

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 618**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/92 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.03.2012 PCT/EP2012/000898**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2012 WO12119724**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2012 E 12709015 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2681553**

54 Título: **Método para la determinación de polisorbato**

30 Prioridad:

04.03.2011 US 201161449535 P

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

10.11.2017

73 Titular/es:

BAXALTA GMBH (50.0%)

Zählerweg 4

6300 Zug, CH y

BAXALTA INCORPORATED (50.0%)

72 Inventor/es:

WEBER, ALFRED;

ENGELMAIER, ANDREA;

ANDERLE, HEINZ y

SCHWARZ, HANS-PETER

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 641 618 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

Método para la determinación de polisorbato

5 La presente invención se refiere a un método para la determinación de polisorbato en una muestra que contiene proteínas. El método de la presente invención implica las etapas de someter la muestra a hidrólisis alcalina con al menos NaOH 3 N a una temperatura de 95 °C a 100 °C durante al menos 45 minutos, neutralizar la muestra tras la hidrólisis alcalina, retirar opcionalmente precipitado desnaturalizado de la muestra neutralizada mediante filtración, añadir una mezcla acuosa de un complejo de tiocianatometal a la muestra opcionalmente filtrada para formar un
10 complejo de sorbitano-polioxietilentiocianatometal, extraer dicho complejo de sorbitano-polioxietilentiocianatometal en un disolvente orgánico inmiscible con agua, medir la absorbancia del extracto para cuantificar la cantidad de dicho complejo de sorbitano-polioxietilentiocianatometal formada, y calcular la cantidad del polisorbato contenido en la muestra a partir de la cantidad de dicho complejo de sorbitano-polioxietilentiocianatometal.

15 La seguridad vírica es un requisito básico para proteínas terapéuticas, especialmente para fármacos derivados de plasma. En los últimos años, se ha realizado un progreso importante en la seguridad vírica eliminando prácticamente el riesgo de transmisión vírica. Se desarrollaron, validaron e introdujeron etapas específicas diseñadas para eliminar o inactivar virus en el procedimiento de fabricación de proteínas plasmáticas usadas terapéuticamente. Los procedimientos de fabricación de factores de coagulación como el factor VIII o el factor IX, inhibidores de
20 proteinasas plasmáticas tales como antitrombina, antitripsina o inhibidor de C1, y de albúmina e inmunoglobulinas deben tener al menos una etapa de inactivación eficaz frente a virus con envoltura lipídica para satisfacer el requisito de seguridad, y autoridades reguladoras nacionales e internacionales han establecido un marco amplio de regulaciones para garantizar el mantenimiento y la mejora adicional de la seguridad vírica. Por ejemplo, el Comité científico de Especialidades Farmacéuticas (CPMP) como órgano de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) emitió directrices que cubren la seguridad vírica de productos biológicos. Para minimizar el riesgo de transmisión
25 vírica por fármacos derivados de plasma, las directrices del CPMP, además de otras acciones preventivas a nivel de plasma como material de partida, recomiendan encarecidamente la incorporación de dos procedimientos de inactivación vírica que actúan independientemente en el procedimiento de fabricación.

30 El conocimiento de la utilidad de detergentes para la inactivación vírica junto con la disponibilidad de métodos cromatográficos de purificación de proteínas ha mostrado el modo de inactivación vírica por detergentes en el procesamiento de proteínas plasmáticas. Los virus diana primarios VIH, VHB y VHC tienen todos envoltura lipídica. Por tanto, una estrategia de inactivación vírica eficaz se beneficia de manera racional de la sensibilidad vírica al detergente solo o al procedimiento bien establecido de disolvente-detergente (S/D). El efecto de todos estos
35 procedimientos radica en la destrucción específica de la envoltura lipídica vírica, mientras que tiene un impacto relativamente bajo en la integridad de proteínas terapéuticas con la excepción de lipoproteínas.

El detergente no iónico monooleato de polioxietilensorbitano (polisorbato 80, Tween™ 80) es el detergente viricida más frecuentemente usado de los polisorbatos. Tras la etapa de inactivación vírica, el procedimiento de fabricación
40 tiene que comprender una etapa de purificación eficaz para eliminar los agentes de inactivación, tal como adsorción cromatográfica de la proteína. Sin embargo, con el fin de monitorizar la eficacia del procedimiento de eliminación de detergente y también para comprobar el cumplimiento con los límites especificados y validados de concentración de detergente durante la inactivación vírica, la determinación del detergente ha de realizarse en presencia de concentraciones variables y ocasionalmente altas de proteínas, por ejemplo proteínas plasmáticas. La composición
45 química y la diversidad estructural de los polisorbatos como el polisorbato 80, la baja reactividad de estos compuestos, la matriz de proteína/tampón así como la posible presencia de otros detergentes fisicoquímicos relacionados tales como, por ejemplo, éteres de alquifenol como Triton™ X-100 con números variables de residuos de óxido de etileno hacen que la determinación sea difícil. Las preocupaciones sobre los riesgos asociados con encefalopatía espongiforme bovina (BSE) han llevado a la introducción de una forma de polisorbato 80 derivada de
50 vegetales fabricada a partir de grasas vegetales en lugar de sebo bovino. A pesar de su igual eficacia viricida, estos polisorbatos con un perfil de ácidos grasos presuntamente diferente pueden divergir en sensibilidad analítica.

Se ha adaptado un ensayo colorimétrico temprano basado en la formación de un complejo entre polisorbato 80 y almidón y la medición del almidón libre en exceso mediante su reacción con yodo para medios de cultivo tisulares y
55 vacunas que contienen aminoácidos, azúcares y proteínas. Se ha desarrollado originalmente otro ensayo colorimétrico basado en la formación de complejos de cadenas de polioxietileno con tiocianatocobaltato (II) y la extracción del complejo en cloroformo para determinar la concentración de ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol en disoluciones acuosas. Desde entonces, se ha extendido su uso a otros tensioactivos no iónicos polietoxilados tales como, por ejemplo, éteres de polioxietileno con p-isooctilfenol (disponibles de diversos
60 fabricantes con los nombres comerciales Triton™ X-100, Igepal™ CA-630, Nonidet™ P40, o Tergitol™ TM NP40), con dietil éter, cloruro de metileno o cloroformo como extractor.

Sin embargo, la aplicación de este método para productos biológicos está limitada por la presencia de proteínas, que interfieren fuertemente y, por tanto, han de eliminarse antes de realizar el análisis. Para superar efectos de la matriz
65 relacionados con proteínas, se introdujeron técnicas de separación tal como una etapa de precipitación con etanol en frío para la eliminación de proteínas mediante centrifugación antes de colorimetría con tiocianatocobaltato (II),

5 cromatografía de exclusión molecular con derivatización colorimétrica tras la columna, cromatografía de exclusión
molecular con concentración de base de polisorbato 80 por encima de la concentración micelar crítica para evitar la
agregación micelar y la detección UV a 235 nm, cromatografía de agotamiento de proteínas de polisorbato no unido
con captura de proteínas en una columna de HPLC de intercambio iónico, extracción en fase sólida con
10 deslipidación, derivatización colorimétrica y separación del complejo de tiocianatocobaltato (II) mediante
cromatografía de permeación de gel, hidrólisis ácida con HPLC o determinación mediante CG del ácido graso, o
saponificación suave con determinación por HPLC del ácido graso liberado, cromatografía en capa fina, o extracción
líquida con separación por HPLC y detección por espectrometría de masas. Los últimos enfoques, que se basan en
el resto de ácido graso del polisorbato, se ven obstaculizados por las composiciones de ácido graso variables del
15 analito. Otro enfoque reciente mide la polarización de fluorescencia de 5-dodecanoilaminofluoresceína incorporada
en micelas de polisorbato. Sin embargo, estos métodos o bien llevan mucho tiempo, adolecen de un rendimiento
limitado de muestras, o bien requieren instrumentación compleja y validación por separado de cada etapa.

15 En este contexto, el documento CN 101 639 439 A describe un método para la determinación de polisorbato en una
muestra que contiene proteínas, que comprende la etapa de añadir un reactivo de tiocianato y extraer en disolvente
de cloroformo.

20 Por tanto, existe una fuerte necesidad de proporcionar un método para la determinación de polisorbato en muestras
que contienen proteínas mediante un ensayo colorimétrico, en el que la interferencia de proteínas puede eliminarse
de manera rápida y sencilla. Dicho método debe permitir la determinación de la concentración real de detergente
durante, por ejemplo, inactivación vírica, así como en los concentrados finales de proteínas purificadas.

Esta necesidad se satisface proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

25 La presente invención se refiere a un método para la determinación de polisorbato en una muestra que contiene
proteínas, que comprende las etapas de:

30 (a) someter la muestra a hidrólisis alcalina con al menos NaOH 3 N a una temperatura de 95 °C a 100 °C durante al
menos 45 minutos;

(b) neutralizar la muestra tras la hidrólisis alcalina;

(c) retirar opcionalmente precipitado desnaturalizado de la muestra neutralizada mediante filtración;

35 (d) añadir una mezcla acuosa de un complejo de tiocianatometal a la muestra opcionalmente filtrada para formar un
complejo de sorbitano-polioxietilentiocianatometal;

40 (e) extraer dicho complejo de sorbitano-polioxietilentiocianatometal formado en la etapa (d) en un disolvente
orgánico inmiscible con agua;

(f) medir la absorbancia del extracto obtenido en la etapa (e) para cuantificar la cantidad de dicho complejo de
sorbitano-polioxietilentiocianatometal formado en la etapa (d); y

45 (g) calcular la cantidad del polisorbato contenido en la muestra a partir de la cantidad de dicho complejo de
sorbitano-polioxietilentiocianatometal determinado en la etapa (f).

50 El término "polisorbato" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier éster de ácido graso de
polioxietilensorbitano (polisorbatos). Los polisorbatos preferidos incluyen polisorbato 20, 40, 60 y 80. Se prefiere
particularmente polisorbato 80. Dicho polisorbato 80 puede ser de origen animal o vegetal.

55 El término "muestra que contiene proteínas" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier
muestra que contiene al menos una proteína. La muestra puede, por ejemplo, derivarse de un procedimiento para la
producción de proteínas recombinantes, en el que la muestra puede tomarse en cualquier punto de dicho
procedimiento, o puede ser el producto final de dicho procedimiento. Además, la muestra puede, por ejemplo,
60 derivarse de un procedimiento para la producción de proteínas derivadas de plasma sanguíneo, en el que la muestra
puede tomarse en cualquier punto del procedimiento, o puede ser el producto final de dicho procedimiento.
Preferiblemente, la muestra se toma tras una etapa de inactivación vírica en un procedimiento para la producción de
proteínas derivadas de plasma sanguíneo. Por consiguiente, la(s) proteína(s) contenida(s) en la muestra puede(n)
ser una o más proteína(s) de plasma sanguíneo. Además, la muestra que contiene proteínas puede ser plasma
sanguíneo. Además, la muestra que contiene proteínas puede ser una muestra que contiene vacunas y/o péptidos.

65 La muestra que contiene proteínas puede contener además iso-octilfenol polioxietileno éter (Triton™ X-100) y/o
fosfato de tri-n-butilo (TNBP), que pueden haberse añadido, por ejemplo, en una etapa de inactivación vírica en un
procedimiento para la producción de proteínas derivadas de plasma sanguíneo.

Puesto que moléculas grandes como las proteínas pueden contener entidades estructurales, formadas por un

conjunto de aminoácidos hidrófobos e hidrófilos, que pueden imitar características de detergente, también pueden interferir en tales ensayos de determinación. La unión de detergente a estructuras de proteínas también puede influir en la determinación impidiendo la formación de complejos lo que da como resultado una recuperación menor del analito. Por tanto, antes de la determinación colorimétrica, las proteínas concomitantes han de ser destruidas con el fin de proporcionar resultados no sesgados para evitar esta interferencia. La precipitación de proteínas usando un disolvente como etanol es una posibilidad para eliminar la proteína antes de realizar el ensayo. Sin embargo, dado el hecho de que mezclas de proteínas complejas también pueden contener proteínas de bajo peso molecular tales como apolipoproteína A1 o proteínas como la α_1 -glicoproteína ácida que apenas precipitan a concentraciones útiles de etanol, la aplicación de esta etapa de preparación de muestras está bastante limitada. En su lugar, la presente invención adopta un pretratamiento de la muestra que se basa en la hidrólisis alcalina, particularmente a temperaturas elevadas. En esas condiciones, como se ejemplifica más tarde adicionalmente, las proteínas se destruirán hasta un grado en el que ya no pueden ejercer su influencia de interferencia en el ensayo. Aunque la hidrólisis aplicada no dará como resultado una descomposición total de la proteína para dar aminoácidos, fue de manera sorprendente lo suficientemente rigurosa como para eliminar reacciones de falsos positivos así como unión del detergente.

Etapa (a) del método de la presente invención, es decir someter la muestra a hidrólisis alcalina, comprende tratar la muestra con al menos NaOH 3 N a una temperatura de 95 °C a 100 °C durante al menos 45 minutos. El agente alcalino es al menos NaOH 3 N, más preferiblemente aproximadamente NaOH 10 N. La duración del tratamiento alcalino es preferiblemente como mucho de 120 minutos, más preferiblemente como mucho de 90 minutos. En una realización particularmente preferida, la duración del tratamiento alcalino es de entre 45 y 90 minutos, más preferiblemente de entre 45 minutos y 75 minutos, más preferiblemente de entre 50 minutos y 70 minutos, y lo más preferiblemente de 60 minutos.

Etapa (b) del método de la presente invención, es decir neutralizar la muestra tras la hidrólisis alcalina, comprende preferiblemente neutralizar la muestra con un ácido, por ejemplo ácido acético, a un pH de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 8. Otros ácidos que pueden usarse en este contexto incluyen ácido fórmico, ácido propiónico, ácido butírico, ácido láctico, ácido hidroxibutírico, ácido alcanomonocarboxílico y cicloalcanomonocarboxílico, ácidos dicarboxílicos y ácidos tricarboxílicos.

Según la presente invención, la etapa (c) del método de la presente invención, es decir retirar precipitado desnaturalizado de la muestra neutralizada, se realiza mediante filtración, si realmente se realiza puesto que depende de la disolución de proteínas, y comprende filtrar la muestra con un filtro que no se une a polioxietilensorbitano. En una realización preferida, el filtro es un filtro hidrófilo, por ejemplo un filtro compuesto por acetato de celulosa. El tamaño de poro del filtro no está particularmente limitado, siempre que el precipitado se retenga suficientemente, y puede ser, por ejemplo, de 0,22 μm .

El complejo de tiocianatometal añadido en la etapa (d) es preferiblemente una mezcla acuosa de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ y NH_4SCN y el complejo de sorbitano-polioxietilentiocianatometal formado es un complejo de sorbitano-polioxietilentiocianatocobaltato (II).

La mezcla acuosa de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ y NH_4SCN añadida preferiblemente a la muestra filtrada en la etapa (d) del método de la presente invención contiene preferiblemente del 1 % (p/v) al 4 % (p/v), preferiblemente del 1,5 % (p/v) al 4 % (p/v), más preferiblemente del 2 % (p/v) al 4 % (p/v), y lo más preferiblemente el 3 % (p/v) de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ y del 10 % (p/v) al 30 % (p/v), preferiblemente del 15 % (p/v) al 25 % (p/v), más preferiblemente el 20 % (p/v) de NH_4SCN en agua destilada.

Preferiblemente, el disolvente orgánico inmiscible con agua usado en la etapa (e) del método de la presente invención para la extracción del complejo de sorbitano-polioxietilentiocianatometal formado en la etapa (d) se selecciona del grupo que consiste en cloroformo, cloruro de metileno, o-diclorobenceno, bromoformo y tricloroetileno, en el que se prefiere particularmente cloruro de metileno.

Además, la absorbancia del extracto obtenido en la etapa (e) del método de la presente invención se mide preferiblemente en la etapa (f) en un intervalo de entre 300 nm y 340 nm, más preferiblemente de entre 310 nm y 330 nm, lo más preferiblemente a 324 nm. Un experto en la técnica conoce métodos para medir la absorbancia de una muestra a una o más longitudes de onda particulares e incluyen, por ejemplo, el uso un espectrofotómetro UV/VIS convencional.

Además, un experto en la técnica conoce métodos para realizar la etapa (g) del método de la presente invención, es decir calcular la cantidad del polisorbato contenido en la muestra a partir de la cantidad de dicho complejo de sorbitano-polioxietilentiocianatometal determinado en la etapa (f).

En una realización preferida, el método de la presente invención comprende además tras la etapa (a) y antes de la etapa (b) una etapa de enfriar la muestra tras la hidrólisis alcalina, preferiblemente hasta temperatura ambiente. Además, el método de la presente invención puede comprender tras la etapa (b) y antes de la etapa (c) una etapa de mantener la muestra a temperatura ambiente durante al menos 15 minutos, preferiblemente al menos 30 minutos,

para permitir la formación completa de un posible precipitado desnaturalizado.

Con el fin de evitar pérdidas de analito debido a la adsorción inespecífica de cualquier polisorbato a la superficie del envase de muestra, por ejemplo a una superficie de plástico, el método de la presente invención puede comprender una etapa de mezclar la muestra con una disolución de proteínas, por ejemplo una disolución de albúmina, antes de la hidrólisis alcalina. Tal adsorción puede producirse particularmente con muestras que tienen un bajo contenido en proteínas, por ejemplo un contenido en proteínas por debajo de 1 mg/ml.

Además, el método de la presente invención puede comprender una etapa de establecer una curva patrón usando muestras que tienen concentraciones conocidas de polisorbato y una o más proteínas para la calibración de las mediciones de absorbancia. Un experto en la técnica conoce métodos para establecer una curva patrón respectiva.

Las figuras muestran:

La figura 1 muestra los resultados de la medición colorimétrica de polisorbato tras tiempos de hidrólisis de entre 15 y 120 min a 100 °C. Los puntos de datos son la media de dos mezclas de hidrólisis independientes que se diferenciaron en menos del 4 % cuando se realizó la hidrólisis alcalina durante al menos 60 minutos.

La figura 2 muestra los resultados de 21 determinaciones de una muestra de control que contiene 100 ppm de polisorbato 80 para determinar la precisión y linealidad del ensayo. Se indica el intervalo de dos desviaciones estándar de la media.

La figura 3 muestra gráficas de calibración de muestras con adiciones conocidas de polisorbato 80 derivado de fuentes bovinas y vegetales, respectivamente, con (B) o sin ningún pretratamiento de la muestra (A).

La figura 4 muestra las curvas de calibración de polisorbato 80 y Triton™ X-100 sin pretratamiento de la muestra (A), así como de polisorbato 80 y una mezcla de polisorbato 80, fosfato de tri-n-butilo (TNBP) y Triton™ X-100 tras la hidrólisis alcalina (B).

La presente invención se ilustrará adicionalmente en los siguientes ejemplos que no suponen ninguna limitación de la misma.

Ejemplos

Materiales:

Todos los productos químicos usados fueron de calidad analítica a menos que se indique lo contrario. Se adquirió NaOH, ácido acético al 96 %, nitrato de cobalto hexahidratado ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), cloruro de metileno (Lichrosolv™), Triton™ X-100, fosfato de tri-n-butilo (TNBP) y tiocianato de amonio (NH_4SCN) de Merck (Alemania). Se adquirieron dos lotes de polisorbato 80 (Tween™ 80) de fuente bovina así como de fuente vegetal de ICI (EE.UU.). Se prepararon disoluciones acuosas del detergente con un contenido del 1 % (p/v) y se usaron posteriormente para el análisis.

Se investigó la influencia de diversas proteínas plasmáticas en la exactitud del ensayo usando concentrados y productos intermedios de fraccionamiento de proteínas plasmáticas de Baxter BioScience (Viena, Austria). Brevemente, se usaron los siguientes concentrados de proteína plasmática humana para investigar la idoneidad del pretratamiento de la muestra mediante hidrólisis alcalina: albúmina, inmunoglobulina, antitrombina, proteína C, concentrado de complejo de protrombina activado y no activado de desarrollo (aPCC y PCC), concentrado de factor IX de alta pureza, y orosomucoide (α_1 -glicoproteína ácida). Finalmente, también se realizó el método en plasma completo, usando plasma humano liofilizado de referencia suministrado por Baxter (Baxter BioScience Diagnostics Division, Viena, Austria).

La hidrólisis alcalina en sí se llevó a cabo en tubos de polipropileno de 100 x 15 mm con tapones de rosca (Greiner, Austria), y la posterior determinación colorimétrica en tubos de vidrio con tapones de rosca. Se usaron filtros de 0,22 μm MINISART (Sartorius, Alemania). La medición colorimétrica se realizó en un espectrofotómetro LKB Ultrospec K4053 usando cubetas de cuarzo Suprasil de 1 cm con tapones de rosca (Hellma, Alemania). Se mantuvo la temperatura ambiente (20-25 °C) durante todas las etapas del procedimiento excepto en la hidrólisis.

Ejemplo 1: Hidrólisis alcalina

A un tubo de polipropileno que contenía 1 ml de muestra, se le añadió patrón o control con un contenido en polisorbato de menos de 400 mg/l = 400 ppm, 0,5 ml de NaOH 10 M. Se mantuvo la disolución en un baño de agua hirviendo durante 60 ± 10 min. Tras enfriar hasta temperatura ambiente, se neutralizaron los hidrolizados alcalinos a pH ~ 7 a 8 con 0,5 ml de ácido acético 10 M comprobando el pH con tiras indicadoras (Merck, Alemania). Tras la neutralización, se mantuvieron las muestras a temperatura ambiente durante al menos 30 min. Según la disolución

de proteínas, se produjo un precipitado, que se retiró mediante filtración usando un filtro Minisart de 0,22 μm antes del procedimiento de la determinación colorimétrica. Se mezclaron muestras con un contenido en proteínas de menos de 1 mg/ml con una disolución de albúmina antes de la hidrólisis con el fin de evitar pérdidas de analito debido a adsorción inespecífica a superficies de plástico, que puede producirse durante el procedimiento. La adición de 0,1 ml de una disolución de albúmina humana con una concentración de 200 mg/ml a 1 ml de la respectiva muestra demostró ser eficaz para la prevención de pérdidas inespecíficas de polisorbato 80. Esta dilución de la muestra se ha tenido en cuenta tras el cálculo de la concentración de polisorbato de la muestra.

Ejemplo 2: Medición colorimétrica

Se realizó la determinación colorimétrica tal como sigue a continuación. Brevemente, se mezcló 1 ml de un hidrolizado de proteína neutralizada o una disolución acuosa de polisorbato, que prácticamente no contenía proteínas, con 3 ml de reactivo de tiocianatocobaltato. Este reactivo contenía el 3 % (p/v) de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ y el 20 % (p/v) de NH_4SCN disueltos en agua destilada, y se preparó nuevo cada día. Entonces, se añadieron 2 ml de cloruro de metileno. Tras agitación vigorosa, se permitió que las fases se separaran durante al menos 30 min a 20-25 °C. Finalmente, se midió espectrofotométricamente la fase de cloruro de metileno en cubetas con tapones de rosca frente a un blanco de cloruro de metileno a 320 nm.

Ejemplo 3: Calibración del ensayo

Se calibró el ensayo analizando diluciones patrón que cubrían un intervalo de desde 10 hasta 400 ppm de polisorbato 80. Se prepararon estas disoluciones patrón mediante adiciones conocidas de una disolución de proteínas con disoluciones acuosas de polisorbato. Puesto que las condiciones de hidrólisis aquí descritas destruyen prácticamente la influencia de cualquier disolución de proteínas sometida a prueba hasta ahora, debería ser adecuada cualquier disolución de proteínas, incluyendo plasma completo. Sin embargo, siguiendo el principio de comparar similares entre sí, se seleccionó una disolución de proteínas plasmáticas, que era lo más similar posible a la disolución de interés. Por tanto, se construyó una curva patrón que cubría un intervalo de 10 a 400 ppm de polisorbato 80 que contenía las concentraciones 5, 10, 20, 50, 100, 200 y 400 ppm usando PCC de desarrollo y se analizó por duplicado cada vez que se realizó el ensayo.

Ejemplo 4: Optimización del tiempo de hidrólisis

Con el fin de establecer un tiempo de hidrólisis apropiado, se seleccionó aPCC de desarrollo (concentrado de complejo de protrombina activado) como matriz de proteína que ya se conoce que interfiere sustancialmente con la determinación colorimétrica de polisorbato 80. Aunque esta matriz prácticamente no contenía detergente, se observó una reacción de falso positivo tras el análisis de esta disolución después de intentar la retirada de proteínas mediante precipitación con etanol. Con una concentración de proteínas de aproximadamente 25 mg/ml, a esta matriz, que contiene un amplio espectro de diferentes proteínas plasmáticas, tales como protrombina, inhibidor de inter- α -tripsina, complemento y vitronectina, se añadieron 100 ppm de polisorbato 80. Se realizó hidrólisis alcalina tal como se describió, manteniendo las muestras entre 15 y 120 min en el baño de agua hirviendo. Se realizó el procesamiento adicional tal como se describió anteriormente.

Los resultados de la medición colorimétrica de polisorbato tras tiempos de hidrólisis de entre 15 y 120 min a 100 °C se muestran en la figura 1. La matriz de proteína seleccionada, que ya se sabía que contenía componentes que producían una reacción de falso positivo tras la determinación después de la precipitación de proteínas con etanol, no mostró reacción de falso positivo incluso después de un periodo de tiempo muy corto de hidrólisis. Tras una hidrólisis de 15 minutos a 100 °C, no fue posible recuperar completamente los 100 ppm de polisorbato 80 añadidos, y solamente se encontró el 79 % de la cantidad añadida. Este nivel de recuperación fue el más bajo encontrado en el estudio, y mostró adicionalmente una desviación estándar más alta en comparación con las otras recuperaciones obtenidas tras la hidrólisis prolongada. Por tanto, la hidrólisis alcalina corta no fue suficiente para eliminar completamente la interferencia de proteínas en el ensayo, y se observó una menor recuperación, lo que indicaba que probablemente una asociación relativamente estrecha entre proteína y detergente podía evitar la participación del detergente en la determinación colorimétrica. Sin embargo, la hidrólisis alcalina realizada a lo largo de 30 min produjo una recuperación del 90 %, y las siguientes muestras analizadas tras 45, 60, 90 y 120 min, respectivamente, mostraron recuperaciones del 100 %, el 99 %, el 99 % y el 97 %, respectivamente, cada valor caracterizado por un coeficiente de variación por debajo del 2,5 %. Según estos hallazgos, se eligió un tiempo de hidrólisis de 60 ± 10 min para los demás experimentos.

Ejemplo 5: Exactitud del ensayo en diferentes matrices de proteína plasmática

Las directrices oficiales para el método de validación definen que la exactitud de un procedimiento analítico expresa el grado de aproximación entre un valor verdadero y el valor encontrado. Hay varios enfoques para valorar la exactitud de un método analítico. Puesto que no hay material de referencia certificado para polisorbato 80 en presencia de proteínas plasmáticas, se siguió el enfoque de realizar adiciones conocidas de una muestra de referencia de blanco con una concentración conocida de analito. Se eligió este enfoque de realizar adiciones conocidas de disoluciones de proteína relevantes por la influencia ya conocida de proteínas en el ensayo. Debido a

las diferencias en la estructura primaria, secundaria y terciaria, la resistencia de proteínas frente a tratamiento con álcali puede diferir considerablemente, siendo el procedimiento aplicado para la determinación de polisorbato 80 menos vigoroso que la hidrólisis alcalina total que comprende calentar durante 15 horas a 120 °C.

5 Con el fin de investigar si las condiciones de hidrólisis alcalina usadas en este caso eran suficientes para permitir el análisis exacto de polisorbato 80 en matrices de proteína muy diferentes, se emplearon disoluciones de proteína plasmática incluyendo albúmina, inmunoglobulina, orosomucoide, antitrombina, proteína C y factores de coagulación así como plasma completo para comprobar la recuperación de polisorbato 80. La concentración de proteína de las muestras investigadas osciló entre 1 y 50 mg/ml. La tabla 1 contiene los resultados de los experimentos de adiciones
10 conocidas, en los que se añadieron 10 ppm, 50 ppm, 100 ppm o 200 ppm de polisorbato 80 a las matrices de blanco.

Tabla 1: Recuperación de polisorbato 80 (p80) en diferentes disoluciones de proteína plasmática

Proteína plasmática	concentración [mg/ml]	Recuperación de polisorbato 80 [% de cantidad añadida]			
		10 ppm de p80	50 ppm de p80	100 ppm de p80	200 ppm de p80
plasma	30	-*)	-	106	104
PCC activado	30	94	-	104	-
PCC activado	10	100	-	106	-
albúmina	20	-	-	102	100
IgG	20	-	-	90	93
PCC	30	-	-	98	96
antitrombina	20	-	99	98	-
proteína C	6	-	99	-	-
orosomucoide	50	-	99	-	-
factor IX conc.	1	-	102	-	-

15 *) -: no determinado

En todas las disoluciones de proteína investigadas, se encontraron recuperaciones de entre el 90 % y el 106 % de la cantidad añadida de polisorbato 80. Con estos resultados, todas las muestras sometidas a prueba cumplieron los
20 criterios para los datos de recuperación en función de la concentración de analito publicados por la AOAC (American Association of Official Analytical Chemists). Según estas especificaciones, deben recuperarse 100 ppm de analito con del 90 % al 107 %, mientras que los límites para la recuperación de 10 ppm son del 80 % al 110 % con el fin de garantizar un resultado fiable. Los resultados demuestran que las condiciones de hidrólisis aplicadas son adecuadas para eliminar la influencia perturbadora de la proteína, independientemente del tipo de proteína, al menos en las
25 concentraciones de proteína investigadas. Esto se mostró incluso en la matriz de plasma, conocida por ser muy compleja y que contenía varios cientos de proteínas diferentes, pero también componentes de bajo peso molecular. Las cantidades añadidas de 100 ppm así como 200 ppm de polisorbato 80 podían recuperarse con desviaciones de menos del 6 %. Además, ninguna de las proteínas purificadas con adiciones conocidas de polisorbato impidió una recuperación satisfactoria, aunque se sometieron a prueba proteínas no relacionadas estructuralmente a diferentes
30 concentraciones. Por tanto, por ejemplo la proteína altamente glicosilada orosomucoide, una proteína muy ácida con un punto isoeléctrico por encima de 3 conocida por unirse a diversos fármacos, así como albúmina, que puede unirse a ácidos grasos, no inhibieron la determinación, ni siquiera a las altas concentraciones empleadas. Incluso a una concentración de adiciones conocidas de 10 ppm de polisorbato 80, que es el límite de la cuantificación, el ensayo dio resultados exactos independientes de la concentración de proteína presente. Se realizaron adiciones
35 conocidas de aPCC de desarrollo en concentraciones de 10 y 30 mg de proteína/ml con 10 ppm de polisorbato, e independientemente de la concentración de proteína en el ensayo, se obtuvieron recuperaciones del 94 % y el 100 %, cumpliendo por tanto de nuevo las recomendaciones de la AOAC dadas anteriormente.

40 Ejemplo 6: Linealidad y precisión del ensayo

Según directrices oficiales para la validación de métodos analíticos, la precisión de un método es el grado de concordancia de los resultados de pruebas individuales de múltiples determinaciones de series de muestras, mientras que la linealidad de un procedimiento analítico describe su capacidad para obtener resultados de prueba que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra. Con el fin de describir estos
45 parámetros de rendimiento esenciales del ensayo, se usó una muestra de control con 100 ppm de polisorbato 80 en PCC de desarrollo. Los resultados del análisis se muestran en la figura 2. Usando 21 determinaciones de la muestra de control, el promedio de la muestra tenía una desviación estándar (DE) relativa del 4,0 % y el 3,7 % para la precisión en el ensayo y entre ensayos, respectivamente. Ambas desviaciones cumplen la recomendación dada por la AOAC, que es del 5,3 % para la precisión dentro de o entre días de medición de 100 ppm de analito. Sólo una de
50 21 determinaciones produjo un valor fuera del intervalo definido por la desviación estándar doble, pero se incluyó en el intervalo de la media ± 3 DE. La gráfica también muestra las variaciones en el ensayo marcadas por barras de

error. La precisión del ensayo se investigó adicionalmente a una concentración de 20 ppm, en la que se encontró un valor del 3,0 %. Se analizó el análisis de una muestra extraída durante el procedimiento de inactivación con la alta concentración de 150 g de polisorbato 80/l con una desviación estándar promedio del 2,9 % (n = 6), confirmando por tanto que el método también es adecuado para medir altas concentraciones que se producen durante el procedimiento de inactivación vírica.

Las gráficas de calibración del ensayo que cubren un intervalo de 5 a 400 ppm de polisorbato 80 mostraron una buena linealidad, produciendo un coeficiente de correlación medio $r = 0,999$ (n = 21) entre la concentración y la extinción medida a 320 nm. La pendiente de la recta se caracterizó mediante una variación entre ensayos del 7,7 % (n = 21) y se encontró que el límite de la cuantificación (LC) era de $10 \text{ ppm} \pm 0,4 \text{ ppm}$ calculado según las recomendaciones de la ICH.

Ejemplo 7: Comparación de polisorbato de diferente origen

Para evaluar si el origen de polisorbato 80 tiene un impacto en el rendimiento del análisis, se compararon lotes de fuentes vegetales y bovinas. Se analizaron ambas formas en presencia de la disolución de proteínas descrita anteriormente siguiendo el mismo procedimiento de hidrólisis alcalina. Adicionalmente, se realizó la determinación colorimétrica con el reactivo de tiocianatocobaltato sin pretratamiento de la muestra en ausencia de proteínas, imitando por tanto las condiciones presentes tras el intento de precipitación con etanol para retirar proteína.

Las preparaciones de polisorbato 80 usadas inicialmente para la inactivación vírica se habían producido a partir de sebo bovino. Con la aparición de la encefalitis espongiforme bovina (BSE), se volvió esencial evitar material bovino en la fabricación de proteínas terapéuticas y cambiar a detergente de origen vegetal. Desde entonces, el polisorbato 80 ha estado disponible en ambas formas, y ya se usa Tween 80 de origen vegetal en los procedimientos de inactivación vírica en la fabricación biofarmacéutica.

Con el fin de valorar el impacto de este cambio a grasas vegetales como material de fuente, que se diferencian del sebo en la composición de ácidos grasos constituyentes y pueden presentar un perfil de ácidos grasos presuntamente diferente de la fracción rica en ácido oleico, se comparó la reactividad de ambas preparaciones de polisorbato usando un ensayo sin ningún pretratamiento adicional de la muestra. Los resultados se muestran en la figura 3A, en la que se muestran ambas gráficas de calibración. Las gráficas obtenidas difieren en sus pendientes: el polisorbato de origen vegetal muestra una respuesta obviamente más alta comparando cantidades iguales de material, produciendo una pendiente de 0,0025 en comparación con 0,0023 de detergente de origen animal. Además, tras el análisis de varios lotes de ambos polisorbatos, podía confirmarse que esta observación no estaba relacionada con los lotes. Estos hallazgos se respaldaron adicionalmente mediante los resultados mostrados en la figura 3B, en la que se muestra que ambas gráficas de calibración obtenidas tras la hidrólisis alcalina son indistinguibles.

La sensibilidad del ensayo expresada en términos de la pendiente de la gráfica de calibración es algo más baja que sin hidrólisis alcalina. Por tanto, se encontró una pendiente promedio de 0,0021 tras la hidrólisis alcalina, que es más baja que el valor obtenido sin hidrólisis. Esto sugiere que la parte de ácidos grasos sin hidrolizar del detergente también puede estar implicada en la formación o influir en la capacidad de extracción del complejo.

Ejemplo 8: Evaluación de la selectividad del ensayo con respecto a Triton™ X-100

Se investigó la selectividad del ensayo con respecto al detergente estrechamente relacionado iso-octilfenol polioxietileno éter (Triton™ X-100) así como al disolvente fosfato de tri-n-butilo (TNBP), estando ambos incluidos en el procedimiento de disolvente-detergente establecido para la inactivación vírica. Por tanto, se analizaron disoluciones acuosas que contenían Triton™ X-100 y polisorbato 80 sin hidrólisis alcalina con el fin de evaluar la selectividad de la determinación colorimétrica. Además, se comparó la respuesta de una mezcla de inactivación de disolvente-detergente ternaria que contenía Triton™ X-100, polisorbato 80 y TNBP en la razón de 1:0,3:0,3 % (p/v) con una disolución de polisorbato 80 tras la hidrólisis alcalina. De nuevo, el aPCC de desarrollo en una concentración de proteínas de aproximadamente 25 mg/ml sirvió como matriz de proteína. Finalmente, se evaluó la influencia de concentraciones muy altas de Triton X-100 en el ensayo tras el pretratamiento de la muestra con hidrólisis alcalina tanto en presencia como en ausencia de proteína. Para estos experimentos, se aplicaron concentraciones de Triton™ X-100 de 100, 300, 1000, 2000, 5000 y 10.000 ppm.

Una mezcla de inactivación vírica de disolvente-detergente (SD, *solvent-detergent*) muy frecuentemente usada consiste en una fórmula ternaria de TNBP y los dos detergentes estrechamente relacionados Triton™ X-100 y polisorbato 80. Por tanto, se quiso conocer si el ensayo es capaz de distinguir entre estos detergentes estructuralmente relacionados. Ambos contienen grupos polietoxi, que participan en la determinación colorimétrica, de manera que no es extraño que Triton™ X-100 pueda detectarse también en el ensayo original. La figura 4A compara la respuesta de ambos detergentes en el ensayo sin ningún pretratamiento de la muestra. La reactividad de ambos detergentes medida en el intervalo de 12 a 200 ppm difirió marcadamente. Triton™ X-100 dio solo aproximadamente el 70 % de la respuesta de polisorbato 80 a lo largo de todo el intervalo de concentraciones.

Debido a estos hallazgos, y particularmente al hecho de que ambos detergentes tienen diferentes factores de respuesta, no puede usarse el ensayo original si ambos detergentes están presentes. Se observa un efecto totalmente diferente si se incluye el pretratamiento de la muestra mediante hidrólisis alcalina en el ensayo. La figura 4B presenta la gráfica de calibración de la mezcla de SD ya descrita anteriormente que consiste en Triton™ X 100, polisorbato 80 y TNBP en la razón del 1,0:0,3:0,3% (p/v) en comparación con polisorbato 80 solo. Prácticamente no pueden observarse diferencias al comparar los parámetros relevantes, pendiente y ordenada en el origen de las gráficas de calibración. Tal como se muestra en la tabla 2, no difieren ni la pendiente, que es en ambos casos de 0,0023, ni la ordenada en el origen, siendo que es de -0,005 para polisorbato y de -0,007 para la mezcla de SD.

10 Tabla 2: Reactividad de Triton™ X-100 con y sin hidrólisis alcalina

	sin hidrólisis		con hidrólisis	
	polisorbato 80	Triton™ X-100	polisorbato 80	disolución de SD
pendiente	0,0048	0,0035	0,0023	0,0023
ordenada en el origen	-0,0309	-0,0358	-0,005	-0,007

Estos resultados muestran que a pesar de la concentración tres veces más alta de Triton™ X-100, el ensayo puede aplicarse para analizar la concentración de polisorbato 80 en la mezcla de SD sin ninguna interferencia detectable por el detergente estrechamente relacionado Triton™ X-100. De manera sorprendente, la hidrólisis alcalina es capaz de potenciar la selectividad de la determinación colorimétrica. Se realizaron experimentos adicionales para aclarar si la reactividad de Triton™ X-100 se destruye completamente o hasta cierto grado únicamente. Tal como se resume en la tabla 4, las disoluciones que contenían menos de 300 µg/ml de Triton™ X-100 no mostraron ninguna respuesta medible y, por consiguiente, no tenían impacto sobre los valores medidos. Por tanto, la hidrólisis alcalina condujo a un aumento sustancial en la selectividad del ensayo tal como se muestra en el experimento, en el que un exceso de 30 veces de Triton™ X-100 no mostró ningún impacto medible ni siquiera en la señal de solamente 10 ppm de polisorbato 80. Incluso las concentraciones de Triton™ X-100 de entre 1000 y 10.000 ppm, que excedían con mucho el intervalo de concentración calibrado de polisorbato 80, se encontró que reaccionaban únicamente de manera moderada, demostrando que se eliminó casi el 99 % de la reactividad de Triton™ X-100 mediante la hidrólisis alcalina realizada antes de la determinación colorimétrica.

Tabla 3: Reactividad de Triton™ X-100 tras la hidrólisis alcalina

Triton™ X-100 en ppm	100	300	1000	2000	5000	10.000
% de recuperación	<5	<1,7	1,5	1,3	1,5	1,4

30 Conclusiones

Los resultados de los experimentos anteriores con diferentes tiempos de hidrólisis (véase el ejemplo 4) mostraron que un tratamiento con álcali de tan solo 15 min ya era suficiente para reducir la influencia de una disolución de proteínas dada, que se había mostrado previamente que provoca una clara sobrestimación de la concentración de polisorbato aplicando precipitación de proteínas con etanol. Pudo demostrarse que con numerosas proteínas diferentes en carga y tamaño, el polisorbato 80 podía analizarse sin interferencia sustancial de la matriz de proteína (véase el ejemplo 5). En particular, pudieron determinarse 50 µg de polisorbato 80/ml con una recuperación del 99 % en orosomucoide (α_1 -glicoproteína ácida) a una concentración de proteínas de aproximadamente 50 mg/ml. El hecho de que esta proteína muy ácida pudiera analizarse sin ninguna interferencia demuestra la idoneidad del pretratamiento de la muestra mediante hidrólisis alcalina. Además, no ha sido difícil determinar el polisorbato 80 en albúmina, una proteína que se conoce bien que se une a ácidos grasos. Puesto que el polisorbato 80 contiene un promedio de un único residuo de ácido graso por molécula, puede producirse una unión del resto lipófilo a albúmina. No obstante, las recuperaciones en albúmina no dieron a lugar a preocupaciones en este aspecto.

Una interferencia por compuestos biológicos de bajo peso molecular tal como están presentes en plasma (tal como por ejemplo aminoácidos, azúcares, péptidos, urea, creatinina) también puede evitarse ventajosamente mediante hidrólisis alcalina. El plasma completo contiene por ejemplo algunos componentes no especificados adicionalmente que no precipitarán con etanol. La idoneidad del método de la presente invención se demostró satisfactoriamente con plasma diluido aproximadamente a la mitad hasta un contenido en proteínas de 30 mg/ml. Por tanto, pudo demostrarse la idoneidad de la hidrólisis alcalina en disoluciones de proteína muy diferentes. Al mismo tiempo, los resultados de todos los experimentos de recuperación realizados cumplieron los criterios recomendados por la AOAC para métodos verificados por homólogos y la precisión hallada permite la introducción de este sistema como parte de programas de control de calidad.

La aparición de BSE condujo a una comprobación cuidadosamente realizada de todos los materiales auxiliares usados en la industria de fraccionamiento de plasma. Las grasas vegetales sustituyeron al sebo bovino como material de partida para el ácido oleico en polisorbato 80. Al comparar los materiales de diferentes fuentes usados para la síntesis con respecto al procedimiento de fraccionamiento más bien en bruto para el enriquecimiento de ácido oleico, se hace obvio que la composición de ácidos grasos de polisorbatos obtenidas a partir de o bien grasa

bovina o bien vegetal puede diferir al menos ligeramente. La mayoría de grasas vegetales comunes se caracterizan por un contenido mayor de ácidos grasos C_{18} poliinsaturados en comparación con sebo bovino. Se observó que los polisorbatos Tween™ 20 (éster de ácido láurico), Tween™ 40 (éster de ácido palmítico) y Tween™ 80 (éster de ácido oleico) tenían diferentes propiedades de formación de complejos para tiocianatocobaltato lo que da como resultado una menor extinción del complejo acuoso a 620 nm para Tween™ 80 que para Tween™ 20 y 40. Mientras que el perfil de ácidos grasos de Tween™ 80 que contenía ~ el 80 % de ácido oleico es el más homogéneo y significativamente diferente de los de Tween™ 20, 40 y 60 (éster de ácido esteárico), las pequeñas diferencias en la composición de ácidos grasos entre el polisorbato 80 de origen vegetal y animal pueden explicar, lo más probablemente, la diferencia medida observada como la mayor reactividad del material de origen vegetal sin preparación de muestra. Esta explicación está apoyada adicionalmente por el hecho de que una diferencia de este tipo entre polisorbatos de ambas fuentes podría eliminarse totalmente mediante hidrólisis alcalina (véase el ejemplo 7). Este tratamiento de muestra no solamente dará como resultado una descomposición de proteínas, sino que también provocará saponificación del polisorbato que da como resultado escisión del resto de ácido graso del detergente, que entonces no puede ni sesgar la determinación colorimétrica ni la capacidad de extracción del complejo formado. Cualquier variación del resto de ácido graso del detergente ya no influirá en la determinación, y la robustez del método podría potenciarse significativamente. Explicando y eliminando esta diferencia inesperada entre ambas variantes de polisorbato 80, el principio básico de comparar similares entre sí parece perder importancia en este caso, y la calibración del ensayo puede realizarse usando polisorbato 80 independientemente de la fuente.

Con los hallazgos iniciales de un límite de cuantificación de 30 ppm de polisorbato 80 a 620 nm obtenido con un método colorimétrico desarrollado para proteínas recombinantes y no caracterizado adicionalmente, el LC de 10 ppm de polisorbato 80 a 320 nm determinado en estos experimentos concuerda bien, puesto que el coeficiente de extinción a $\epsilon_{320\text{ nm}}$ es aproximadamente seis veces mayor que a $\epsilon_{620\text{ nm}}$. Un descubrimiento incluso más importante es la potenciación ventajosa de la selectividad mediante hidrólisis alcalina hacia polisorbato. La respuesta colorimétrica del iso-octilfenol polioxietilén éter Triton™ X-100, ya que a menudo se aplica en combinación con polisorbato, puede eliminarse hasta que se hace posible la cuantificación de ambos detergentes polioxietilados (sin hidrólisis para polisorbato y Triton™ X-100 en resumen, y para Triton™ X-100 tras hidrólisis mediante sustracción de la concentración de polisorbato residual) (véase el ejemplo 8). Puesto que el puente de polioxietilén,-fenol éter puede ser propenso lo más probablemente a hidrólisis alcalina de manera similar a los β -hidroxilalquilfenol éteres de la lignina de madera, tras la escisión del éter, se liberaba una cadena de polietilenglicol corta libre ($n_{av} \sim 9$), de la que no se extrae presuntamente el complejo de tiocianatocobaltato de manera cuantitativa en la fase orgánica, sino aparentemente solo hasta como mucho el 1,5 %. Por tanto, incluso a una concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$ de Triton X-100 no muestra interferencia medible.

Resumiendo todos los resultados, con la introducción del pretratamiento de la muestra es posible realizar un método muy sencillo y versátil para la determinación de polisorbato tal como polisorbato 80 en presencia de proteínas plasmáticas y además también en presencia de Triton™ X-100. El método puede realizarse con una precisión y exactitud apropiadas, permitiendo por tanto una determinación de la concentración de, por ejemplo, polisorbato 80 durante el procedimiento de inactivación vírica así como en el envase final. Además, la etapa de hidrólisis alcalina diseñada principalmente para permitir el rendimiento del ensayo en presencia de proteínas independientemente de la naturaleza de la disolución de proteínas resultó potenciar la selectividad del ensayo respecto a la interferencia por el detergente aplicado a menudo Triton™ X-100. Finalmente, el método también se hizo robusto frente a alteraciones del resto de ácido graso de polisorbato, cuya saponificación evitó cualquier contribución a la determinación colorimétrica.

REIVINDICACIONES

1. Método para la determinación de polisorbato en una muestra que contiene proteínas, que comprende las etapas de:
 - (a) someter la muestra a hidrólisis alcalina con al menos NaOH 3 N a una temperatura de 95 °C a 100 °C durante al menos 45 minutos;
 - (b) neutralizar la muestra tras la hidrólisis alcalina;
 - (c) retirar opcionalmente precipitado desnaturalizado de la muestra neutralizada mediante filtración;
 - (d) añadir una mezcla acuosa de un complejo de tiocianatometal a la muestra opcionalmente filtrada para formar un complejo de sorbitano-polioxiethylentiocianatometal;
 - (e) extraer dicho complejo de sorbitano-polioxiethylentiocianatometal formado en la etapa (d) en un disolvente orgánico inmiscible con agua;
 - (f) medir la absorbancia del extracto obtenido en la etapa (e) para cuantificar la cantidad de dicho complejo de sorbitano-polioxiethylentiocianatometal formado en la etapa (d); y
 - (g) calcular la cantidad del polisorbato contenido en la muestra a partir de la cantidad de dicho complejo de sorbitano-polioxiethylentiocianatometal determinado en la etapa (f).
2. Método según la reivindicación 1, en el que el polisorbato es monooleato de polioxiethylensorbitano (polisorbato 80).
3. Método según la reivindicación 2, en el que el polisorbato 80 es de origen animal.
4. Método según la reivindicación 2, en el que el polisorbato 80 es de origen vegetal.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el complejo de tiocianatometal añadido en la etapa (d) es una mezcla acuosa de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ y NH_4SCN y el complejo de sorbitano-polioxiethylentiocianatometal formado es un complejo de sorbitano-polioxiethylentiocianatocobaltato (II).
6. Método según la reivindicación 5, en el que dicha mezcla acuosa contiene aproximadamente el 3 % (p/v) de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ y aproximadamente el 20 % (p/v) de NH_4SCN .
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la muestra contiene además iso-octilfenol polioxiethylen éter.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la muestra contiene además fosfato de tri-n-butilo (TNBP).
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el filtro usado en la etapa (c) no se une a polioxiethylensorbitano.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el disolvente orgánico inmiscible con agua usado en la etapa (e) se selecciona del grupo que consiste en cloruro de metileno, cloroformo, *o*-diclorobenceno, bromoformo y tricloroetileno.
11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el disolvente orgánico inmiscible con agua es cloruro de metileno.
12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la absorbancia del extracto obtenido en la etapa (e) se mide en la etapa (f) a aproximadamente 324 nm.
13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende además tras la etapa (a) y antes de la etapa (b) la etapa de:
 - (a2) enfriar la muestra tras la hidrólisis alcalina.
14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende además tras la etapa (b) y antes de la etapa (c) la etapa de:
 - (b2) mantener la muestra a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos para permitir la formación

de precipitado desnaturalizado.

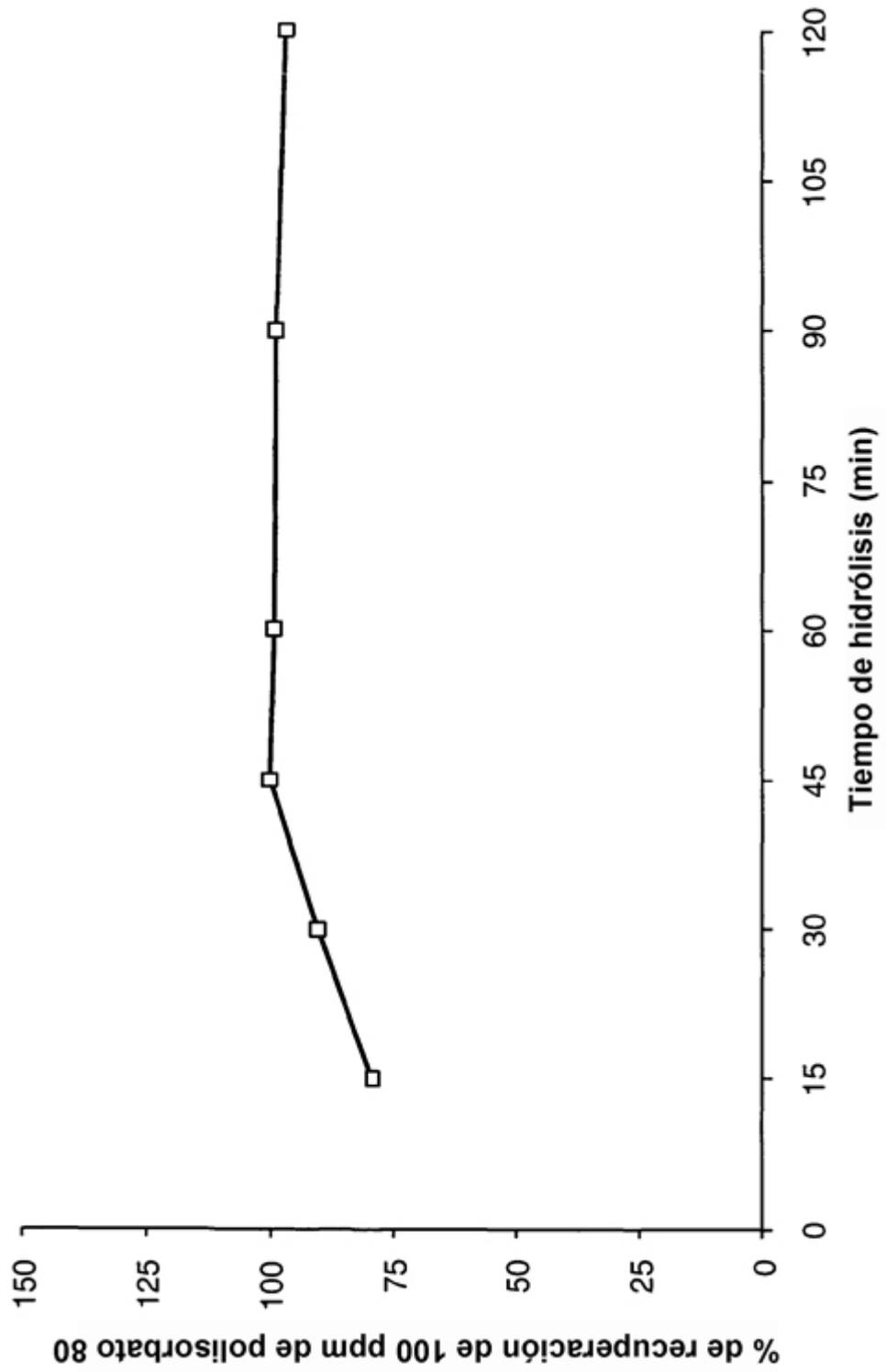


Figura 1

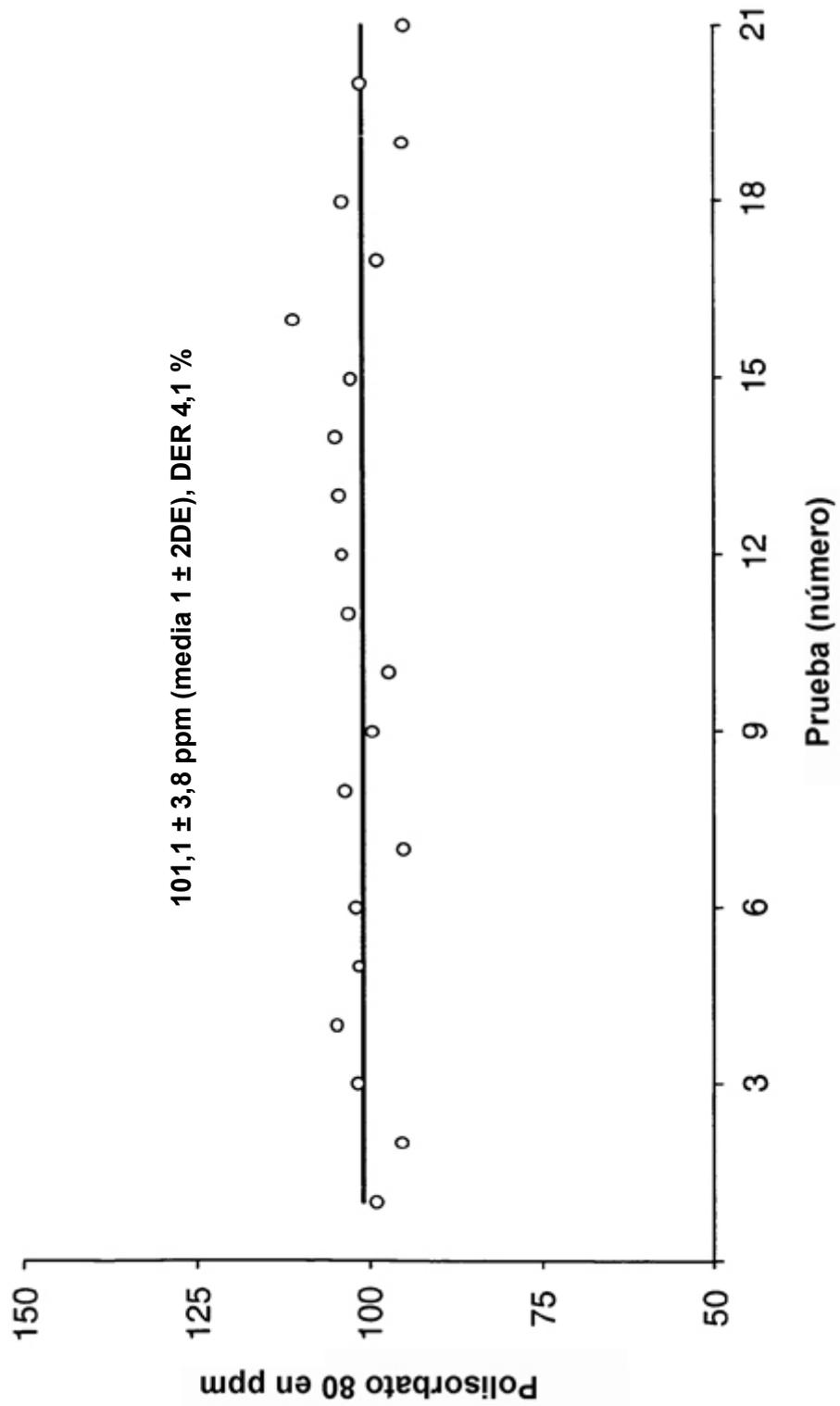


Figura 2

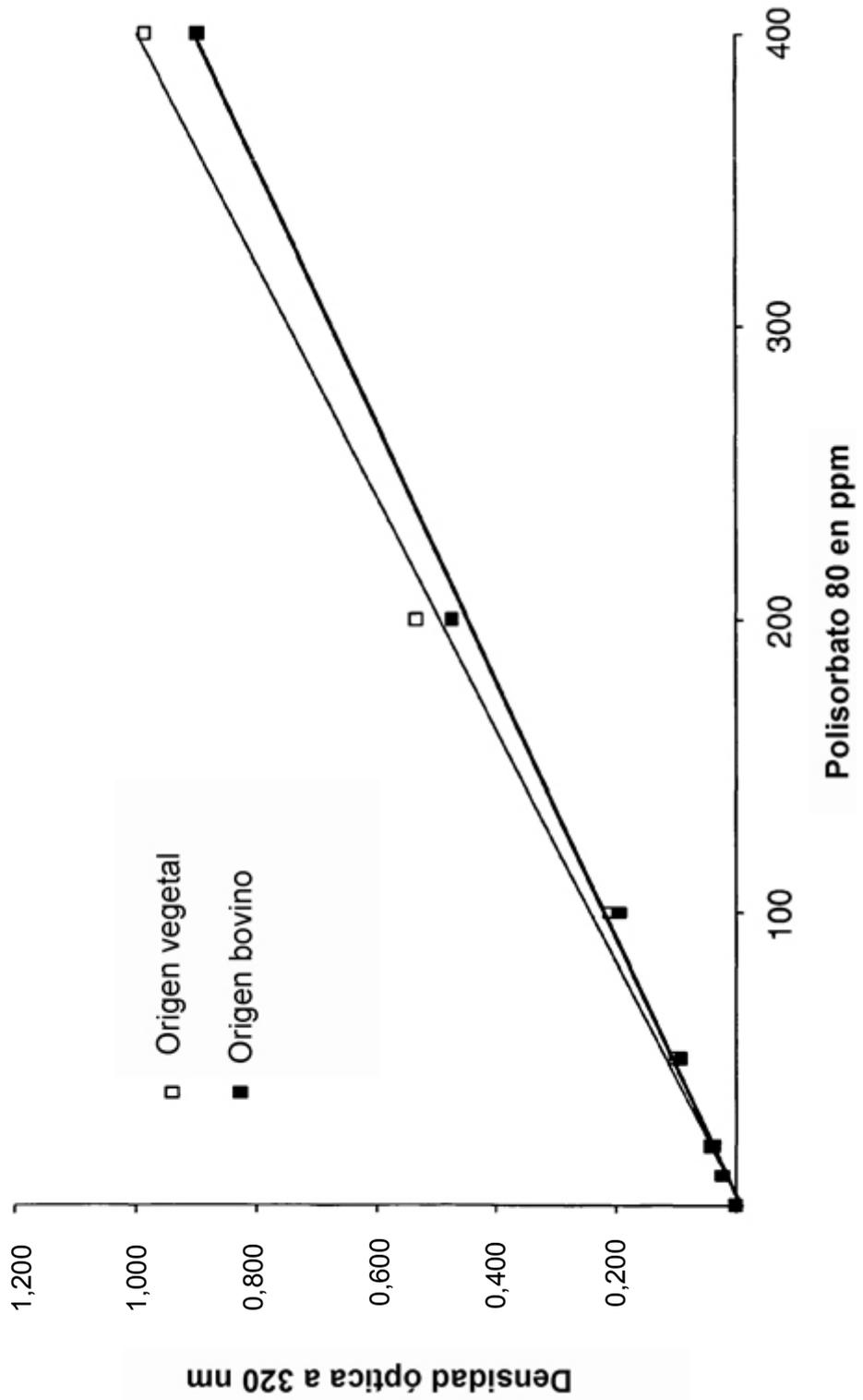


Figura 3A

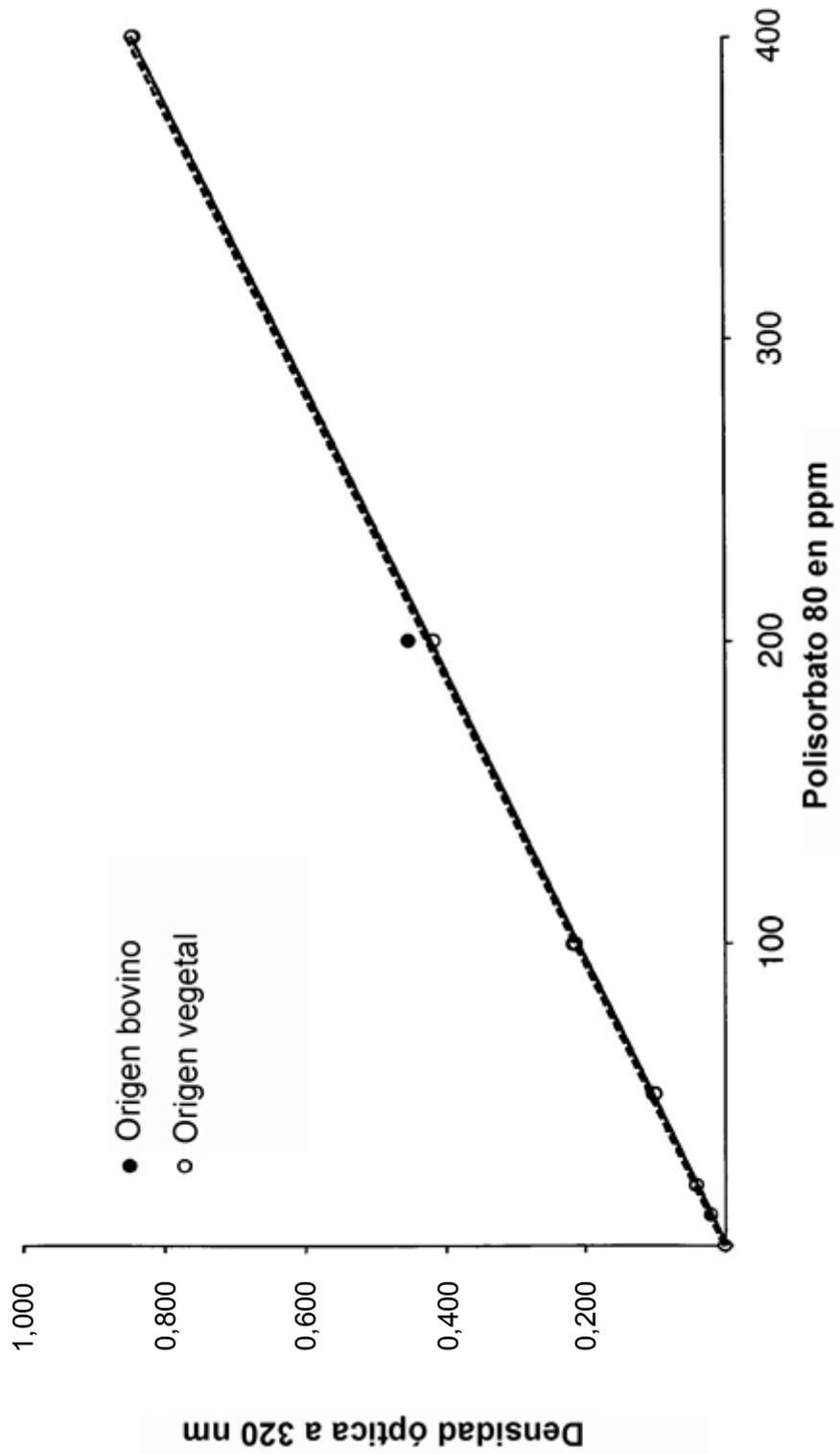


Figura 3B

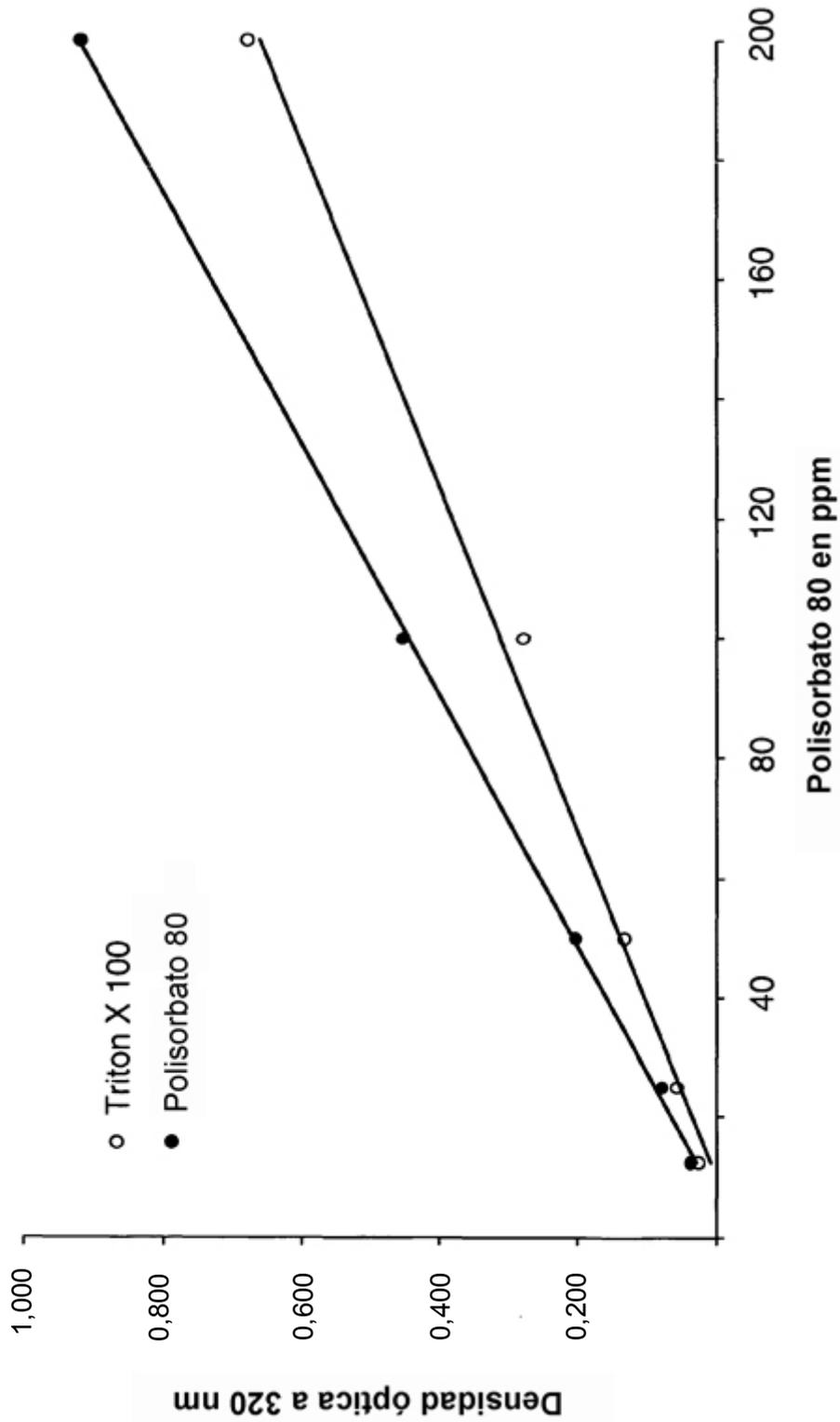


Figura 4A

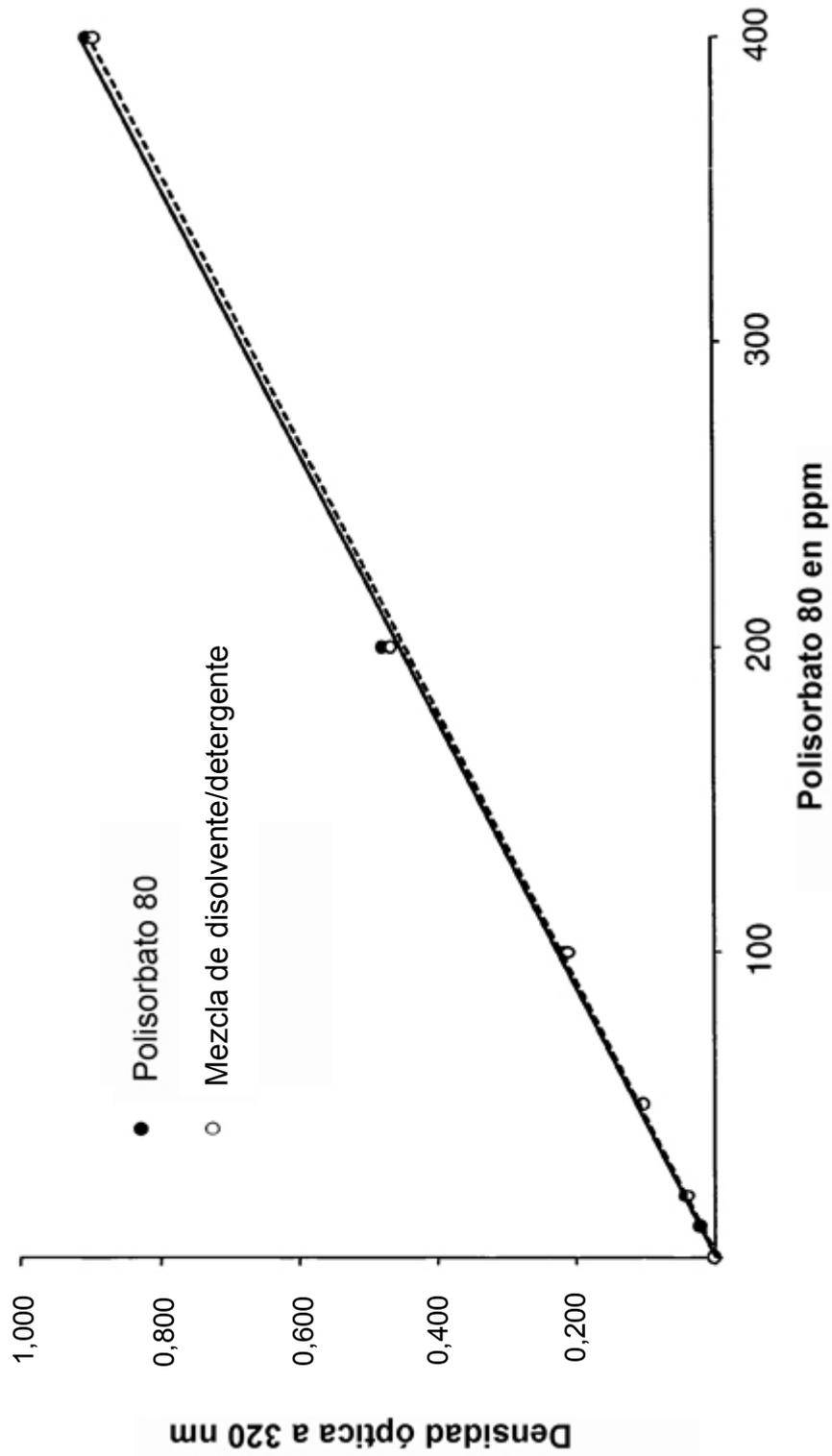


Figura 4B