización, la muestra de ensayo no se pretrata químicamente antes de obtener los espectros de reflectancia total atenuada del infrarrojo medio de la muestra de ensayo.

25 En una realización, el patrón interno es azida.

En una realización, la muestra de ensayo es de un componente de una vacuna a granel.

Breve descripción de los dibujos

30 La **Figura 1** es un ejemplo de un cromatograma de GC-MS en modo de monitorización del ion seleccionado (SIM) (el pico etiquetado como TIC: 25.D\data.ms 10,686 es polisorbato 80).

La **Figura 2** representa los modos vibracionales de los enlaces químicos. La localización de los modos vibracionales se da en términos de longitud de onda y frecuencia.

35 La **Figura 3** muestra los espectros de ATR-FTIR obtenidos de concentraciones conocidas de polisorbato 80 en solución (agua), normalizadas usando el patrón interno (región II), donde el eje X es el número de onda (cm^{-1}) y el eje Y es la absorbancia (absorbancia normalizada en unidades arbitrarias). La región del espectro (I) $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ = cadena alifática del polisorbato 80; la región (II) $2200 - 1980 \text{ cm}^{-1}$ = patrón interno añadido a la muestra; el pico de la región (III) a 1735 cm^{-1} = polisorbato 80 (C=O); el pico de la región (IV) a 1100 cm^{-1} = polisorbato 80 (C-O). Las áreas de los pico (I), (III) y (IV) aumentan en función de la concentración de polisorbato 80. Cada línea del gráfico representa un resultado promedio para una muestra, a partir de 32 escaneos.

40 La **Figura 4** muestra las curvas de calibrado obtenidas de las regiones (I), (III) y (IV) de la Figura 3, normalizadas usando la región II del patrón de azida. El área (eje Y) se expresa como unidades arbitrarias; el eje X es la concentración de polisorbato 80 ($\mu\text{g/ml}$).

Figura 5: Ejemplo de espectros de ATR-FTIR de una muestra de un CC-Gripe a granel, normalizada usando el patrón interno (región II). Debido a la complejidad de la matriz, solo el pico (III) de la Figura 3 puede usarse para identificar y cuantificar el polisorbato 80 en las muestras de CC-Gripe.

45 **Figura 6:** gráficos del área frente a concentración de polisorbato 80 de la región (I) y (III) de la Figura 5.

Figura 7A: representa los espectros del polisorbato 80 usando ATR-FTIR.

Figura 7B: representa la cuantificación del polisorbato 80 usando ATR-FTIR, donde las correlaciones de la respuesta de los picos no están normalizadas.

Figura 8A: representa los espectros del polisorbato 80 usando ATR-FTIR.

50 **Figura 8B:** representa la cuantificación del polisorbato 80 usando ATR-FTIR, donde los picos se normalizan usando azida como patrón interno.

La Figura 9 representa los espectros del polisorbato 80 de dos muestras obtenidas durante la purificación del CC-Gripe, donde la línea superior es una muestra tomada antes de la adición del polisorbato, y la línea inferior es una muestra tomada tras la adición del polisorbato durante el procesamiento.

Descripción detallada

- Los excipientes se añaden a menudo a formulaciones de productos farmacéuticos, incluyendo formulaciones de vacunas. Los tensioactivos, incluyendo polisorbatos, son excipientes comúnmente usados en las preparaciones de productos farmacéuticos y vacunas. Los tensioactivos (tales como polisorbatos) pueden, por ejemplo, ayudar a retener la actividad biológica de las proteínas mediante el mantenimiento de una estructura proteica específica durante el almacenamiento, transporte y entrega. Los tensioactivos también pueden ayudar a disminuir la adsorción de proteínas a las superficies (por ejemplo, viales y jeringas), a reducir la tensión superficial interfasial y a disminuir la tasa de desnaturalización de las proteínas (que puede conducir a la agregación de proteínas). Véase, por ejemplo, Khossravi y col., *Pharma Research*, 19(5):634 (2002); Loughheed y col., *Diabetes*, Vol. 32 (1983) 424-432.
- El polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60 y el polisorbato 80 son excipientes comunes de polisorbato usados en la formulación de productos biofarmacéuticos, incluyendo vacunas. Puede requerirse la cuantificación de los tensioactivos, así como otros ingredientes, en los productos médicos, biofarmacéuticos y biológicos por las agencias reguladoras.
- Se divulga en el presente documento un procedimiento de Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (ATR-FTIR) que cuantifica el polisorbato en formulaciones líquidas, incluyendo formulaciones de productos farmacéuticos que comprenden excipientes además de polisorbato.
- Procedimientos de cuantificación de polisorbatos**
- Se han descrito diversos procedimientos analíticos para la cuantificación de polisorbatos. Dichos procedimientos pueden incluir la preparación de la muestra en múltiples etapas, un potencial interferente en una matriz compleja y una falta de sensibilidad y especificidad.
- El polisorbato 20 y/u 80 pueden cuantificarse en base a la coloración azul de la especie de polisorbato que forma complejos con el reactivo de cobalto-tiocianato en un disolvente orgánico; la concentración de polisorbato 20 y/u 80 se determina mediante la absorción óptica. Zsolt y Gabor, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 18 (1998) 715-720; Hu y col., *J. Chromatogr. A*, 984 (2003) 233-236; Adamo y col., *J. Chromatogr. B*, 878 (2010) 1865-1870; Tani y col., *J. Chromatogr. A*, 786 (1997) 99-106.
- Fekete y col. describen un procedimiento de LC-CAD para la determinación cuantitativa de polisorbato 80, en base a su interacción con 5(p-dimetilaminobenciliden) rodanina (PDR) en medio alcalino (Fekete y col., *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 52 (2010) 672-679). El procedimiento usa la separación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y detección por aerosol cargado (CAD). Fekete y col. exponen que el procedimiento de LC-CAD es adecuado para la cuantificación del polisorbato 80 en el intervalo de 10-60 µg/ml en soluciones de proteínas.
- La cromatografía líquida de alta eficacia de exclusión por tamaño (SEC-HPLC) con detección por absorbancia ultravioleta (UV) emplea una fase móvil que contiene el tensioactivo que se determina a una concentración por encima de su concentración micelar crítica (CMC).
- La cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa (RP-HPLC) con detección por absorbancia UV tras la preparación de la muestra puede basarse en la hidrólisis ácida del éster de laurato de sorbitán seguido de una separación por RP-HPLC con detección por absorbancia UV del ácido láurico libre (relación molar 1:1). Zsolt y col., *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 18 (1998) 715-720. De modo alternativo puede usarse la hidrólisis básica del éster de laurato de sorbitán seguido de la separación por RP-HPLC con detección por absorbancia UV del ácido oleico libre. Hu y col., *J. Chromatogr. A*, 984 (2003) 233-236; Adamo y col., *J. Chromatogr. B*, 878 (2010) 1865-1870; Tracy y col., *AAPS J.*, 10 (S1) (2008) 647.
- La cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa (RP-HPLC) con detección evaporativa de dispersión de luz (ELSD) puede lograr la elución del polisorbato 80 como un único pico (coelución de todos los componentes de polisorbato). Nair y col., *J. Chromatogr. A*, 1012 (2003) 81-86; Hewitt y col., *J. Chromatogr. A*, 1215 (2008) 156-160; Adamo y col., *J. Chromatogr. B*, 878 (2010) 1865-1870; Hewitt y col., *J. Chromatogr. A*, 15:2138-45 (2011).
- La cromatografía de gases (GC) con detección por espectrometría de masas (MS) usa la hidrólisis ácida del éster de oleato de sorbitán seguido de la separación del metil éster de oleato por GC con detección por espectrometría de masas (MS). La preparación de la muestra implica un procedimiento de hidrólisis y a continuación una etapa de extracción. El polisorbato 80 se cuantifica frente al ácido pentadecanoico como patrón interno (Oliveira y col., *Talanta* Vol. 69 (2006) 1278-1284).
- Otros procedimientos analíticos para la cuantificación de polisorbatos pueden incluir cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de fluidos supercríticos (SFC), análisis por fluorescencia con fraccionamiento de colorantes fluorescentes de N-fenil-1-naftilamina en el núcleo hidrófobo de micelas formadas por polisorbato, cuantificación de los componentes ácidos del polisorbato por RP-HPLC tras la reacción de derivatización con 2-nitrofenilhidrazona, caracterización de polisorbatos usando espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz y tiempo de vuelo (MALDI-TOF-MS) y cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas (MS).

La patente EP 1 382964 A describe un procedimiento para determinar la concentración de una especie de polisorbato en una mezcla, comprendiendo el procedimiento obtener una muestra de ensayo de la mezcla, añadir un reactivo de tiocianato de amonio/nitrato de cobalto a la muestra de ensayo y cuantificar el complejo cobalto tiocianato resultante mediante mediciones de la absorbancia con un espectrofotómetro.

- 5 Wenger y col., Analytical Biochemistry, 337 (2005), 48-54 describen un procedimiento para determinar la concentración de una especie de polisorbato en una mezcla, comprendiendo el procedimiento: obtener una muestra de ensayo de la mezcla; añadir 5-dodecanoilamino fluoresceína (DAF) a la muestra de ensayo; y cuantificar las concentraciones de polisorbato por encima de una concentración micelar crítica mediante la detección de un aumento de la polarización de la fluorescencia debido a la inserción de DAF en las micelas de polisorbato.
- 10 La patente de Estados Unidos US 2005/0287675 A describe un procedimiento para determinar una relación de aglutinante agente de curado de un producto fibroso, comprendiendo el procedimiento: obtener, con un espectrómetro de ATR-FTIR, un espectro del infrarrojo medio del producto, identificar, a partir del espectro, un número de onda correspondiente al pico C=O del grupo ácido carboxílico en el aglutinante y un número de onda correspondiente al pico C=O del grupo éster en el aglutinante y calcular una relación de los valores de absorbancia a dichos números de onda.

Espectroscopía IR

- La espectroscopía vibracional infrarroja (IR) identifica las moléculas analizando sus enlaces químicos, que vibran a una frecuencia característica. La radiación de luz de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, el infrarrojo medio, comúnmente se usa como la región infrarroja del espectro que abarca las frecuencias fundamentales de la mayoría de las vibraciones moleculares. En una molécula, los movimientos de estiramiento y plegado de un componente (por ejemplo CH_2) dan como resultado múltiples modos de oscilación. Las oscilaciones que provocan un cambio en el dipolo en la molécula dan como resultado la absorción de un fotón con la misma frecuencia. Un espectro de las frecuencias de absorción en una muestra puede registrarse y usarse para detectar y cuantificar los grupos químicos presentes en la muestra.

Reflectancia total atenuada (ATR)

- 25 La Reflectancia Total Atenuada (ATR) es una técnica de muestreo usada con espectroscopía infrarroja. Una muestra de ensayo se pone en contacto con un cristal de ATR (de modo alternativo denominado como Elemento de Reflexión Interna (ERI)). Cuando se ensayan las muestras líquidas, se extiende una capa superficial (delgada) sobre el cristal de ATR. Un haz de radiación incidente (luz infrarroja) se dirige en el cristal de ATR a un ángulo predeterminado. El haz pasa a través del cristal de ATR de manera que se refleja internamente de manera total en el límite entre el ERI y la muestra de ensayo. La reflectancia interna crea una onda evanescente que se extiende solo unos pocos micrómetros más allá de la superficie del cristal de ATR en la muestra, y algo de la energía de la radiación incidente se absorbe por la muestra de ensayo. La onda evanescente por consiguiente se atenúa o altera en las regiones del espectro infrarrojo donde la muestra absorbe energía. La intensidad de la radiación reflejada internamente se disminuye para las longitudes de onda donde la muestra absorbe energía, y la cantidad de absorción en puntos específicos puede usarse para cuantificar la cantidad de moléculas específicas en la muestra de ensayo. La radiación reflejada, por lo tanto, incluye información a partir de la que puede adquirirse un espectro de absorción para la muestra de ensayo. La energía atenuada sale del cristal de ATR, a un detector en el espectrómetro de IR. El sistema genera un espectro infrarrojo (espectros de reflexión interna o espectros de reflexión total atenuada (ATR)).
- 40 Debido a la profundidad limitada de penetración de la onda evanescente en la muestra, las muestras de ensayo se colocan en contacto estrecho con el cristal de ATR; esto puede lograrse usando muestras líquidas. El tipo de cristal de ATR usado define su índice de refracción, el intervalo de transmisión infrarrojo y las propiedades químicas de la ERI. La profundidad de la penetración puede controlarse alterando el ángulo de incidencia del haz IR entrante con respecto al ERI o cambiando el índice de refracción del cristal de ATR.

Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

- La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se basa en la absorción de la luz infrarroja por las moléculas. Las moléculas solo absorben la luz infrarroja a frecuencias que afectan el momento dipolar de la molécula; esto provoca la excitación a estados vibracionales más altos. Las moléculas monoatómicas (He, Ne, etc.) y diatómicas homopolares (H_2 , O_2 , etc.) no absorben luz infrarroja.
- 50 La espectroscopía FTIR obtiene un espectro infrarrojo de absorción mediante una muestra sólida, líquida o gaseosa. Un algoritmo matemático (transformada de Fourier) se usa para convertir los datos brutos en un espectro. En la espectroscopía FTIR, un haz que comprende frecuencias diferentes de luz se dirige a la muestra, y se toman las mediciones de absorción a diferentes longitudes de onda. Todas las frecuencias ópticas se observan simultáneamente, durante un periodo de tiempo conocido como tiempo de escaneo. El haz se cambia (por ejemplo, usando un interferómetro de Michelson, como se conoce en la técnica) para contener una combinación diferente de frecuencias y las mediciones se toman de nuevo. Esto se repite para proporcionar muchos puntos de datos (datos brutos) que se usan para calcular la absorción a longitudes de onda particulares.

Por consiguiente, en la ATR-FTIR, se determinan los cambios que ocurren en un haz infrarrojo en el límite del ERI y la muestra de ensayo. Cuando se trata de espectros del infrarrojo medio, el número de onda (centímetro^{-1}) se usa comúnmente en lugar de la longitud de onda, debido a que el número de onda es proporcional a la energía y la frecuencia de la radiación.

- 5 La profundidad de la penetración de la energía infrarroja en la muestra es dependiente de la longitud de onda. A medida que la longitud de onda de la radiación infrarroja aumenta, la profundidad de la penetración aumenta. Dicho de forma alternativa, la profundidad de la penetración aumenta a medida que el número de onda disminuye. Esto provoca que las intensidades relativas de las bandas en el espectro de ATR aumenten con la disminución del número de onda cuando se comparan con un espectro de transmisión de la misma muestra. Este fenómeno puede
10 corregirse matemáticamente mediante un programa, incluyendo paquetes de programas de FTIR disponibles en el mercado.

- En la ATR-FTIR la marca de la intensidad del espectro de incidencia retornante, junto con la ley de Beer, se usan para identificar y cuantificar compuestos. La ley de Beer subyace del análisis de datos de FTIR. Se establece que para una longitud de trayectoria constante, la intensidad de la energía de la luz incidente (directa) que atraviesa un
15 medio absorbente disminuye exponencialmente con la concentración. Las operaciones matemáticas y estadísticas del presente procedimiento pueden realizarse usando cualquier equipo computacional adecuado. El espectrómetro puede tener la capacidad de almacenar los espectros IR recogidos (datos) y llevar a cabo la manipulación matemática de los datos. Un ordenador personal disponible en el mercado puede usarse para iniciar el programa para la adquisición de los datos, el cálculo de las diferencias en los espectros, y los análisis espectrales y otros
20 análisis. Los ordenadores conectados con un instrumento de FTIR pueden emplearse para adquirir los datos en un análisis, mientras los análisis se llevan a cabo en otro. La adquisición adecuada de los datos y los paquetes de los programas de operación pueden escribirse *de novo* o pueden adquirirse. Los paquetes de programas disponibles en el mercado adecuados para su uso en la presente invención incluyen el programa OPUS (Bruker Optics, Alemania); y Matlab (Mathworks Inc., Estados Unidos) pueden personalizarse para su uso en este procedimiento. Existen
25 muchas técnicas de clasificación multivariantes adecuadas para su uso con los datos espectrales IR incluyendo, pero sin limitación, metodologías de cuantificación tales como mínimos cuadrados parciales, análisis de componentes principales (PCA) o regresión de componentes principales (PCR). Un espectro IR procesado puede formarse de diversos espectros IR brutos (por ejemplo, por múltiples escaneos en un intervalo de longitudes de onda y usando técnicas de promedio conocidas en la técnica).
- 30 Oliveira y col. describen la evaluación del contenido de ésteres en biodiesel usando FTIR en base a la vibración de estiramiento del C=O de los grupos éster (Oliveira y col., Talanta Vol. 69 (2006) 1278-1284). La Patente de Estados Unidos n.º 7.255.835 describe un procedimiento en un único paso de ATR-FTIR para su uso en la determinación de la estructura secundaria de proteínas.

Adquisición del espectro IR

- 35 Los detalles específicos para la recogida y el análisis de un espectro IR usando la ATR-FTIR varían con el equipo específico usado, pero generalmente comprenden la irradiación de un ERI, que está en contacto con una muestra de ensayo líquida, con la radiación IR y la monitorización de la radiación reflejada desde el ERI. Los datos de reflexión pueden almacenarse en un medio adecuado y/o exponerse en la pantalla de un ordenador o en papel milimetrado.

- Un espectro adquirido usando los aparatos y procedimientos de la presente invención puede comprender una señal
40 del disolvente de la muestra; puede llevarse a cabo una resta del fondo (resta matemática) donde se conoce el disolvente. Los componentes biológicos, tales como proteínas, glicoproteínas, o polisacáridos, pueden estar en los disolventes que comprenden agua o un tampón acuoso. Un tampón acuoso puede comprender compuestos además de agua. El tampón fosfato salino (PBS), tris(hidroximetil) aminometano, HEPES (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) y otros compuestos se usan comúnmente para tamponar soluciones que comprenden
45 moléculas biológicas, tales como antígenos polipeptídicos. La resta del componente tampón puede lograrse restando matemáticamente el espectro del tampón (obtenido en ausencia de una muestra) del espectro de la muestra en presencia del tampón.

Las operaciones de resta del fondo pueden llevarse a cabo a medida que se necesite retirar otras señales del fondo, tales como las del cristal de ATR limpio.

- 50 Las operaciones matemáticas de resta espectrales pueden llevarse a cabo en un sistema de ordenador; la operación de resta puede comprender un algoritmo que identifica (o permite a un usuario identificar) las regiones de un espectro compuesto para la resta. Tras identificar las regiones a restarse, la resta se lleva a cabo para generar una diferencia en el espectro resultante. La diferencia en el espectro puede estar presente gráficamente o tabulada en función de la absorbancia a una longitud de onda dada y presente en forma de tabla.

- 55 Presente procedimiento

El presente procedimiento de cuantificación de polisorbato mediante ATR-FTIR se basa en la detección y cuantificación del enlace carbonilo (C=O) del polisorbato. Este enlace está presente en cada polisorbato 80,

polisorbato 60, polisorbato 40 y polisorbato 20. Por consiguiente el presente procedimiento es útil en la cuantificación de cualquier polisorbato 80, polisorbato 60, polisorbato 40 y polisorbato 20. De acuerdo con la presente invención, la muestra contiene solo una única especie de polisorbato (por ejemplo, contiene solo polisorbato 80).

5 Incluso cuando se coloca la misma cantidad de muestra en la ATR, la cantidad precisa de la muestra retenida en el elemento de la ATR puede variar, por consiguiente el presente procedimiento usa una curva de calibrado creada con un patrón interno, para normalizar la cantidad de muestra retenida en la ATR.

10 El presente procedimiento permite la determinación de la concentración de polisorbato en una muestra de ensayo líquida mediante la técnica espectroscópica ATR-FTIR sin el pretratamiento químico de la muestra. Los presentes inventores han utilizado un ERI de diamante para obtener los espectros de FTIR del polisorbato 80. Para crear una curva de calibrado, e identificar los picos específicos de interés, los presentes inventores han usado un conjunto de calibrado que consiste en polisorbato 80 en H₂O, en concentraciones de 20 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml y 500 µg/ml. Se ha encontrado que el área del pico (C=O) de cada espectro a 1735 cm⁻¹, cuando se normaliza usando un patrón interno (azida) se correlaciona linealmente con los contenidos de polisorbato 80 (R²>0,99). Los resultados obtenidos del procedimiento de ATR-FTIR se han confirmado mediante el procedimiento de detección por cromatografía de gases con espectrometría de masa (GC-MS).

15 Los ejemplos proporcionados en el presente documento demuestran un procedimiento de ATR-FTIR para la determinación de una concentración de polisorbato en muestras de ensayo de mezclas complejas que contienen componentes de polipéptidos (los ejemplos proporcionados en el presente documento han utilizado muestras de virus de la gripe a granel purificado producido en un cultivo celular (CC-Gripe)). Será evidente para los expertos en la materia que la muestra usada para la cuantificación debe ser representativa de la que se obtiene a granel.

20 El presente procedimiento para la cuantificación de polisorbato en una formulación, incluyendo formulaciones que comprenden componentes de antígenos, utiliza procedimientos que serán evidentes para los expertos en la materia de espectroscopía tras la consideración de la presente divulgación. El equipo útil en el presente procedimiento incluye, pero sin limitación, un ATR ERI y un espectrómetro de FTIR, y un equipo y programa de procesamiento de datos apropiado. Los detalles específicos del procedimiento se rigen por los parámetros del equipo y la naturaleza del experimento, pero se describe una metodología general en el presente documento. Adicionalmente, la metodología divulgada puede adaptarse a las diversas propiedades de la muestra en estudio y a otras consideraciones experimentales pertinentes.

25 Una realización de la presente invención proporciona un procedimiento de ATR-FTIR para cuantificar polisorbato en una muestra. En una realización la muestra comprende un polipéptido y/o una proteína en un líquido (una muestra líquida), tal como polipéptidos y/o proteínas en agua (una muestra acuosa). En una realización el polipéptido es un antígeno polipeptídico.

30 Una realización de la presente invención proporciona un procedimiento de ATR-FTIR para cuantificar polisorbato en una muestra, en donde la muestra comprende un polisacárido, tal como un antígeno polisacárido. En una realización la muestra comprende un polisacárido en un líquido (una muestra líquida), tal como polisacáridos en agua (una muestra acuosa). En una realización el polisacárido es un antígeno polisacárido.

35 En una realización la muestra de ensayo es de una vacuna (incluyendo vacunas monovalentes a granel, así como formulaciones finales de vacunas, incluyendo formulaciones de vacunas polivalentes); en una realización adicional la muestra de ensayo es de una vacuna que comprende un antígeno de un organismo seleccionado del virus de la gripe, virus del sarampión, virus de las paperas, virus de la varicela (*chickenpox*), virus de la rubéola, virus herpes, virus de la polio, virus de la viruela, poxvirus, virus del papiloma humano (VPH), virus de la encefalitis japonesa, virus de la hepatitis tales como la HepA o HepB, rotavirus, virus del dengue, virus sincitial respiratorio (VSR), citomegalovirus (CMV), *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, *Bordetella pertussis*, *Haemophilus influenzae*, *Salmonella typhi*, una especie de *Streptococcus*, una especie de *Corynebacterium*, una especie de *Clostridium*, una especie de *Salmonella* y una especie de *Bordetella*.

40 En una realización, se sabe que la muestra comprende una única especie de polisorbato seleccionado de polisorbato 80, polisorbato 60, polisorbato 40 y polisorbato 20. Cuando una única especie de polisorbato está presente en la muestra, los resultados proporcionan una medición de la concentración de esta especie de polisorbato. La cantidad de muestra debe ser suficiente para proporcionar una capa delgada de la muestra en el ERI.

45 En una realización de la presente invención, el procedimiento emplea una técnica de muestreo para la ATR y la espectroscopía FTIR en un único paso.

50 En una realización, el procedimiento comprende: (a) proporcionar una muestra que comprende una única especie de polisorbato y un patrón interno; (b) proporcionar un elemento de reflexión interna (ERI); (c) poner en contacto la muestra con el ERI para formar una interfase de muestra-ERI; (d) usar un dispositivo de FTIR, o un dispositivo que contiene ópticas de enfoque para permitir la utilización de la radiación FTIR, para dirigir un haz de radiación infrarroja (IR) a través del ERI en condiciones tales que la radiación IR interactúa con la interfase de muestra-ERI; (e) registrar

el perfil de reflectancia en el intervalo de frecuencias de $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$; (f) recopilar el perfil de absorbancia de la muestra en una base de datos informática, (g) generar un espectro IR de la muestra en el intervalo de frecuencias de $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$ y (h) calcular el área (área bajo la curva) del pico a 1735 cm^{-1} ; determinando la concentración de polisorbato en dicha muestra en referencia a una curva de calibrado.

5 En una realización, se establece una curva de calibrado para cada conjunto de experimentos o muestra ensayada. En una realización se establece una única curva de calibrado y se usa para múltiples muestras, donde las muestras son de mezclas preparadas mediante el mismo procedimiento. En una realización se establece y se usa una curva de calibrado para múltiples muestras, donde las muestras son de mezclas preparadas mediante el mismo procedimiento, por un periodo de tiempo establecido.

10 Cuando solo se detecta la presencia de una especie de polisorbato (y no la cantidad), no se requiere una curva de calibrado.

La especificidad del procedimiento para una matriz particular (por ejemplo, un componente de la vacuna particular) puede demostrarse usando muestras de la matriz añadida a concentraciones conocidas de polisorbato.

15 En una realización, el patrón interno es azida, y se genera un espectro IR de la muestra en el intervalo de frecuencias de $2200 - 1980 \text{ cm}^{-1}$.

En una realización adicional, el patrón interno es azida, y se genera un espectro IR de la muestra que comprende la frecuencia de 1735 cm^{-1} .

20 En una realización, la muestra de ensayo no se pretrata en una manera que altere la estructura química del polisorbato ("Pretratamiento químico" o "pretratado químicamente"), por ejemplo, el polisorbato no forma complejos con el cobalto-tiocionato, derivatizado, transesterificado, transbencilado, tratado para producir un derivado éster y/o hidrolizado. Tal como se usa en el presente documento, la adición de un patrón interno que no altere la estructura química del polisorbato no se considera "pretratamiento químico".

En una realización, se añade un patrón interno a la muestra de ensayo. En una realización, el patrón interno es azida (anión lineal que es isoeléctrico con CO_2).

25 En una realización, el presente procedimiento de espectroscopía ATR-FTIR para la cuantificación de polisorbato puede usarse para formulaciones líquidas que contienen (a) moléculas de proteína, y/o (b) excipientes además de un polisorbato (excipientes no polisorbato). En una realización, el presente procedimiento de espectroscopía ATR-FTIR para la cuantificación de polisorbato puede usarse para formulaciones líquidas que contienen (a) moléculas de polisacárido, y/o (b) excipientes además de un polisorbato (excipientes no polisorbato). Tales excipientes no
30 polisorbato incluyen detergentes a parte de polisorbato, por ejemplo, TRITON™ X-100 (4-(1,1,3,3-tetrametilbutil) fenil-polietilenglicol, *t*-Octilfenoxipolietoxietanol, éter *terc*-octilfenílico de polietilenglicol; disponibles de Sigma Aldrich, St. Louis, MS) y succinato de vitamina E (SVE).

35 En una realización de la presente invención, el procedimiento de adquisición de un espectro de una muestra se automatiza usando paquetes adecuados de programas disponibles en el mercado para la adquisición automatizada del espectro.

En otra realización, la presente invención se automatiza completamente y puede comprender un inyector automático para inyectar y retirar muestras y un paquete de programas de adquisición del espectro para poner en marcha un espectrómetro de FTIR.

Términos

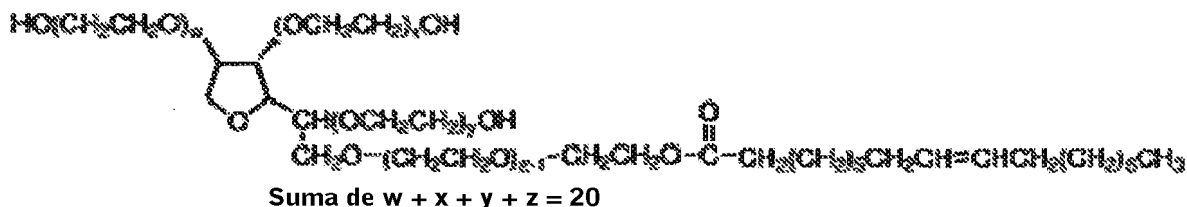
40 A menos que se explique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece esta descripción. Las definiciones de los términos comunes en biología molecular pueden encontrarse en Benjamin Lewin, Genes V, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew y col. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A.
45 Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Los polisorbatos se derivan del sorbitán pegilado (un derivado del sorbitol) esterificado con ácidos grasos. Las especies de polisorbato incluyen polisorbato 20 (monolaurato de sorbitán polioxietilenado (20)), polisorbato 40 (monopalmitato de sorbitán polioxietilenado (20)), polisorbato 60 (monoestearato de sorbitán polioxietilenado (20)) y
50 polisorbato 80 (monooleato de sorbitán polioxietilenado (20)). La designación numérica que sigue al "polisorbato" se refiere al grupo lipófilo (monolaurato (20), monopalmitato (40), monoestearato (60) y monooleato (80)). El número veinte (20) que sigue a "polioxietilenado" se refiere al número total de grupos oxietileno en la molécula. Los polisorbatos se clasifican como tensioactivos no iónicos. Los nombres comerciales para los polisorbatos incluyen ALKEST™ y TWEEN™.

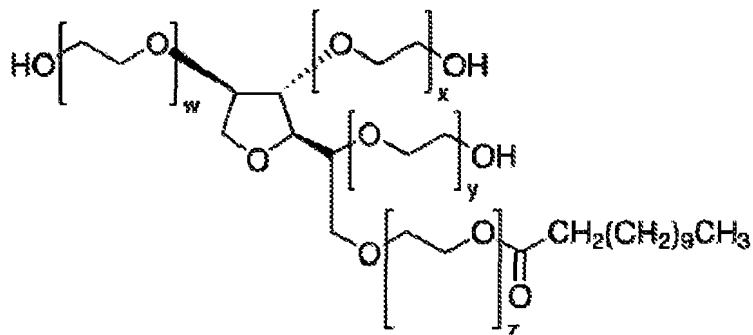
55

El polisorbato 80 es un tensioactivo y emulsionante no iónico; los nombres comerciales incluyen Alkest TW 80, Canarcel y TWEEN™ 80. El polisorbato 20 es un tensioactivo y emulsionante no iónico; los nombres comerciales incluyen Alkest TW 20 y TWEEN™ 20. El polisorbato 40 es un tensioactivo y emulsionante no iónico; los nombres comerciales incluyen TWEEN™ 40. El polisorbato 60 es un tensioactivo y emulsionante no iónico; los nombres comerciales incluyen TWEEN™ 60. Las estructuras del polisorbato 80 y del polisorbato 20 se muestran a continuación.

Polisorbato 80 (la suma de w, x, y y z es 20):



Polisorbato 20 (la suma de w, x, y y z es 20):



Las especies de polisorbatos, incluyendo polisorbato 80, polisorbato 60, polisorbato 40, polisorbato 20 y las combinaciones de los mismos, se usan como excipientes en formulaciones médicas, incluyendo vacunas, incluyendo vacunas para proporcionar protección contra la gripe, la infección por el virus del papiloma humano (HPV), encefalitis japonesa, enfermedad por neumococo, hepatitis (HepB) y enfermedad por rotavirus; también combinaciones de vacunas tales como DTaP (difteria, tétanos y tos ferina), DTaP/Hib (DTaP más *Haemophilus influenzae B*), DTaP/IPV (DTaP más virus de la polio atenuado), y DTaP-HepB-IPV.

Las vacunas de la gripe se preparan en diversos sustratos. Muchas vacunas en el mercado se preparan usando huevos de gallina. Más recientemente, las vacunas de la gripe se han desarrollado usando líneas celulares tales como la línea celular de riñón canino Madin-Darby (MDCK), línea celular MRC-5 (pulmón fetal humano), línea celular Vero (células epiteliales de riñón de mono verde africano), línea celular de ovario de hámster chino (CHO), línea celular EB66® y línea celular PER.C6® (ser humano, Crucell (Países Bajos)). La línea celular EB66® es una línea celular de pato disponible en el mercado derivada de células madre embrionarias (Vivalis, Nantes, Francia) y usada para el crecimiento y producción de componentes de vacunas, incluyendo la producción de virus usados en la fabricación de vacunas virales, incluyendo virus de la gripe. Las células EB66® son susceptibles a la infección por muchos virus, incluyendo virus de la gripe aviar. Los procedimientos alternativos de la producción de componentes de vacunas incluyen crecimiento en huevos embrionados de pollo y fibroblastos del embrión de pollo (CEF) primarios.

Como se usa en el presente documento, una formulación (o solución) que contiene (o comprende) un componente proteico (o un polipéptido) puede ser una composición médica, tal como una composición biofarmacéutica, tal como una vacuna terapéutica o una vacuna profiláctica, o una composición que comprende un anticuerpo, un anticuerpo monoclonal, o una parte de unión al antígeno del mismo.

Como se usa en el presente documento, una formulación (o solución) que contiene (o comprende) un componente polisacárido puede ser una composición médica, tal como una composición biofarmacéutica, tal como una vacuna terapéutica o una vacuna profiláctica.

Como se usa en el presente documento una vacuna puede ser una diseñada y destinada a la administración a un mamífero humano o no humano. La vacuna puede ser profiláctica, para proporcionar protección contra una enfermedad (reducir la posibilidad de contraer la enfermedad), o terapéutica (para tratar una enfermedad al disminuir los síntomas, severidad, duración, o riesgo de recurrencia de la enfermedad). La vacuna puede ser una vacuna contra el cáncer. La vacuna puede ser monovalente o polivalente.

Como se usa en el presente documento una vacuna puede comprender antígenos obtenidos de un virus, incluyendo pero sin limitación: virus de la gripe, virus del sarampión, virus herpes, virus de la polio, virus de la viruela, poxvirus, virus del papiloma humano (VPH), virus de la encefalitis japonesa, virus de la hepatitis tal como HepB y rotavirus.

- 5 Como se usa en el presente documento una vacuna puede comprender antígenos obtenidos de una especie bacteriana, incluyendo pero sin limitación: *Streptococcus pneumoniae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, *Bordetella pertussis* y *Haemophilus influenzae*.

Como se usa en el presente documento, BPFa significa buenas prácticas de fabricación actuales.

- 10 Como se usa en el presente documento, “componentes de una vacuna a granel” o “a granel” se refiere a un principio activo de la vacuna contenido, o almacenado en, un volumen mayor que el volumen de la vacuna acabada. La concentración del principio activo de la vacuna a granel es normalmente mayor que la concentración del principio activo en la vacuna acabada. Un producto a granel es un producto intermedio en la fabricación comercial de las vacunas. Un producto a granel puede ser univalente (monovalente), es decir, que contiene un antígeno purificado, bivalente, o multivalente. Un producto a granel puede contener el antígeno purificado en diferentes concentraciones a las que estarán presentes en una formulación final de la vacuna (para el uso clínico o venta comercial). En una realización, el producto a granel contiene al menos un antígeno de la proteína del virus de la gripe, por ejemplo, un antígeno de neuraminidasa (NA) o de hemaglutinina (HA). El producto a granel puede contener antígenos derivados de una cadena de un patógeno, o de múltiples cadenas de un patógeno. Las formulaciones de la vacuna final puede comprender múltiples antígenos (vacunas polivalentes), es decir, pueden ser una mezcla a granel de monovalentes múltiples, y pueden comprender antígenos de múltiples patógenos o múltiples cadenas de un patógeno. Los productos a granel pueden almacenarse hasta que se necesiten para la preparación final de las dosis de vacuna. Las vacunas pueden estar en la forma de un líquido, un líquido con adyuvante, o liofilizadas.

Como se usa en el presente documento, una muestra es una parte representativa de un volumen mayor. La muestra puede ser de una mezcla, tal como un líquido que comprende elementos no líquidos. La muestra puede ser una muestra acuosa.

- 25 Como se usa en el presente documento, una mezcla comprende al menos dos elementos diferentes, por ejemplo, una mezcla comprende moléculas de una especie de polipéptido y moléculas de una especie de polisorbato. La mezcla puede estar en forma sólida o en forma líquida.

- 30 Como se usa en el presente documento, los términos “péptido”, “polipéptido” y “proteína” se intercambian y significan un polímero de aminoácidos, independientemente de su tamaño. Aunque “proteína” se usa a menudo en referencia a polipéptidos relativamente grandes, y “péptido” se usa a menudo en referencia a polipéptidos pequeños, el uso de estos términos en la técnica se solapa y varía. El término “polipéptido” tal como se usa en el presente documento se refiere a péptidos, polipéptidos y proteínas, a menos que se indique lo contrario. Como se usa en el presente documento, los términos “proteína”, “polipéptido” y “péptido” se refieren tanto a los productos génicos expresados como a entidades sintetizadas químicamente, y abarcan glicoproteínas y toxinas de proteínas inactivadas (toxoides).

- 35 Como se usa en el presente documento un antígeno se refiere a una sustancia, incluyendo péptidos y proteínas (incluyendo glicoproteínas), que inducen una respuesta inmune en un mamífero, incluyendo un ser humano.

Como se usa en el presente documento, la cuantificación incluye la determinación de una concentración de una sustancia particular en una muestra, por ejemplo, en µg/ml, o la determinación de la cantidad total de una sustancia en un volumen particular.

- 40 Como se usa en el presente documento, el término “acuoso” significa que comprende un componente de agua. Por consiguiente, una “solución acuosa” es una solución que comprende un componente de agua. La expresiones “acuoso” y “solución acuosa” abarcan específicamente la inclusión de agua, óxido de deuterio o ambos como componentes de agua.

- 45 Como se usa en el presente documento, el término elemento de reflexión interna (ERI) se usa de manera intercambiable con el término cristal de ATR o elemento de ATR, y significa un cristal, prisma u otra estructura que admite la radiación entrante y refleja la radiación al menos una vez desde una superficie (superficie reflectante) en el interior del elemento. En la ATR-FTIR, la reflectancia sigue a la interacción de la radiación con una muestra en contacto con la superficie reflectante del ERI. Después de dicha reflectancia, la radiación puede re-reflejarse o emitirse desde el ERI. Pueden usarse muchas marcas de espectrómetros con la ATR, añadiendo un dispositivo de ATR al espectrómetro. El espectrómetro de FTIR preferentemente tiene la capacidad de suministrar energía IR a una muestra en un ángulo de incidencia predeterminado entre aproximadamente 30 a aproximadamente 60 grados, y recoger la luz reflejada desde la muestra a través de un amplio intervalo de ángulos, incluyendo el ángulo de incidencia.

- 55 Los ERI tienen un alto índice de refracción (al menos mayor que el de la muestra que se ensaya, y normalmente entre 2,38 y 4,01 a 2000 cm⁻¹), y puede ser un cristal ópticamente denso, tal como un cristal de germanio, un cristal de seleniuro de cinc, un cristal de diamante, u otro material de alto índice de refracción capaz de transmitir la luz IR. La forma de un cristal de ATR depende del tipo de espectrómetro y la muestra con la que se usa, tal y como se

conoce en la técnica.

El ángulo de incidencia, como se usa en el presente documento, es el ángulo en el que la luz de incidencia impacta en un ERI. En la presente invención, puede usarse un elemento de ATR de diamante y un ángulo adecuado de incidencia es 45 grados desde la superficie normal.

- 5 Como se usa en el presente documento, la expresión “ATR de paso múltiple” significa una técnica de reflectancia total atenuada en la que la radiación incidente en un ERI tiene al menos dos caras de reflexión, interacciona al menos dos veces con una cara de reflexión antes de salir del ERI. Puede referirse a dichas interacciones como “rebotes” o “pasos”. El ATR de paso múltiple genera un espectro de ATR de paso múltiple. Como se usa en el presente documento, la expresión “ATR de paso simple” significa una técnica de reflectancia total atenuada en la que la radiación incidente en un ERI tiene al menos una cara de reflexión en el ERI que interactúa solo una vez con una cara de reflexión antes de salir del ERI (un “rebote” o “paso”). La ATR de paso simple genera un espectro de ATR de paso simple.

- 15 Como se usa en el presente documento, una curva de calibrado usada en una realización de la presente invención, significa un patrón de referencia creado usando las mismas etapas que se han indicado en el procedimiento, pero usando muestras (muestras de calibrado) que contienen cantidades conocidas de una especie de polisorbato. La especie de polisorbato en la muestra de calibrado es la misma que en las muestras de ensayo, y las cantidades de la especie de polisorbato en la muestra de calibrado abarcan un intervalo que incluye el intervalo que razonablemente se espera, por un experto en la materia, que esté presente en las muestras de ensayo. Por ejemplo, cuando se espera que varíe la concentración de polisorbato en las muestras de ensayo entre cero y 500 µg/ml, las muestras de calibrado que contienen 0 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml y 500 µg/ml pueden usarse para preparar una curva de calibrado. Cualquier unidad de área adecuada puede usarse para la curva de calibrado.

- 20 Los términos en singular “un”, “una” y “el” incluyen los referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Del mismo modo, se pretende que la palabra “o” incluya “y” a menos que el contexto indique claramente lo contrario. El término “pluralidad” se refiere a dos o más. Además, las limitaciones numéricas dadas con respecto a las concentraciones o niveles de una sustancia y que se declara que son “aproximadamente” un cierto nivel, se pretende que sean aproximadas. Por consiguiente, cuando se indica que una concentración es “aproximadamente 250 µg/ml” (por ejemplo), se pretende que la concentración se entienda que es al menos aproximadamente (o “aproximadamente” o “~”) 250 µg/ml.

- 25 Aunque los procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento pueden usarse en la práctica o el ensayo de la presente divulgación, se describen procedimientos y materiales adecuados a continuación. El término “comprende” significa “incluye”. Por lo tanto, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra “comprende”, y las variaciones tales como “comprendido” y “comprendiendo” se entenderá que implican la inclusión de un compuesto o composición (por ejemplo, ácido nucleico, polipéptido, antígeno) o etapa, o grupo de compuestos o etapas establecidas, pero no la exclusión de otros compuestos, composiciones, etapas, o grupos cualesquiera de los mismos. La abreviatura, “p. ej.” se usa en el presente documento para indicar un ejemplo no limitativo y es sinónimo del término “por ejemplo”.

Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la presente divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de los términos. Los términos y explicaciones adicionales pueden proporcionarse en el contexto de la presente divulgación.

- 40 Se ha desarrollado un procedimiento rápido y sensible para la cuantificación de polisorbato en formulaciones líquidas, incluyendo formulaciones que comprenden proteínas (incluyendo glicoproteínas) y/o polisacáridos. El procedimiento también es adecuado para la cuantificación de polisorbato en formulaciones líquidas que contienen otros excipientes (no polisorbato), y en formulaciones líquidas que contienen tanto proteínas como otros excipientes (no-polisorbato).

45 Ejemplos

Ejemplo 1: Procedimiento de cuantificación de polisorbato 80 por GC-MS

La cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) es un procedimiento comúnmente usado y validado para medir el contenido de polisorbato 80 en muestras líquidas.

Las muestras y los patrones se trataron usando un procedimiento de dos etapas:

- 50 (1) Derivatización: metanol + transesterificación de Fischer con HCl.
(2) Extracción del producto de derivatización: fraccionamiento en hexano/medio acuoso. La transmetilación del polisorbato 80 (usando MeOH + HCl) proporciona el metil éster del ácido 9-octadecenoico.

Se usó un patrón interno (ácido pentadecanoico) para representar la variabilidad de la etapa de derivatización. La separación cromatográfica se obtuvo usando una columna capilar de sílice fundida (columna WCOT (tubular abierta con pared recubierta) Ulti-metal de 25 m x 0,25 mm de Varian recubierta con TAP-CB con un DF=010 (Agilent

Technologies, Santa Clara, Estados Unidos). El intervalo de calibrado era de 50 a 2000 $\mu\text{g/ml}$. La detección por espectrometría de masas del polisorbato 80 y el patrón interno (PI) era a una m/z específica (relación masa respecto a carga).

Las muestras y los patrones se prepararon mezclando:

- 5
 - 200 μl de muestra o patrón
 - 200 μl de ácido pentadecanoico (patrón interno, PI)
 - 400 μl de MeOH/HCl 4 N

- Después las muestras (o patrones) se calentaron durante una hora a 80 °C y se añadieron 400 μl de hexano para extraer el derivado metil éster. Después las muestras (o patrones) se centrifugaron durante cinco minutos a 11.000 rpm. La fase de hexano se recogió y se analizó por GC-MS.
- 10

La Tabla 1 muestra la relación masa respecto a carga (m/z) usada para la detección por GC-MS del patrón interno y el polisorbato 80 y el tiempo de retención de estos componentes.

Tabla 1

Analito	m/z	Tiempo de retención
Ácido pentadecanoico (PI)	256-143	9,29 min
Polisorbato 80	264-296	10,69 min

- 15 La Figura 1 es un ejemplo de un cromatograma de GC-MS en modo SIM que muestra el pico de polisorbato 80. El primer pico corresponde al patrón interno (cantidad conocida), y el segundo pico (etiquetado como TIC:25.D\data.ms 10,686 (TIC=Cromatograma de Iones Totales)) corresponde al polisorbato derivatizado. El número de conteos indica la abundancia.

Ejemplo 2: Procedimiento de ATR-FTIR

- 20 Se desarrolló un procedimiento de cuantificación de polisorbato usando ATR-FTIR usando muestras obtenidas durante la producción de componentes inactivados de vacuna de la gripe a granel.

- El virus de la gripe se produjo en células EB66®. El cultivo viral se separó de las células y se purificó para producir un concentrado a granel usando las siguientes etapas sucesivas: centrifugación, microfiltración, ultrafiltración, ultracentrifugación por gradiente de sacarosa, inactivación con β -propiolactona, inactivación con luz ultravioleta (UV),
25 ultrafiltración, ruptura (alteración e inactivación del virus completo), ultracentrifugación, cromatografía, ultrafiltración y filtración en 0,22 μm .

Los productos finales purificados a granel comprendían antígenos proteicos de la gripe y excipientes.

- Los espectros de ATR-FTIR se registraron a temperatura ambiente en un espectrofotómetro de FT-IR de haz simple TENSOR™ 27 (Bruker Optics, Ettlingen, Alemania) equipado con un detector de mercurio/cadmio/teluro refrigerado
30 con nitrógeno líquido a una resolución nominal de 4 cm^{-1} y codificado cada cm^{-1} . El espectrofotómetro se purgó continuamente con aire seco. Se llevó a cabo un espectro de absorbancia del fondo antes de cada muestra (ERI sin muestra). Este "blanco" se restó del espectro medido de la muestra mediante el programa usado.

- Aproximadamente 1 μl de muestra se extendió en el elemento de reflexión interna (ERI) y el disolvente se evaporó lentamente con un flujo suave de nitrógeno. El ERI era un cristal de diamante (Golden Gate Reflectance ATR, Reflex
35 Analytical Corporation, Ridgewood, NJ, Estados Unidos; reflexión simple) transparente a la radiación infrarroja (IR) de interés. Se usó un alojamiento convencional sellado y purgable de las ópticas; se usó un interferómetro de Michelson.

Para cada muestra, los espectros se registraron de 4000 a 600 cm^{-1} y para cada muestra se promediaron múltiples escaneos.

- 40 Se asignó la región del espectro 3000 - 2800 cm^{-1} a la cadena alifática del polisorbato 80; 2200 - 1980 cm^{-1} al pico correspondiente al patrón interno (azida); el pico a 1735 cm^{-1} es del polisorbato 80 (estiramiento C=O); el pico a 1100 cm^{-1} se asigna al enlace C-O del polisorbato 80. (Véase Coates, The Interpretation of Infrared Spectra: Published Reference Sources, Applied Spectroscopy Review, Vol. 31 (1-2), 179-192 (1996); Smith, Infrared Spectral Interpretation, a Systematic Approach, CRC Press, Boca Raton, FL, 1999). Las áreas de los picos (I), (III) y (IV) se
45 normalizaron usando el área del pico de azida (II) (patrón interno).

Tal y como se describe en los Ejemplos 3 y 4, las curvas de calibrado se crearon usando muestras de calibrado que contenían cantidades conocidas de polisorbato, y se identificaron los picos de interés específicos, usando patrones de referencia con concentraciones conocidas de polisorbato 80. Los patrones de referencia eran (1) soluciones de

polisorbato 80 en H₂O (20, 50, 100, 250 y 500 µg/ml), y (2) muestras de CC-Gripe a granel purificado con concentraciones conocidas añadidas de polisorbato 80. Los patrones de referencia también contenían azida como patrón interno (azida al 0,2 % p/v; diluida diez veces para proporcionar una azida final al 0,02 %). El análisis de los datos se llevó a cabo usando los programas OPUS (Bruker Optics, Alemania) y Matlab (Mathworks Inc., Estados Unidos).

Los modos vibracionales generales se representan en la Figura 2. Se usa el infrarrojo medio, aproximadamente 4000 - 400 cm⁻¹ (1,4 - 3,0 µm), para estudiar las vibraciones fundamentales y la estructura asociada. Por ejemplo, los modos vibracionales para un grupo CH₂ incluyen el estiramiento simétrico (ν_s CH₂ aproximadamente 2853 cm⁻¹), estiramiento asimétrico (ν_{as} CH₂ aproximadamente 2926 cm⁻¹), plegado o movimiento en tijera en el plano (δ_s CH₂ aproximadamente 1465 cm⁻¹), plegado u oscilación en el plano (ρ CH₂ aproximadamente 720 cm⁻¹), plegado o movimiento de arriba a abajo fuera del plano (w CH₂ 1350 - 1150 cm⁻¹), plegado o torsión fuera del plano (τCH₂ 1350 - 1150 cm⁻¹).

Ejemplo 3: Detección por ATR-FTIR del polisorbato en agua

Usando el procedimiento tal y como se ha descrito en el Ejemplo 2, se investigó la concentración de polisorbato usando 20 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml y 500 µg/ml de polisorbato 80 en agua (una única muestra inicial diluida para crear las diferentes concentraciones). Cada muestra contenía azida (0,02 % p/v) como patrón interno.

La Figura 3 muestra un ejemplo de los espectros obtenidos de las diluciones de polisorbato 80/agua. Cada línea representa una de las muestras (20 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml y 500 µg/ml de polisorbato 80 en agua), y es un valor promedio de 32 escaneos. (También se prepararon los resultados promedio de 256 escaneos por muestra (no mostrados), y se dio la misma correlación que con los resultados promediados de 32 escaneos). La región 3000 - 2800 cm⁻¹ del espectro se asigna a la cadena alifática del polisorbato 80; el pico a 2200 - 1980 cm⁻¹ corresponde al patrón interno (azida); el pico a 1735 cm⁻¹ es del polisorbato 80 (estiramiento C=O); el pico a 1100 cm⁻¹ se asigna al enlace C-O del polisorbato 80. (Véase Coates, The Interpretation of Infrared Spectra: Published Reference Sources, Applied Spectroscopy Review, Vol. 31 (1-2), 179-192 (1996); Smith, Infrared Spectral Interpretation, a Systematic Approach, CRC Press, Boca Raton, FL, 1999).

Las cinco líneas en la Figura 3 representan las cinco muestras de la dilución polisorbato/agua. Las áreas de los picos (I), (III) y (IV) son polisorbato normalizado usando la azida (patrón interno, mostrado en el área del pico (II)).

Región (I) 3000 - 2800 cm⁻¹ = cadena alifática del polisorbato;
 Región (II) 2200 - 1980 cm⁻¹ = patrón interno, azida;
 Región (III) pico a 1735 cm⁻¹ = polisorbato (C=O);
 Región (IV) pico a 1100 cm⁻¹ = polisorbato (C-O).

Las áreas de los picos (I), (III) y (IV) se identificaron debido a que aumentaron en función de la concentración de polisorbato 80.

De estos cinco espectros se trazó la regresión lineal de la Figura 4. La Figura 4 traza las proporciones de las áreas de los picos (I, III y IV; normalizadas usando el patrón interno). El área está expresada como unidades arbitrarias. La dosis-respuesta del polisorbato 80 mostró ser lineal en este intervalo con coeficientes de determinación R² por encima de 0,99 para el pico (III) y (IV).

Ejemplo 4: Detección por ATR-FTIR del polisorbato en muestras de CC-Gripe a granel

Para demostrar que la matriz no afectó a la medición de polisorbato, se añadió polisorbato 80 (en las cantidades de 20 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml y 500 µg/ml) a muestras de CC-Gripe a granel. Las muestras contenían azida como patrón interno, y se investigaron usando ATR-FTIR tal y como se ha descrito en los Ejemplos 2 y 3.

La Figura 5 muestra un ejemplo de los espectros obtenidos de las muestras de polisorbato 80/CC-Gripe. Las cinco líneas en la Figura 5 representan las cinco muestras de polisorbato/gripe diferentes, promediadas de 32 escaneos, y normalizadas usando el patrón interno azida. (Las áreas de los picos (I), (II) y (III) son como las que se informaron en la Figura 3).

El pico a 1735 cm⁻¹ (III) se identificó debido a que aumentó de forma precisa con cantidades añadidas de polisorbato 80. Debido a la complejidad de la matriz, solo el pico (III) puede usarse para identificar y cuantificar el polisorbato 80 en muestras de CC-Gripe. Véase los coeficientes de linealidad a continuación.

La Figura 6 muestra la regresión lineal trazada para (I) y (III), usando los cinco espectros de la Figura 5. El área está expresada como unidades arbitrarias. La dosis-respuesta del polisorbato 80 mostró ser lineal en este intervalo con un coeficiente de determinación r² superior a 0,99 para el pico (III). Esto indica que la matriz no afectó significativamente a la medición del polisorbato, y por lo tanto el polisorbato en agua puede usarse como curva de calibrado.

Ejemplo 5: Detección por ATR-FTIR del polisorbato en los patrones de referencia y las muestras de gripe

Los datos obtenidos en los Ejemplos 3 y 4 se usaron para calcular los valores de recuperación, como se muestran en la Tabla 2. (Valor de recuperación = % de cantidad conocida de polisorbato que se midió).

Tabla 2

Muestra	20 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	250 µg/ml	500 µg/ml	Promedio
Polisorbato 80 en H ₂ O	86 %	110 %	104 %	96 %	101 %	99 %
CC-Gripe a granel con polisorbato 80 añadido	80 %	89 %	88 %	90 %	98 %	89 %

Ejemplo 6: Uso del patrón interno

Las Figuras 7 y 8 representan el efecto del uso del patrón interno en la medición del polisorbato en CC-Gripe a granel. La Figura 7A es una vista aumentada de un ejemplo de pico III obtenido usando el procedimiento de ATR-FTIR como se ha descrito en el Ejemplo 2, para tres muestras (los resultados son el promedio de 256 escaneos) sin normalización. La Figura 8A es una vista aumentada de un ejemplo de pico III obtenido usando el procedimiento de ATR-FTIR como se ha descrito en el Ejemplo 2, para tres muestras (los resultados son el promedio de 256 escaneos) donde los picos se han normalizado usando el patrón interno (área del pico dividida por el área del pico del patrón interno).

Las Figuras 7B y 8B representan gráficamente las áreas de los picos frente a la concentración de polisorbato (eje X, µg/ml) para las Figuras 7 y 8, respectivamente. La normalización mejora la linealidad de la respuesta ($R^2 = 0,9933$).

Ejemplo 7: Cuantificación del polisorbato en muestras de CC-Gripe a granel

Tabla 3: Cuantificaciones de polisorbato en muestras de CC-Gripe a granel usando GC-MS (procedimiento tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1) y ATR-FTIR (procedimiento tal y como se ha descrito en el Ejemplo 2). Todas las muestras son a granel purificadas o a granel finales. La presencia de polisorbato era debida al procedimiento de purificación utilizado.

Tabla 3 - todos los antígenos producidos en el cultivo celular

Muestras de CC-Gripe (números de los lotes)	GC-MS: concentración de polisorbato 80 µg/ml	ATR-FTIR: concentración de polisorbato 80 µg/ml	Relación de las mediciones de GC-MS/ATR-FTIR
DFCPB002 -final	216	249	0,87
DFCPB003 -final	124	175	0,71
DFCPB004- final	201	233	0,86
DFCPBDA001	368	372	0,99
DFCPBDA003	1124	1088	1,03
DFCPBDA004	411	387	1,06
DFCPBDA005	281	321	0,88
DFCPBDA006	304	306	0,99
EB66-61 a granel A	382	392	0,97
EB66-61 a granel B	356	316	1,13
EB66-69 a granel A	255	204	1,25
EB66-69 a granel B	326	309	1,06
EFCPAHA016-A	268	294	0,91
EFCPAHA026	122	128	0,95
EFCPAHA028	129	191	0,68
EFCPAHA037	338	351	0,96
EFCPAHA038	737	789	0,93

La comparabilidad de los resultados indica que el procedimiento de ATR-FTIR es un procedimiento alternativo fiable para la cuantificación de polisorbato. El uso del presente procedimiento de ATR-FTIR para la cuantificación de polisorbato no requiere un pretratamiento químico de la muestra, y no muestra interferencias de la matriz purificada de CC-Gripe a granel.

La Tabla 4 muestra la cuantificación de polisorbato 80 en muestras obtenidas en diferentes puntos durante el procesamiento del lote EB66-69 (cultivo celular). Se observó una buena correlación de los datos entre los dos procedimientos de medición.

Tabla 4: Cuantificación de polisorbato (GC-MS y ATR-FTIR)

Etapas del procedimiento	Tampón de la muestra	Muestra	Polisorbato 80		Medida (µg/ml)
			Conc. medida (GC-MS µg/ml)	Conc. medida (ATR-FTIR µg/ml)	
EB66-69					
Ultrafiltración	PBS	UF1	<51	<LDC	0
Ultracentrifugación	PBS-Tx100	SN	802	75	0
Ultracentrifugación	PBS-Tx100	SN	858	<LDC	0
Retirada del detergente	PBS-Tw80-Tx100-SVE	FT	<51	18*	50-200
Ultrafiltración	PBS-Tw80-Tx100-SVE	UF2	520	539	100-500
Filtración esterilizante	PBS-Tw80-Tx100-SVE	a granel	255	219	100-500
*Ruido LDC = límite de cuantificación					

5

Como se muestra en la Tabla 4, la técnica GC-MS indicó la presencia de polisorbato antes de la adición del polisorbato 80.

La Figura 9 compara la medición por ATR-FTIR en el área del pico III, usando muestras de dos puntos diferentes en el procedimiento. La muestra "ruptura SN" se tomó antes de añadirse cualquier polisorbato durante el procedimiento de purificación. La Figura 9 no muestra interferencias en el área del pico III. En comparación a la muestra "PBS a granel", tomada en un punto en la purificación tras añadirse el polisorbato. Esta muestra contiene polisorbato (etiquetada como TWEEN80 en el gráfico).

La Figura 9 demuestra la especificidad de la presente técnica de ATR-FTIR para medir polisorbato en una muestra que contiene proteínas.

15 **Referencias adicionales**

- Baulsir y Simler, Design and evaluation of IR sensors for pharmaceutical testing, *Advanced Drug Delivery Reviews* 21(3): 191-203 (Oct 1996)
- Blanco y col., Analytical control of pharmaceutical production steps by near infrared reflectance spectroscopy, *Analytica Chimica Acta*, 392(2-3):237 (1999)
- 20 Chang y col., Study of Interaction of Tributyl Phosphate, Non-ionic Surfactant and Water by FT-Infrared Spectrum. ISEC 2002, Cape Town, South Africa, 131-136, 2002
- Hillgren y col., Protection mechanism of Tween 80 during freeze-thawing of a model protein, LDH, *International Journal of Pharmaceutics* 2002 237:1-2 (57-69)
- 25 Kato y col., Determination of polysorbates in foods by colorimetry with confirmation by infrared spectrophotometry, thin-layer chromatography, and gas chromatography, *J Assoc Off Anal Chem.* 1989 Ene-Feb;72(1):27-9.
- Kerwin y col., Effects of tween 80 and sucrose on acute short-term stability and long- term storage at -20 °C of a recombinant hemoglobin, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1998 87:9 (1062-1068)
- 30 Kishore y col., The degradation of polysorbates 20 and 80 and its potential impact on the stability of biotherapeutics. *Pharm Res.* 2011 May; 28(5):1194-210. Epub 2011 Mar 3.
- Li y col., Effect of poly(ethylene glycol) stearate on the phase behavior of monocaprato/Tween80/water system and characterization of poly(ethylene glycol) stearate-modified solid lipid nanoparticles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2008 317:1-3 (352-359)
- 35 Schwegman y col., Evidence of partial unfolding of proteins at the ice/freeze-concentrate interface by infrared microscopy, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009 98:9 (3239-3246)
- Tian y col., Enhanced brain targeting of temozolomide in polysorbate-80 coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles, *Int J Nanomedicine.* 2011;6:445-52. Epub 2011 Feb 23.
- Xie y col., Improvement of antifouling characteristics in a bioreactor of polypropylene microporous membrane by the adsorption of Tween 20, *Journal of Environmental Sciences Volumen* 19, Issue 12, 2007, Páginas 1461-1465
- 40 Xie y col., Surface modification of polyethylene membrane by adsorption of Tween 20 to improve antifouling characteristics in a bioreactor, *Environmental Science and Technology*, 2009
- Xie y col., Surface modification of polypropylene microporous membranes by the adsorption of non-ionic surfactants, *Chinese Journal of Polymer Science (Edición inglesa)* 24(4), Julio 2006, Páginas 421-429

Yan y Chen, Investigation of microstructure of colloidal liquid aphrons (CLA), Journal of Xi'an Jiaotong University, 41(11):1351-54 (2007)

Yan y Chen, Zheng y col., FTIR study of Tween 80/1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate/toluene microemulsions, Colloid Polymer Sci 287:871-876 (2009).

5 Yelenskii, y col., Phase state determination of tween-80-water binary mixtures by IR spectroscopy, Moscow University Chemistry Bulletin, 47 (6), pp. 386-392 (2006)

Zheng y col., FTIR study of Tween80/1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate/ toluene microemulsions, Colloid and Polymer Science 2009 287:7 (871-876)

10

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de determinación de la concentración de una especie de polisorbato en una mezcla conocida por contener una única especie de polisorbato, que comprende:

- a) obtener una muestra de ensayo de dicha mezcla;
- b) añadir un patrón interno a dicha muestra de ensayo;
- c) obtener, con un espectrómetro, un espectro de reflectancia total atenuada (ATR) del infrarrojo medio de la muestra de ensayo;
- d) identificar, del espectro de reflectancia, un número de onda que corresponde al pico C=O de dicha especie de polisorbato;
- e) identificar, del espectro de reflectancia, un número de onda que corresponde al pico del patrón interno;
- f) calcular el área bajo la curva para dicho número de onda del C=O, normalizada mediante el área del pico del patrón interno; y
- g) comparar dicha área normalizada con una curva de calibrado para determinar la concentración de dicha especie de polisorbato en dicha muestra de ensayo.

2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicha mezcla comprende un antígeno proteico, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en proteínas del virus de la gripe; proteínas hemagglutininas (HA) de la gripe; proteínas neuraminidasas (NA) de la gripe; proteínas del virus del sarampión, proteínas del virus de las paperas, proteínas del virus de la varicela (*chickenpox*), proteínas del virus de la rubéola, proteínas del virus del dengue, proteínas del virus respiratorio sincitial (VRS), proteínas de citomegalovirus (CMV), proteínas del virus del papiloma humano (VPH); proteínas del virus de la hepatitis A; proteínas del virus de la hepatitis B; proteínas del rotavirus; proteínas del virus de la poliomielitis; proteínas del virus del sarampión; proteínas del virus herpes; proteínas del virus de la viruela; proteínas de poxvirus; proteínas de *S. pneumococcus*; proteínas de *Haemophilus influenzae* B; proteínas de *Corynebacterium diphtheria*; proteínas de especies de *Corynebacterium*; proteínas de *Clostridium tetani*; proteínas de especies de *Clostridium*; proteínas de *Bordetella pertussis*; y proteínas de especies de *Bordetella*.

3. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicha mezcla comprende un antígeno polisacárido opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en polisacáridos de especies de *Streptococcus*; polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae*; polisacáridos de *Neisseria meningitidis*; polisacáridos de *Haemophilus influenzae*; polisacáridos de especies de *Salmonella*; y polisacáridos de *Salmonella typhi*.

4. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que dicha muestra de ensayo no se pretrata químicamente antes de obtener los espectros de reflectancia total atenuada del infrarrojo medio de la muestra de ensayo.

5. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que la única especie de polisorbato es polisorbato 80 y el número de onda correspondiente al pico C=O es aproximadamente 1735 cm^{-1} .

6. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que dicho patrón interno es azida.

7. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que dicha muestra de ensayo es una muestra líquida, opcionalmente dicha muestra de ensayo es una muestra acuosa.

8. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior en el que dicha mezcla comprende excipientes no polisorbato.

9. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior en el que dicha mezcla comprende un excipiente no polisorbato seleccionado de (4-(1,1,3,3-tetrametilbutil) fenil-polietilenglicol, *t*-Octilfenoxipolietoxietanol, éter *terc*-octilfenílico de polietilenglicol y succinato de vitamina E (SVE).

10. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior en el que dicha mezcla es un componente de una vacuna a granel.

11. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que dicha muestra de ensayo se pone en contacto con un elemento de reflexión interna (ERI) simple antes de obtener los espectros de ATR.

12. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que dicha muestra de ensayo se pone en contacto con un elemento de reflexión interna (ERI) múltiple antes de obtener los espectros de ATR.

13. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior en el que la muestra se seca en nitrógeno antes de obtener los espectros.

14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que dicha mezcla es una solución acuosa que comprende dicha única especie de polisorbato, en el que dicha especie de polisorbato es polisorbato 80, y en el que dicho procedimiento comprende añadir azida a dicha muestra de ensayo como patrón interno; medir el área del pico

ES 2 574 614 T3

a 1735 cm^{-1} y a $2200 - 1980\text{ cm}^{-1}$ usando ATR-FTIR; normalizar dicha área del pico a 1735 cm^{-1} con dicha área del pico a $2200 - 1980\text{ cm}^{-1}$ y determinar el área normalizada del pico a 1735 cm^{-1} .

Figura 1

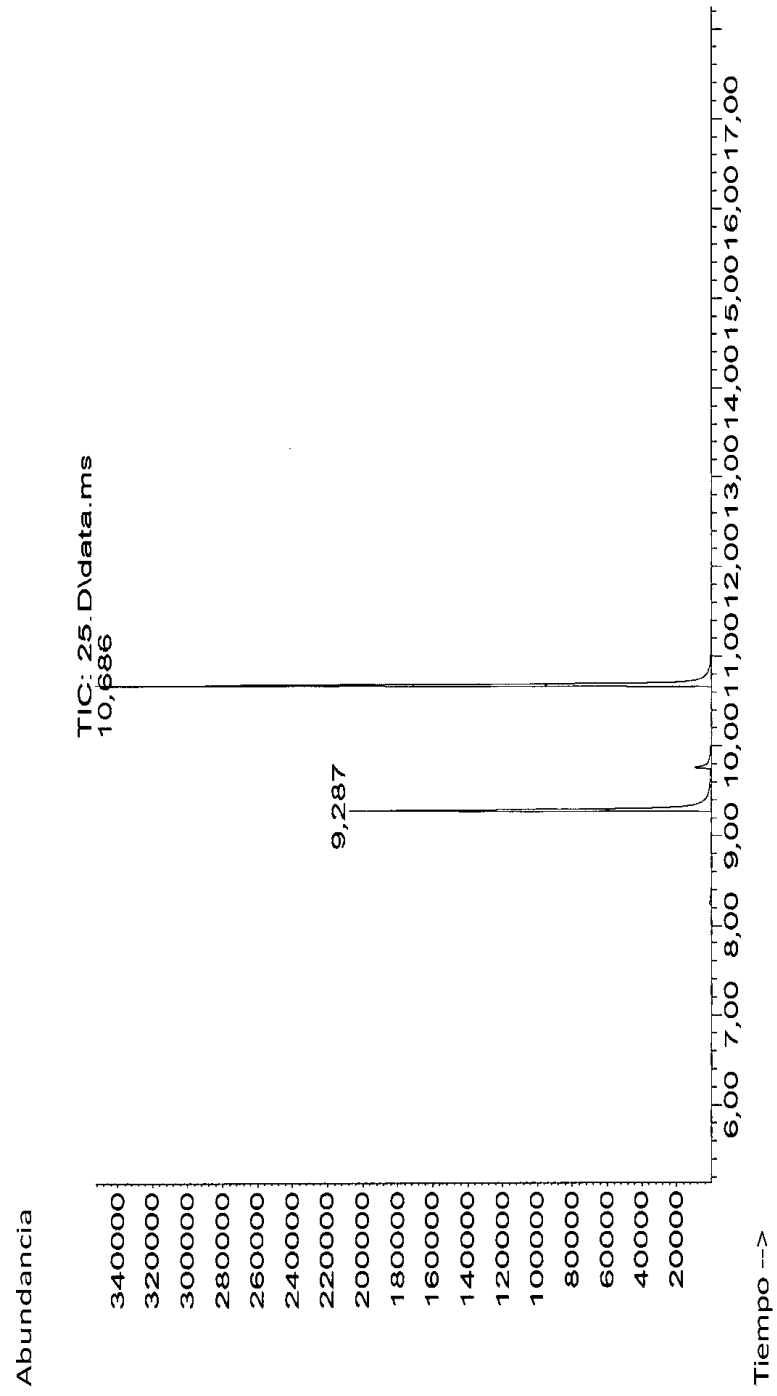
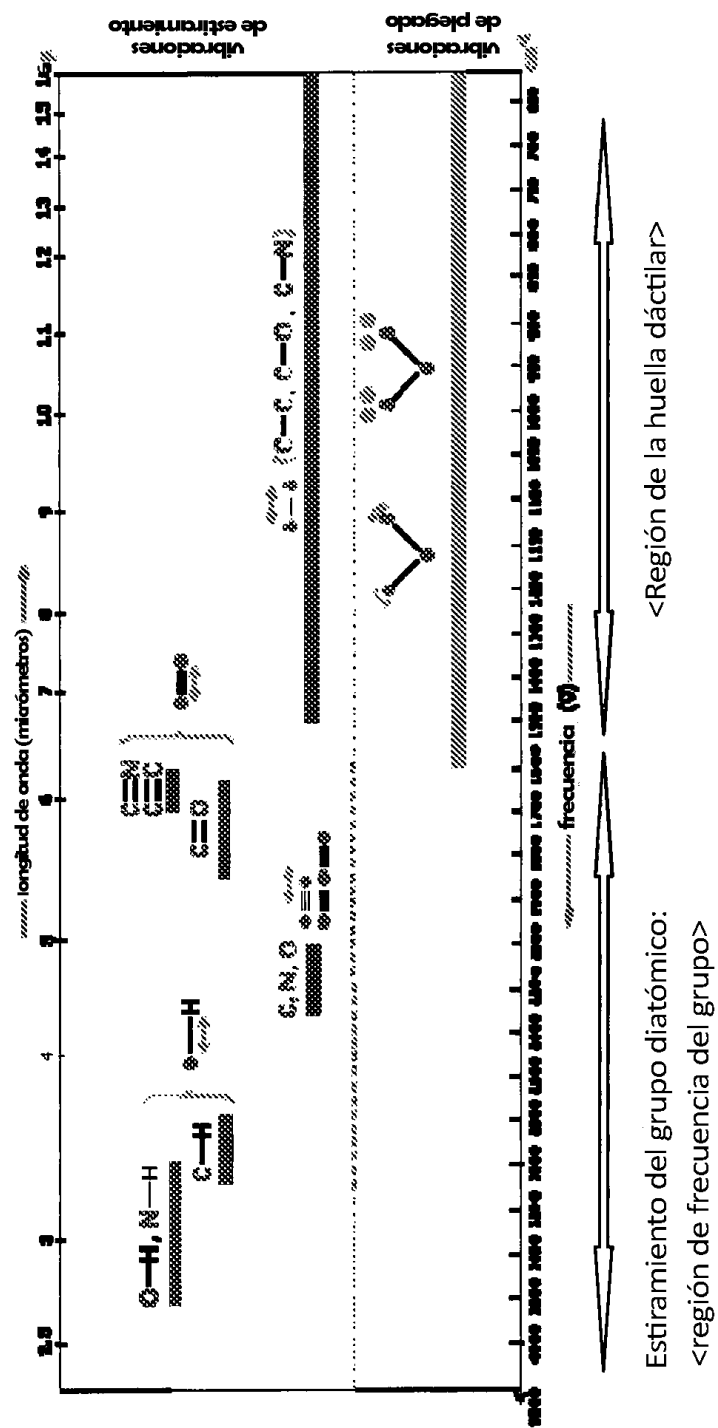


Figura 2



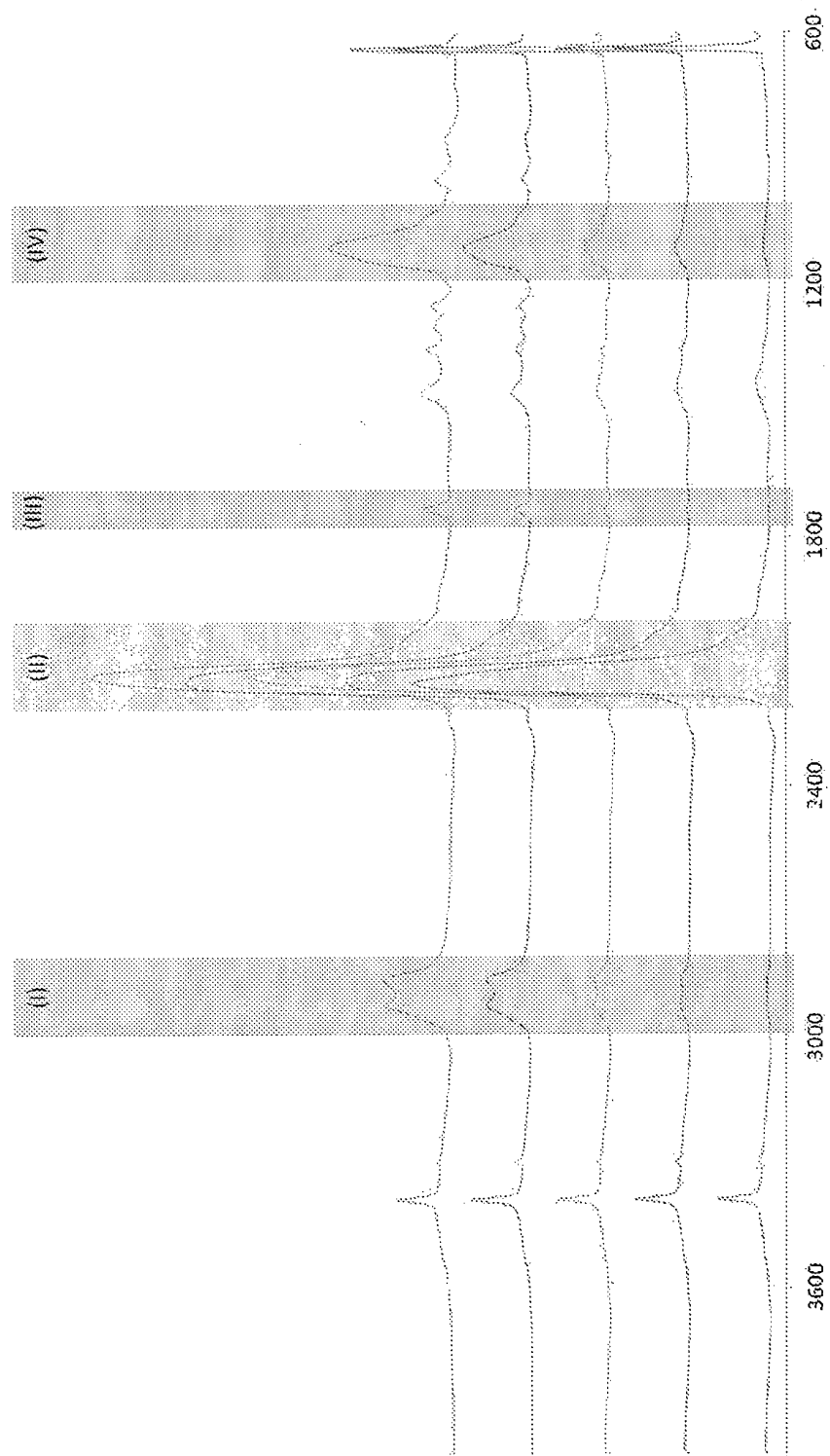


Figura 3

Figura 4

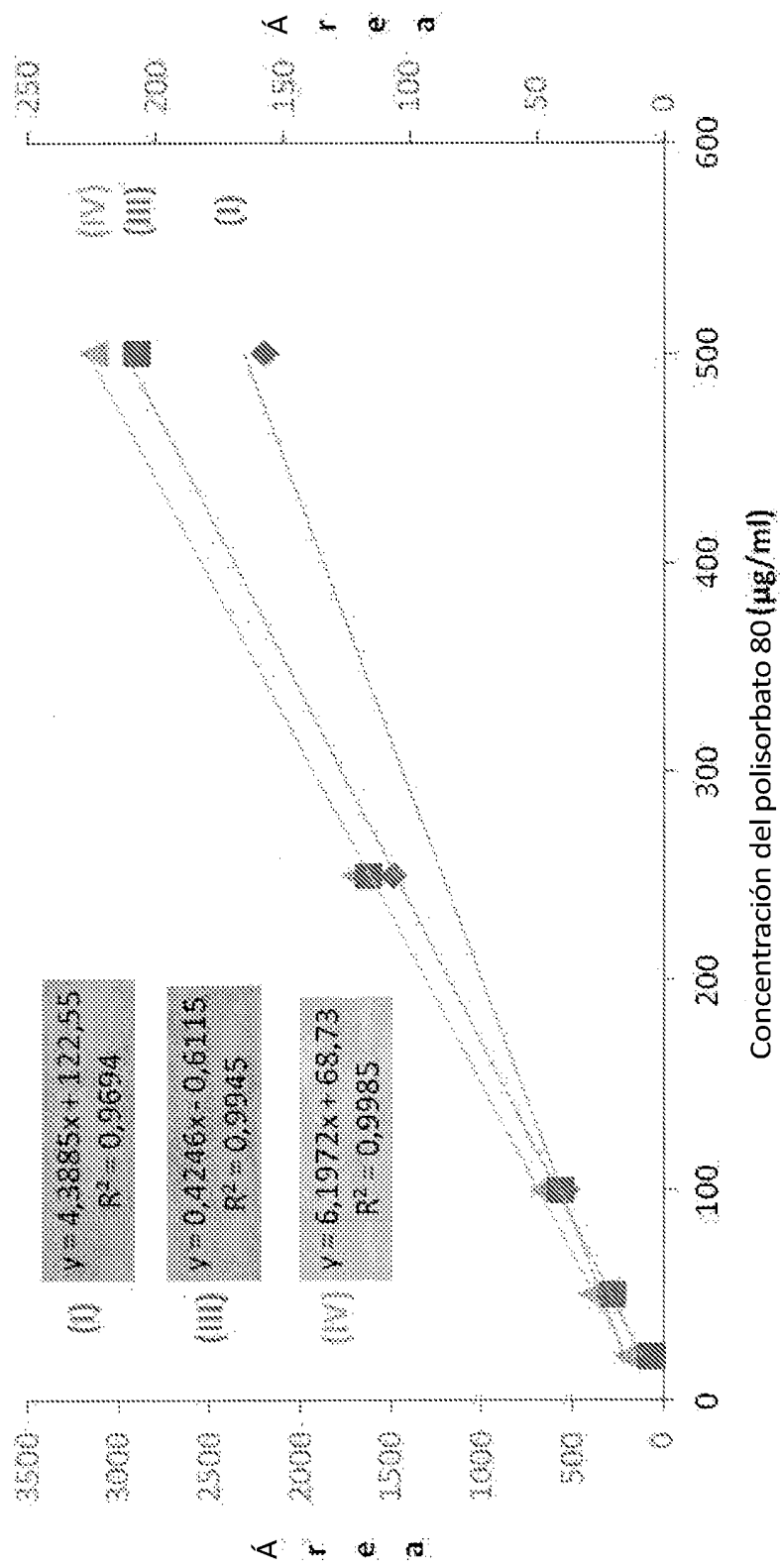


Figura 5

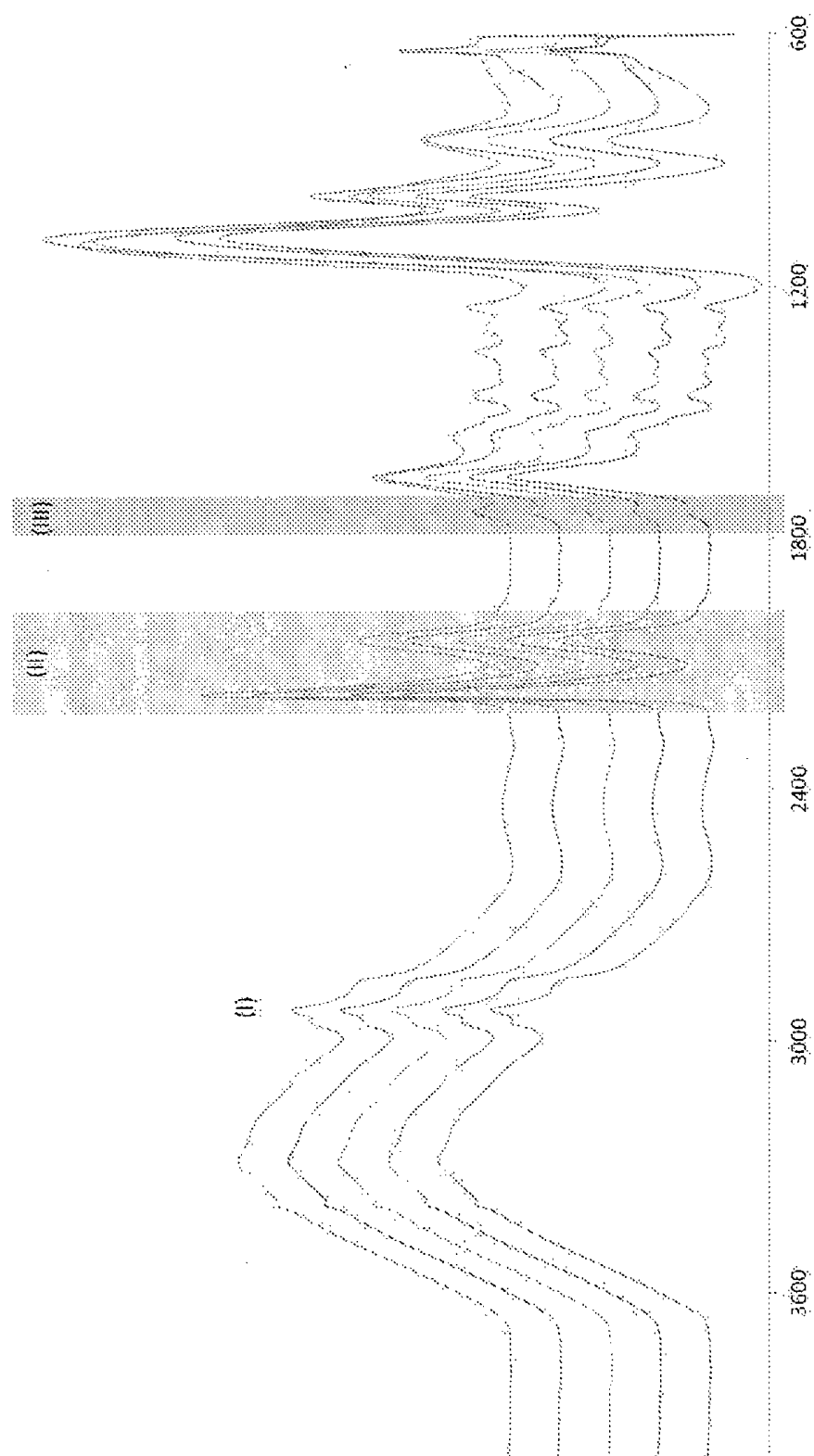


Figura 6

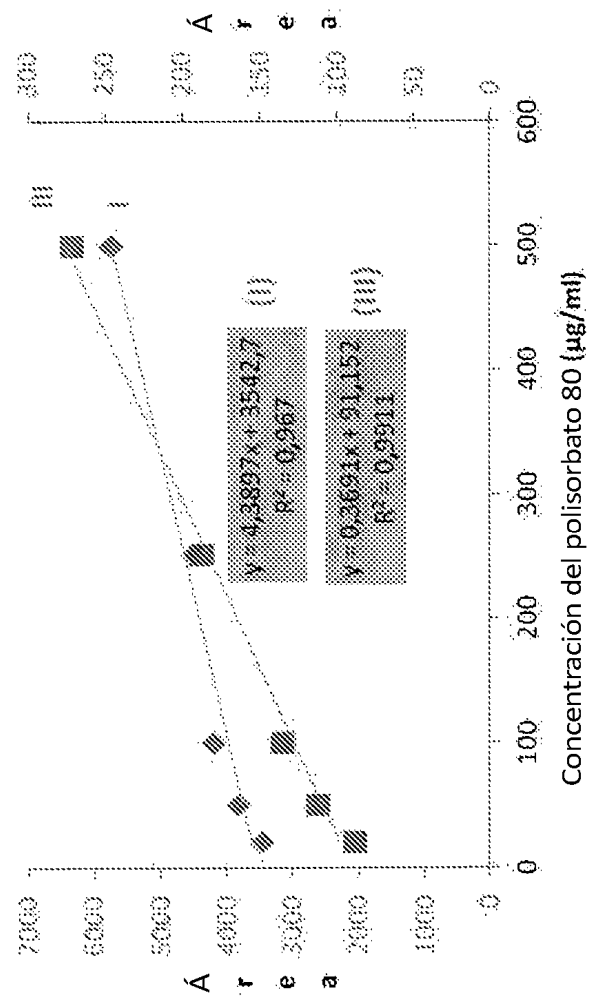


Figura 7A

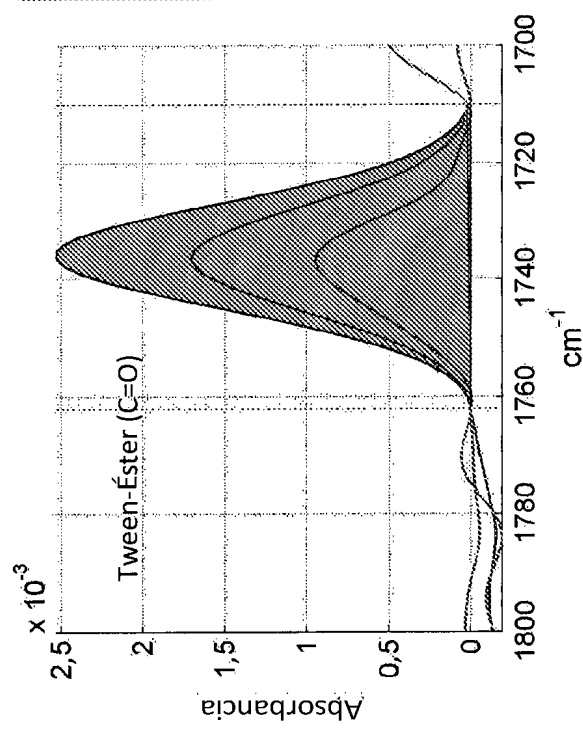
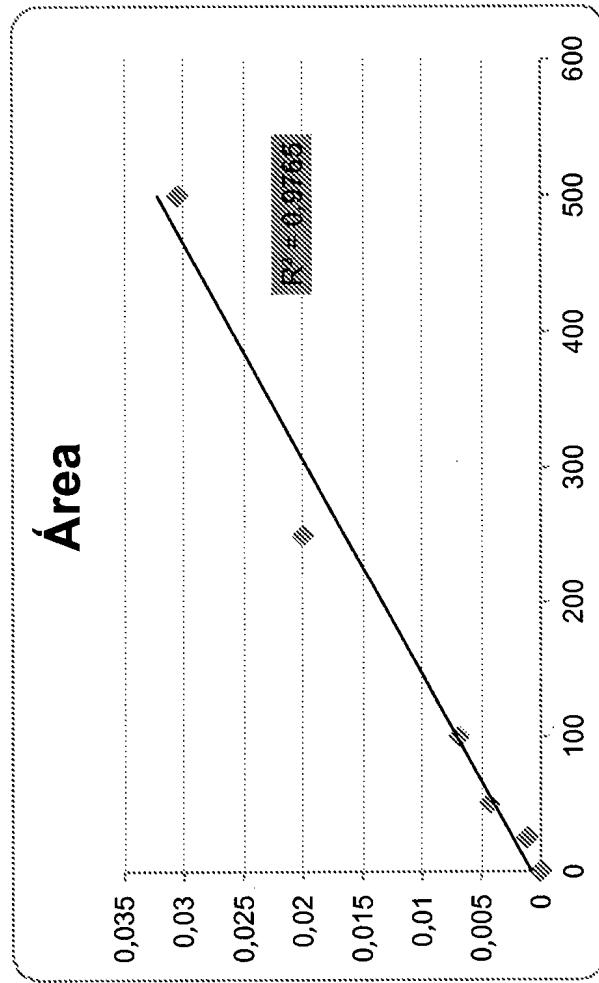


Figura 7B



Un enfoque en el área de interés. 7B es el área únicamente de TWEEN (para diferentes concentraciones) Muestra que la respuesta no es demasiado buena.

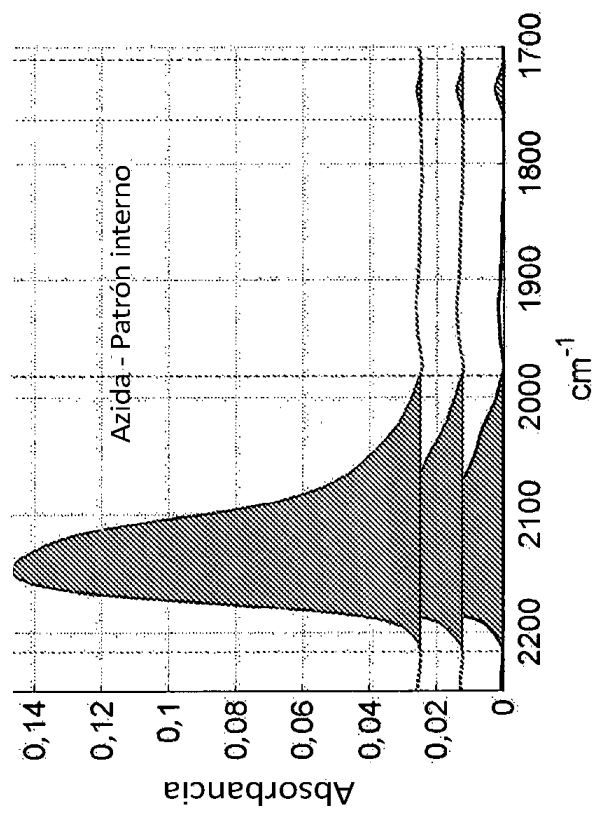


Figura 8A

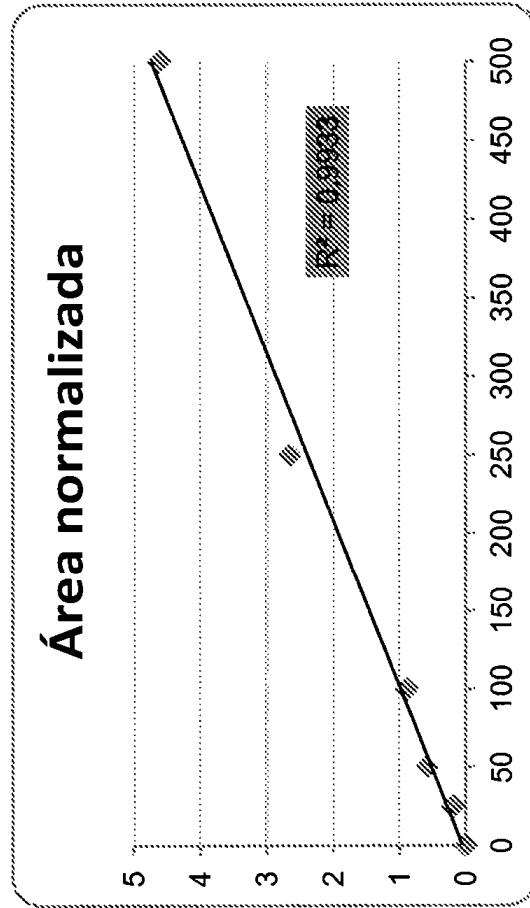


Figura 8B

Figura 9

