

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 686**

51 Int. Cl.:
B01D 15/34 (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06793534 .6**
96 Fecha de presentación: **14.09.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1951395**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.08.2008**

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

30 Prioridad:
14.09.2005 EP 05108439
16.09.2005 US 717642 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.04.2012

73 Titular/es:
ARES TRADING S.A.
ZONE INDUSTRIELLE DE L'OURIETTAZ
1170 AUBONNE, CH

72 Inventor/es:
ROSSI, Mara

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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).

ES 2 378 686 T3

DESCRIPCIÓN

Método para la determinación de poloxámeros

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere al campo de la determinación analítica de un tensioactivo que pertenece a la clase de poloxámeros en una muestra líquida de proteínas.

Antecedentes de la invención

Los poloxámeros son copolímeros de bloques no iónicos de óxido de etileno (EO¹) y óxido de propileno (PO). Se utilizan en formulaciones farmacéuticas como tensioactivos, agentes emulsionantes, agentes de solubilización y agentes dispersantes.

- 10 Un método analítico muy conocido para caracterizar un poloxámero es un método calorimétrico en el que se analiza la absorbancia de UV a 320 y 620 nm, que resulta de la formación de complejos del poloxámero con tiocianato de cobalto (II).

- 15 Yun Mao et al., (*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35 (2004), 1127) describe para la determinación de poloxámero el uso de cromatografía de exclusión por tamaño molecular (SEC) que utiliza una columna con THF como fase móvil y la detección del índice de refracción (RI). El método se aplicó a las formulaciones farmacéuticas Avapro, Neurontin y Sudafed en las que el principio activo es una "molécula pequeña". Las moléculas pequeñas se pueden separar convenientemente por SEC de los poloxámeros de alta masa molecular.

- 20 La cromatografía de exclusión por tamaño molecular (SEC), también llamada cromatografía de permeabilidad en gel (GPC), usa partículas porosas para separar moléculas de diferentes tamaños. Se utiliza generalmente para separar moléculas polímeras y para determinar los pesos moleculares y las distribuciones de pesos moleculares de polímeros. Las moléculas que son más pequeñas que el tamaño de los poros pueden entrar en las partículas y por consiguiente tienen una trayectoria más larga y un tiempo de tránsito mayor que las moléculas mayores que no pueden entrar en las partículas. Todas las moléculas mayores que el tamaño de los poros son retenidas y se eluyen juntas. Las moléculas que pueden entrar por los poros tendrán un tiempo de permanencia medio en las partículas que depende del tamaño y forma de las moléculas. Por consiguiente diferentes moléculas tienen diferentes tiempos de tránsito totales a través de la columna.

Hasta ahora no se ha propuesto ningún método que permita la determinación cuantitativa de poloxámeros en muestras de proteínas, en las que la proteína tiene una masa molecular comparable a la de los poloxámeros.

- 30 En particular es necesaria la determinación cuantitativa de poloxámeros en muestras de proteínas, en las que la proteína tiene una masa molecular entre 5 y 70 kDa, preferiblemente entre 20 y 70 kDa.

Sumario de la invención

- 35 La presente invención se refiere a un método que permite la determinación cuantitativa de un poloxámero en una muestra de proteínas, en particular una muestra líquida de proteínas, por ejemplo en una formulación farmacéutica líquida. En particular, la invención proporciona un método para la medida cuantitativa de la concentración de poloxámeros en una muestra de proteínas. Así, en cualquier momento durante el periodo de validez de aproximadamente 2 años de una formulación proteínica, se puede determinar la cantidad de poloxámero en dicha formulación.

La presente invención se refiere a un método para la determinación cuantitativa de un poloxámero en una muestra líquida de proteínas que comprende las etapas de someter dicha muestra a:

- 40 (a) una etapa de separación utilizando una columna de cromatografía de exclusión por tamaño molecular;
(b) una etapa de elución con una fase móvil; y
(c) opcionalmente una etapa de detección para el poloxámero,

en el que la proteína tiene una masa molecular entre 5-70 kDa, preferiblemente entre 20-70 kDa y en donde el pH de la fase móvil utilizada para la etapa de elución se ajusta a un valor por debajo de 3.

- 45 Así la cromatografía de exclusión por tamaños moleculares combinada con una etapa de elución con una fase móvil como se ha definido anteriormente, permite separar el poloxámero de los restantes ingredientes.

El poloxámero se detecta en una etapa adicional analizando la fase eluida, por ejemplo utilizando un sistema de detección del IR (índice de refracción).

Breve descripción de la Figura de los dibujos

La Figura 1 muestra un cromatograma para la determinación cuantitativa de Poloxámero 188 en una formulación de hCG (gonadotropina coriónica humana). El área del pico del Poloxámero 188 se encuentra en este ejemplo a un tiempo de elución de aproximadamente 14-16 minutos (el tiempo de retención puede variar en función del caudal). El área bajo la curva presenta la cuantificación del Poloxámero 188 en la muestra de hCG.

Abreviaturas

En la descripción de la invención se usan las siguientes abreviaturas:

FSH: hormona estimulante del folículo;
 r-FSH; r-LH; r-hCG; r-GH; r-IFN beta, r-TSH: FSH, LH, hCG, GH, IFN beta, TSH recombinantes;
 hFSH: FSH humana;
 r-hFSH: FSH humana recombinante
 IR: Índice de refracción
 KD o Kd o kDa. kilo Dalton
 SEC: Cromatografía de exclusión por tamaños moleculares
 RT: Temperatura ambiente
 WFI: agua para inyección
 Poloxámero 188: sinónimo de Pluronic F68 de BASF Inc.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método conveniente que permite la determinación cuantitativa de un poloxámero – que es un tensioactivo – en una muestra de proteínas. La muestra de proteínas es una muestra líquida de proteínas. La muestra líquida de proteínas puede estar en forma de una formulación líquida, preferiblemente es una formulación farmacéutica líquida como se describe a continuación. En una realización, dicha muestra de proteínas farmacéutica líquida está contenida en un vial, bien para administración unidosis o multidosis.

En una realización adicional, la muestra de proteínas que va a ser analizada se liofiliza y se solubiliza en un disolvente acuoso adecuado antes de ser analizada.

La presente invención proporciona un método para la determinación cuantitativa de un poloxámero en una muestra líquida de proteínas que comprende las etapas de someter dicha muestra a:

- (a) una etapa de separación utilizando una columna de cromatografía de exclusión por tamaño molecular;
- (b) una etapa de elución con una fase móvil; y
- (c) opcionalmente una etapa de detección para el poloxámero,

en donde la proteína tiene una masa molecular entre 5-70 kDa, preferiblemente entre 20-70 kDa y en donde el pH de la fase móvil utilizada para la etapa de elución se ajusta a un valor por debajo de 3.

Típicamente la columna de exclusión por tamaño molecular sería una columna SE-HPLC.

En una realización, el poloxámero es Poloxámero 188.

La relación entre la masa de las proteínas y la masa del poloxámero respectivo puede estar preferiblemente entre 1:3 y 10:1, preferiblemente entre 1:2 y 7:1.

Ejemplos de proteínas de acuerdo con la presente invención incluyen proteínas de mamíferos, tales como, por ejemplo, hormona del crecimiento (somatotropina), incluyendo la somatotropina humana y la somatotropina bovina; factor de liberación de la hormona del crecimiento (somatoliberina); hormona paratiroidea (paratirina); hormona estimuladora del tiroides (tirotropina); lipoproteínas; α -1-antitripsina; cadena A de la insulina; cadena B de la insulina; proinsulina; hormona estimulante de los folículos (folitropina); coriogonadotropina; calcitonina; hormona luteinizante (lutropina); glucagón; factores de coagulación, tales como factor VIIIc, factor IX, factor tisular (tromboplastina hística) y factor de von Willebrand; factores anti-coagulantes, tales como la proteína C; factor natriurético atrial; tensioactivo pulmonar; un activador de plasminógeno, tal como uroquinasa o activador de plasminógeno tisular (t-PA); bombazina; trombina; factor alfa y factor beta de necrosis tumoral; encefalinasa; RANTES (factor expresado y secretado por los linfocitos T normales en función de su grado de activación); proteína inflamatoria de macrófagos humana (MIP-I-alfa); seroalbúmina, tal como seroalbúmina humana; sustancia inhibidora de Müller; cadena A de la relaxina; cadena B de la relaxina; pro-relaxina; péptido asociado a la gonadotropina de ratón; Dnasa; inhibina; activina; factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; una integrina; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico, tal como factor neurotrófico derivado de huesos (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5, o NT-6) o un factor del crecimiento nervioso, tal como NGF-P; factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor del crecimiento de fibroblastos, tales como aFGF y bFGF, en particular FGF-18; factor del crecimiento epidérmico (EGF); factor del crecimiento transformante (TGF), tales como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta4 o TGF-beta5;

- factores I y II del crecimiento similar a la insulina (IGF-I y IGF-II); des(I-3)-IGF-1 (IGF-I del cerebro); proteínas que se unen al factor del crecimiento similares a la insulina; proteínas CD, tales como CD3, CD4, CD8, CD19 y CD20; eritropoyetina (EPO); trombopoyetina (TPG); factores osteoinductores; osteopontina; inmunotoxinas; una proteína morfogénica de huesos (BMP); un interferón, tal como interferón-alfa, -beta y -gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleuquinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido-dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas superficiales de membranas; factor acelerador de la degradación (DAF); un antígeno viral, tal como por ejemplo una parte de la envoltura del virus del SIDA; proteínas de transporte; receptores de la migración dirigida de los linfocitos; adhesinas; proteínas reguladoras; inmunoadhesinas; anticuerpos; y fragmentos o variantes biológicamente activos de cualquiera de los polipéptidos antes enumerados.
- Preferiblemente, la proteína de acuerdo con la presente invención se selecciona de hormona estimulante de los folículos (FSH), coriogonadotropina (CG), hormona luteinizante (LH), interferón-beta (IFN-beta), interferón-beta pegilado (PEG-IFN-beta), hormona del crecimiento (GH), hormona estimulante del tiroides (TSH), factor 18 del crecimiento de fibroblastos (FGF-18) u osteopontina.
- Las FSH, CG, LH y TSH son glicoproteínas que pertenecen a la clase de las gonadotrofinas. Las gonadotrofinas se usan en el tratamiento de la infertilidad.
- El IFN-beta es una glicoproteína que pertenece a la clase de las interleuquinas. El IFN-beta se usa en el tratamiento de la esclerosis múltiple.
- El PEG-IFN-beta es un IFN-beta derivatizado por una cadena de polietilenglicol, que le confiere mejor estabilidad.
- La hormona del crecimiento es una proteína no glicosilada. Se usa para tratar deficiencias de la hormona del crecimiento en niños o adultos.
- El FGF-18 se usa en el tratamiento de la osteoartritis.
- La osteopontina es un polipéptido monocaténario glicosilado.
- En una realización preferida, dicha proteína es un heterodímero, tales como las gonadotropinas (FSH, LH, CG, TSH así como sus variantes). En una realización adicional la proteína es la hormona del crecimiento (GH) o interferón-beta (IFN-beta o sus variantes, por ejemplo sus variantes pegiladas). En otra realización más, la proteína es FGF-18 u osteopontina.
- En una realización preferida, la muestra líquida de proteínas incluye una o más proteínas terapéuticas. Preferiblemente, dicha muestra no incluye compuestos terapéuticos no proteínicos, tales como un compuesto químico de bajo peso molecular.
- La hormona estimulantes de los folículos o FSH, como se usa en la presente memoria se refiere a la FSH producida en forma de proteína madura de longitud completa que incluye, pero sin limitación, FSH humana o "hFSH" ya sea producida recombinantemente o ya sea aislada de fuentes humanas, tales como la orina de mujeres posmenopáusicas.
- El método es aplicable tanto a proteínas naturales como a recombinantes. En una realización la formulación de proteínas es FSH, LH, CG, TSH, GH o IFN-beta recombinantes humanas.
- La hormona estimulante de los folículos (FSH) es una glicoproteína que pertenece a la clase de gonadotrofinas. La FSH se usa en el tratamiento de la infertilidad y en los trastornos de la reproducción tanto en pacientes hembras como machos, por ejemplo para inducir la espermatogénesis en hombres que padecen oligospermia.
- La hormona luteinizante (LH) es una gonadotropina secretada por el lóbulo anterior de la hipófisis. La LH se usa en pacientes hembras en combinación con la FSH en OI (inducción de la ovulación) y en COH (hiperestimulación ovárica controlada), particularmente en los pacientes con muy bajos niveles de LH endógena o resistencia a la LH, tales como las mujeres que padecen hipogonadismo hipogonadotrófico (HH, grupo 1 de la OMS) o pacientes mayores (es decir de 35 años o más) y pacientes en los cuales es un problema la implantación de embriones o el aborto prematuro.
- La gonadotropina coriónica (CG) es una gonadotropina producida por la placenta y se obtiene de la orina de mujeres embarazadas. La CG actúa sobre el mismo receptor que la LH y desencadena las mismas respuestas. La CG tiene una mayor semi-vida en circulación que la LH y por tanto se usa generalmente como fuente a largo plazo de actividad de LH. La CG se usa en regímenes de OI y COH para mimetizar la ovulación máxima y provocada de la LH natural. Se usa una inyección de gonadotropina coriónica humana (hCG) para provocar la ovulación al final de la estimulación con FSH o con una mezcla de FSH y LH. La CG también se puede usar junto con la FSH durante la estimulación para la OI y la COH, para proporcionar actividad de LH durante la estimulación en pacientes en los que es deseable la actividad de LH, tal como los mencionados anteriormente.
- Las FSH, LH y CG son miembros de la familia de hormonas glicoproteínicas heterodímeras que incluye también la

hormona estimulante del tiroides (TSH). Los miembros de esta familia son heterodímeros, que comprenden una α - y una β -subunidad. Las subunidades se mantienen juntas por interacciones no covalentes. El heterodímero FSH humano (hFSH) consiste en: (i) una alfa-subunidad glicoproteínica madura de 92 aminoácidos, que también es común a los otros miembros de la familia (es decir, la gonadotrofina coriónica ("CG"), la hormona luteinizante ("LH") y la hormona estimulante del tiroides ("TSH")); y (ii) una beta-subunidad madura de 111 aminoácidos que es exclusiva de la FSH. El heterodímero de la LH humana consiste en: (i) la alfa-subunidad glicoproteínica madura de 92 aminoácidos; y (ii) una beta-subunidad madura de 112 aminoácidos que es exclusiva de la LH. Las alfa- y beta-subunidades de las glicoproteínas pueden ser propensas a disociarse en formulaciones, debido a la interacción con un conservante, tensioactivo y otros excipientes. La disociación de las subunidades conduce a una pérdida de la potencia biológica.

La FSH se formula para inyección intramuscular (IM) o subcutánea (SC). En una realización la FSH se suministra en una forma liofilizada (sólida) en viales o ampollas de 75 UI/vial and 150 UI/vial con un periodo de validez de uno y medio a dos años conservada a 2-25°C. Una solución para inyección se forma reconstituyendo el producto liofilizado con agua para inyección (WFI). Además, está disponible una formulación líquida de FSH (*Gonal-F pen*) que contiene 22 µg/0,5 mL, 33 µg/0,75 mL o 66 µg/1,5 mL de FSH así como Poloxámero 188, sacarosa, tampón, metionina y m-cresol.

Por consiguiente, la FSH ha sido formulada tanto en formatos unidosis como multidosis, en viales o ampollas. Los formatos unidosis deben permanecer estables y potentes durante su conservación antes del uso. Los formatos multidosis no solo deben permanecer estables y potentes durante su conservación antes del uso, sino que también deben permanecer estables, potentes y relativamente exentos de bacterias en un periodo de administración con un régimen de uso de múltiples dosis, después que se ha comprobado el cierre hermético de la ampolla. Por esta razón, los formatos multidosis contienen generalmente un agente bacteriostático, por ejemplo alcohol bencílico o m-cresol.

La LH se formula para inyección intramuscular (IM) o subcutánea (SC). La LH se suministra en forma liofilizada (sólida) en viales o ampollas de 75 UI/vial con un periodo de validez de uno y medio a dos años cuando se conserva a 2-25°C. Se forma una solución para inyección reconstituyendo el producto liofilizado con agua para inyección (WFI). Luveris™ contiene además de la LH los siguientes excipientes: sacarosa, tampón, Polisorbato 20 y metionina. Más recientemente, se describieron formulaciones de LH que contenían Poloxámero 188 (WO 2004/087213).

También están comercializadas composiciones farmacéuticas líquidas que contienen hCG, por ejemplo Ovitrelle™ que contiene manitol, en un tampón de fosfato a pH 7, metionina y Poloxámero 188.

Se entiende que el término "variante" abarca las moléculas que difieren en la secuencia de aminoácidos, en el modelo de glicosilación o en el enlace inter-subunidades de las FSH, LH, CG, TSH, IFN-beta o GH humanas pero que presentan la actividad biológica de FSH, LH, CG, TSH, IFN-beta o GH. Los ejemplos incluyen CTP-FSH, una FSH recombinante modificada de acción prolongada, que consiste en la α -subunidad de tipo natural y una β -subunidad híbrida en la cual el péptido carboxi-terminal de la hCG ha sido fusionado al C-terminal de la β -subunidad de la FSH, como ha sido descrito por LaPolt et al.; *Endocrinology*, **1992**, 131, 2514-2520; o Klein et al.; *Development and characterization of a long-acting r-hFSH agonist*; *Human Reprod.* 2003, 18, 50-56. También está incluida la CTP-FSH monocatenaria, una molécula monocatenaria, que consisten en las siguientes secuencias (desde N-terminal a C-terminal):

β FSH	β hCG-CTP(113-145)	α FSH
-------------	--------------------------	--------------

en donde β FSH significa la β -subunidad de FSH, β hCG CTP (113-145) significa el péptido carboxi-terminal de la hCG y α FSH significa la α -subunidad de FSH, como ha sido descrito por Klein et al.; (*Pharmacokinetics and pharmacodynamics of single-chain recombinant human follicle-stimulating hormone containing the human chorionic gonadotrophin carboxyterminal peptide in the rhesus monkey*; *Fertility & Sterility*, **2002**, 77, 1248-1255). Otros ejemplos de variantes de FSH incluyen moléculas de FSH que tienen sitios de glicosilación adicionales incorporados en la α - y/o β -subunidad, como está descrito en el documento WO 01/58493 (Maxygen), particularmente como se describe en las reivindicaciones 10 y 11 del documento WO 01/58493, y moléculas de FSH con enlaces S-S entre las subunidades, como está descrito en el documento WO 98/58957.

Las variantes de la FSH a las que se ha hecho referencia en la presente memoria incluyen también las delecciones carboxi-terminales de la beta-subunidad que son más cortas que la proteína FSH madura de longitud completa. Los heterodímeros de FSH o los heterodímeros variantes de FSH se pueden producir por cualquier método adecuado, tal como recombinantemente, por aislamiento o purificación de fuentes naturales como puede ser el caso o por síntesis química o cualquiera de sus combinaciones.

El término "variantes" también comprende las formas pegiladas de las proteínas.

El uso del término "recombinante" se refiere a preparaciones de FSH, LH, CG, TSH, GH, IFN-beta o sus variantes

que se producen por el uso de tecnología del DNA recombinante (véase por ejemplo el documento WO 85/01958). Un ejemplo de un método de expresar FSH o LH usando tecnología recombinante es por transfección de células eucariotas con las secuencias de DNA que codifican una alfa- y beta-subunidad de FSH o LH, tanto si son proporcionadas en un vector o en dos vectores, teniendo cada subunidad un promotor separado, como ha sido descrito en las Patentes europeas Nos. EP 0211894 y EP 0487512. Otro ejemplo del uso de tecnología recombinante para producir FSH o LH es por medio de recombinación homóloga para insertar un segmento regulador heterólogo en conexión operativa con las secuencias endógenas que codifican las subunidades de FSH o LH, como ha sido descrito en la Patente europea N° EP 0505500 (Applied Research Systems ARS Holding NV).

La FSH o la variante de FSH usada de acuerdo con la presente invención puede ser producida no solamente por medios recombinantes, incluyendo la procedente de células de mamíferos, sino también puede ser purificada a partir de otras fuentes biológicas, tales como fuentes de orina. Las metodologías aceptables incluyen las descritas por Hakola, K., *Molecular and Cellular Endocrinology*, 127:59-69, 1997; Keene, et al., *J. Biol. Chem.*, 264:4769-4775, 1989; Cerpa-Poljak, et al., *Endocrinology*, 132:351-356, 1993; Dias, et al., *J. Biol. Chem.*, 269:25289-25294, 1994; Flack, et al., *J. Biol. Chem.*, 269:14015-14020, 1994; y Valove, et al., *Endocrinology*, 135:2657-2661, 1994, Patente de EE.UU. 3.119.740 y Patente de EE.UU. N° 5.767.067.

La hormona luteinizante, o LH, como se usa en la presente memoria se refiere a la LH producida como una proteína madura de longitud completa, que incluye, pero sin limitación LH humana, tanto producida recombinantemente como aislada de fuentes humanas, tal como la orina de mujeres posmenopáusicas. La secuencia de proteínas de la alfa-subunidad de la glicoproteína humana es proporcionada en la SEQ ID NO: 1, y la secuencia de proteínas de la beta-subunidad de la LH humana viene dada por la SEQ ID NO: 6. En una realización preferida la LH es recombinante.

La expresión "variante de LH" pretende abarcar las moléculas que difieren en la secuencia de aminoácidos, en el modelo de glicosilación o en el enlace entre las subunidades de la LH humana pero que presenta actividad de LH.

Los heterodímeros de LH o los heterodímeros de variantes de LH se pueden producir por cualquier método adecuado, tal como recombinantemente, por aislamiento o purificación de fuentes naturales como puede ser el caso o por síntesis química o cualquiera de sus combinaciones.

Las muestras líquidas de proteínas de la presente invención también comprenden mezclas de FSH/LH y sus variantes (documento WO 2004/087213) así como FSH y hCG y sus variantes (documento WO 2004/105788).

La expresión "diluyente acuoso" se refiere a un disolvente líquido que contiene agua. Los sistemas de disolventes acuosos pueden consistir exclusivamente en agua o pueden consistir en agua más uno o más disolventes miscibles, y pueden contener solutos disueltos tales como azúcares, tampones, sales u otros excipientes. Los disolventes no acuosos más convenientemente usados son los alcoholes orgánicos de cadena corta, tales como metanol, etanol, propanol, cetonas de cadena corta, tales como acetona y polialcoholes tales como glicerol.

La expresión "bacteriostático" o "agente bacteriostático" se refiere a un compuesto o composiciones añadidos a una formulación para que actúe como un agente anti-bacteriano. Una formulación conservada que contiene FSH o variante de FSH o FSH y LH de la presente invención satisface preferiblemente las directrices estatutarias o reguladoras para conservar la eficacia de modo que sea un producto multiuso comercialmente viable, preferiblemente en seres humanos. Ejemplos de agentes bacteriostáticos incluyen fenol, *m*-cresol, *p*-cresol, *o*-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparabene (metil, etil, propil, butil y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, deshidroacetato sódico y timerosal.

El término "tampón" o "tampón fisiológicamente aceptable" se refiere a soluciones de compuestos que se sabe que son seguros para uso farmacéutico o veterinario en formulaciones y que tienen el efecto de mantener o controlar el pH de las formulaciones en el intervalo de pH deseado para la formulación. Los tampones aceptables para controlar el pH entre un valor de pH moderadamente ácido y un valor de pH moderadamente básico incluyen, pero sin limitación, compuestos tales como fosfato, acetato, citrato, arginina, TRIS e histidina. "TRIS" se refiere a 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol y a cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables. Los tampones preferidos son tampones de fosfato con solución salina o una sal aceptable.

La expresión "tampón de fosfato" se refiere a soluciones que contienen ácido fosfórico o sus sales, ajustadas a un pH deseado. Generalmente los tampones de fosfato se preparan a partir de ácido fosfórico o una sal de ácido fosfórico, incluyendo pero sin limitación sales sódicas y potásicas. En la técnica se conocen diversas sales de ácido fosfórico, tales como sales sódicas y potásicas, monobásicas, dibásicas y tribásicas del ácido. También se sabe que las sales del ácido fosfórico se presentan como hidratos de la sal. Los tampones de fosfato pueden cubrir un amplio intervalo de valores de pH, tales como entre aproximadamente pH 4 y aproximadamente pH 10, y los intervalos preferidos son entre aproximadamente pH 5 y aproximadamente pH 9, y un intervalo más preferido es entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,0, lo más preferiblemente aproximadamente pH 7,0.

El término "vial" se refiere ampliamente a recipientes adecuados para retener FSH en forma sólida o líquida en un estado estéril mantenido. Ejemplos de un vial como se usa en la presente memoria incluyen ampollas, cartuchos, paquetes de blíster u otros recipientes adecuados para suministrar la FSH al paciente mediante una jeringa, bomba

(incluyendo osmótica), catéter, parche transdérmico y pulverización pulmonar o transmucosal. Los viales adecuados para empaquetar productos para la administración parenteral, pulmonar, transmucosal o transdérmica son muy conocidos y reconocidos en la técnica.

La expresión "uso de multi-dosis" incluye el uso de un único vial, ampolla o cartucho de una formulación de FSH o una formulación de la proteína para más de una inyección, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6 o más inyecciones. Las inyecciones se preparan preferiblemente para un periodo de al menos o aproximadamente 12 horas, 24 horas, 48 horas, etc., preferiblemente hasta un periodo de o aproximadamente 12 días. Las inyecciones pueden ser espaciadas en el tiempo, por ejemplo, durante un periodo de 6, 12, 24, 48 o 72 horas.

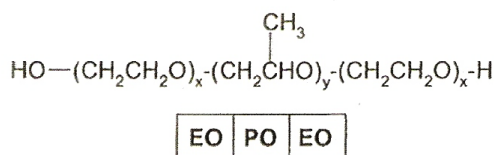
El término "estabilidad" se refiere a la estabilidad física, química y conformacional de la proteína dada en las formulaciones de la presente invención (incluyendo el mantenimiento de la potencia biológica). La inestabilidad de una formulación de proteínas puede ser causada por degradación o agregación química de las moléculas de proteínas para formar polímeros de orden superior, por disociación de los heterodímeros en monómeros, desglicosilación, modificación de la glicosilación, oxidación (particularmente en heterodímeros de la α -subunidad) o cualquier otra modificación estructural que reduzca al menos una actividad biológica de un polipéptido incluido en la presente invención.

Una solución o formulación "estable" es una en la que el grado de degradación, modificación, agregación, pérdida de actividad biológica y similares, de las proteínas contenidas en ellas es controlada aceptablemente y no aumenta de un modo inaceptable con el tiempo. Preferiblemente la formulación retiene al menos o aproximadamente 80% de la actividad de la proteína de la etiqueta durante un periodo de hasta 2 años.

El problema que subyace en la presente invención es proporcionar un método conveniente y rápido para determinar la cantidad de un poloxámero en una muestra de proteínas. Un poloxámero puede ser usado como tensioactivo y seleccionado de copolímeros de bloques de óxido de etileno y óxido de propileno, preferiblemente Pluronic® F77, Pluronic F87, Pluronic F88 y Pluronic® F68, particular y preferiblemente Pluronic F68 (el Pluronic F68 de BASF también se conoce como Poloxámero 188).

Como se ha mencionado anteriormente, las formulaciones farmacéuticas deben tener un periodo de validez de hasta 2 años a una temperatura de conservación de 2-25°C. Esto implica que se espera que la formulación permanezca estable durante este tiempo. Puesto que las formulaciones líquidas contienen diversos excipientes que pueden afectar directamente, o indirectamente mediante descomposición, a la estabilidad de la formulación de proteínas, es necesario tener herramientas analíticas para determinar dicha estabilidad de la formulación.

Más específicamente, los tensioactivos poloxámero son copolímeros de bloques de óxido de etileno (EO) y óxido de propileno (PO). El bloque de óxido de propileno (PO) está emparejado entre dos bloques de óxido de etileno (EO).



Los poloxámeros se sintetizan en un proceso de dos etapas:

- se crea un compuesto hidrófobo del peso molecular deseado por la adición controlada de óxido de propileno a los dos grupos hidroxilo del propilenglicol; y
- se añade óxido de etileno para emparejar el compuesto hidrófobo entre los grupos hidrófilos.

Los tensioactivos poloxámeros se conocen también como *pluronics*.

En el Pluronic® F77, el porcentaje de polioxietileno (hidrófilo) es 70% y el peso molecular del compuesto hidrófobo (polioxipropileno) es aproximadamente 2.306 Da.

En el Pluronic F87, el porcentaje de polioxietileno (hidrófilo) es 70% y el peso molecular del compuesto hidrófobo (polioxipropileno) es aproximadamente 2.644 Da.

En el Pluronic F88, el porcentaje de polioxietileno (hidrófilo) es 80% y el peso molecular del compuesto hidrófobo (polioxipropileno) es aproximadamente 2.644 Da.

En el Pluronic F68, el porcentaje de polioxietileno (hidrófilo) es 80% y el peso molecular del compuesto hidrófobo (polioxipropileno) es aproximadamente 1.967 Da.

Las propiedades típicas del Pluronic F77 se enumeran a continuación:

- Peso molecular medio: 6600;
 Punto de fusión/fluidez: 48°C;
 Forma física a 20°C: sólida;
- 5 Viscosidad (Brookfield) cps: 480 [líquidos a 25°C, pastas a 60°C y sólidos a 77°C];
 Tensión superficial, dinas/cm a 25°C;
 Conc. al 0,1%: 47,0
 Conc. al 0,01%: 49,3
 Conc. al 0,001%: 52,8
- 10 Tensión interfacial, dinas/cm a 25°C vs. Nujol;
 Conc. al 0,1%: 17,7
 Conc. al 0,01%: 20,8
 Conc. al 0,001%: 25,5
 Humectación de Draves, segundos a 25°C
- 15 Conc. al 1,0%: > 360
 Conc. al 0,1%: > 360
 Altura de la espuma
 Ross Miles, 0,1%, mm a 50°C: 100
 Ross Miles, 0,1%, mm a 26°C: 47
- 20 Dinámica, 0,1%, mm a 400 ml/min: > 600
 Punto de turbidez en solución acuosa, °C
 Conc. al 1%: >100
 Conc. al 10%: >100
 HLB (balance hidrófilo-lipófilo): 25

25 Las propiedades típicas del Pluronic F87 se enumeran a continuación:

- Peso molecular medio: 7700;
 Punto de fusión/fluidez: 49°C;
 Forma física a 20°C: sólida;
- 30 Viscosidad (Brookfield) cps: 700 [líquidos a 25°C, pastas a 60°C y sólidos a 77°C];
 Tensión superficial, dinas/cm a 25°C;
 Conc. al 0,1%: 44,0
 Conc. al 0,01%: 47,0
 Conc. al 0,001%: 50,2
- 35 Tensión interfacial, dinas/cm a 25°C vs. Nujol;
 Conc. al 0,1%: 17,4
 Conc. al 0,01%: 20,3
 Conc. al 0,01%: 23,3
 Humectación de Draves, segundos a 25°C
 Conc. al 1,0%: > 360
- 40 Conc. al 0,1%: > 360
 Altura de la espuma
 Ross Miles, 0,1%, mm a 50°C: 80
 Ross Miles, 0,1%, mm a 26°C: 47
 Dinámica, 0,1%, mm a 400 ml/min: > 600
- 45 Punto de turbidez en solución acuosa, °C
 Conc. al 1%: >100
 Conc. al 10%: >100
 HLB (balance hidrófilo-lipófilo): 24

Las propiedades típicas del Pluronic F88 se enumeran a continuación:

- 50 Peso molecular medio: 11400;
 Punto de fusión/fluidez: 54°C;
 Forma física a 20°C: sólida;
- 55 Viscosidad (Brookfield) cps: 2300 [líquidos a 25°C, pastas a 60°C y sólidos a 77°C];
 Tensión superficial, dinas/cm a 25°C;
 Conc. al 0,1%: 48,5
 Conc. al 0,01%: 52,6
 Conc. al 0,001%: 55,7
- 60 Tensión interfacial, dinas/cm a 25°C vs. Nujol;
 Conc. al 0,1%: 20,5
 Conc. al 0,01%: 23,3
 Conc. al 0,01%: 27,0

Humectación de Draves, segundos a 25°C

Conc. al 1,0%: > 360

Conc. al 0,1%: > 360

Altura de la espuma

5 Ross Miles, 0,1%, mm a 50°C: 80

Ross Miles, 0,1%, mm a 26°C: 37

Dinámica, 0,1%, mm a 400 ml/min: > 600

Punto de turbidez en solución acuosa, °C

Conc. al 1%: >100

10 Conc. al 10%: >100

HLB (balance hidrófilo-lipófilo): 28

Las propiedades típicas del Pluronic F68 se enumeran a continuación:

Peso molecular medio: 8400;

Punto de fusión/fluidez: 52°C;

15 Forma física a 20°C: sólida;

Viscosidad (Brookfield) cps: 1000 [líquidos a 25°C, pastas a 60°C y sólidos a 77°C];

Tensión superficial, dinas/cm a 25°C;

Conc. al 0,1%: 50,3

Conc. al 0,01%: 51,2

20 Conc. al 0,001%: 53,6

Tensión interfacial, dinas/cm a 25°C vs. Nujol;

Conc. al 0,1%: 19,8

Conc. al 0,01%: 24,0

Conc. al 0,01%: 26,0

25 Humectación de Draves, segundos a 25°C

Conc. al 1,0%: > 360

Conc. al 0,1%: > 360

Altura de la espuma

Ross Miles, 0,1%, mm a 50°C: 35

30 Ross Miles, 0,1%, mm a 26°C: 40

Dinámica, 0,1%, mm a 400 ml/min: > 600

Punto de turbidez en solución acuosa, °C

Conc. al 1%: >100

Conc. al 10%: >100

35 HLB (balance hidrófilo-lipófilo): 29

También se pueden usar en las formulaciones de la invención otros polímeros poloxámeros que tienen propiedades similares a las recogidas en la lista anterior. El tensioactivo poloxámero preferido presente en las formulaciones de proteínas que se analizan con el presente método es Pluronic F68 (= Poloxámero 188).

40 Preferiblemente la concentración de Pluronic, particularmente Pluronic F68, en las formulaciones líquidas de proteínas es de igual o aproximadamente 0,01 mg/ml a igual o aproximadamente 1 mg/ml, más preferiblemente de igual o aproximadamente 0,05 mg/ml a igual o aproximadamente 0,5 mg/ml, más particular y preferiblemente de igual o aproximadamente 0,2 mg/ml a igual o aproximadamente 0,4 mg/ml, más preferiblemente igual o aproximadamente 0,1 mg/ml.

45 Las formulaciones de proteínas analizadas de acuerdo con el método de la presente invención tienen un pH entre igual o aproximadamente 6,0 e igual o aproximadamente 8,0, más preferiblemente de igual o aproximadamente 6,8 a igual o aproximadamente 7,8, incluyendo aproximadamente pH 7,0, pH 7,2 y pH 7,4. Un tampón preferido es fosfato, siendo los contraiones preferidos sodio o potasio. Los tampones de solución salina de fosfato son bien conocidos en la técnica, tal como la solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco. Las concentraciones del tampón en la solución total pueden variar entre igual o aproximadamente 5 mM, 9,5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM y 500 mM. Preferiblemente, la concentración del tampón es igual o aproximadamente 10 Mm. Se prefiere particularmente un tampón 10 mM en iones fosfato con un pH de 7,0.

50 Preferiblemente, las formulaciones de la FSH analizadas de acuerdo con el método de la presente invención tienen un pH entre igual o aproximadamente 6,0 e igual o aproximadamente 8,0, más preferiblemente de igual o aproximadamente 6,8 a igual o aproximadamente 7,8, incluyendo aproximadamente pH 7,0, pH 7,2 y pH 7,4. Un tampón preferido es fosfato, siendo los contraiones preferidos iones sodio o potasio.

55 Preferiblemente, las formulaciones de mezclas de FSH y LH analizadas de acuerdo con el método de la presente invención tienen un pH entre igual o aproximadamente 6,0 e igual o aproximadamente 9,0, más preferiblemente de igual o aproximadamente 6,8 a igual o aproximadamente 8,5, incluyendo aproximadamente pH 7,0, pH 8,0 y pH 8,2, más preferiblemente igual o aproximadamente pH 8,0.

Preferiblemente, las formulaciones de la hCG analizadas de acuerdo con el método de la presente invención tienen un pH entre igual o aproximadamente 6,0 e igual o aproximadamente 8,0, más preferiblemente de igual o aproximadamente 6,8 a igual o aproximadamente 7,8, incluyendo aproximadamente pH 7,0, pH 7,2 y pH 7,4.

La muestra de proteínas es preferiblemente una formulación líquida para administración unidosis o multidos. Las formulaciones líquidas de la invención que están destinadas a uso multidos comprende preferiblemente un agente bacteriostático, tal como fenol, *m*-cresol, *p*-cresol, *o*-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparabene (metil, etil, propil, butil y similares), timol, cloruro de benzalkonio, cloruro de bencetonio, deshidroacetato sódico y timerosal. Son particularmente preferidos fenol, alcohol bencílico y *m*-cresol, son más preferidos fenol y *m*-cresol, y el más preferido es *m*-cresol. El agente bacteriostático se usa en una cantidad que proporcione una concentración que sea eficaz en mantener la formulación esencialmente exenta de bacterias (adecuada para inyección) durante el periodo de inyección de multidos, que puede ser igual o aproximadamente de 12 o 24 horas a igual o aproximadamente 12 o 14 días, preferiblemente de igual o aproximadamente 6 a igual o aproximadamente 12 días. El agente bacteriostático está presente preferiblemente en una concentración de igual o aproximadamente 0,1% (masa de agente bacteriostático/masa de disolvente) a igual o aproximadamente 2,0%, más preferiblemente de igual o aproximadamente 0,2% a igual o aproximadamente 1,0%. En el caso del alcohol bencílico, una concentración particularmente preferida es 0,9%. En el caso del fenol, se prefiere particularmente una concentración igual o aproximadamente 0,5%. En el caso de *m*-cresol, una concentración particularmente preferida es igual o aproximadamente 0,3 % (por ejemplo, igual o aproximadamente 3 mg/ml in WFI).

Las columnas de exclusión por tamaño molecular son muy conocidas por las personas expertas en la técnica. Dichas columnas se eligen de acuerdo con la proteína y el poloxámero respectivos de la muestra. El gel de la columna debe ser una matriz a base de polímeros. Una columna preferida es una columna de SE-HPLC que tiene la denominación TSK G3000PW de TosoHaas Inc. Las perlas de la matriz tienen un tamaño de partículas de 10 o 17 µm, un tamaño de poros de aproximadamente 200 Å. La columna está comercializada.

La etapa de detección se puede realizar con cualquiera de los sistemas de detección por RI, que son conocidos por los expertos en la técnica.

Se ha encontrado que en condiciones más ácidas, el poloxámero podía ser separado más fácilmente de las proteínas.

Por tanto, la fase móvil usada en el método de acuerdo con la presente invención es un disolvente acuoso, tal como agua o una solución tamponada.

De acuerdo con la invención la fase móvil se ajusta a un pH inferior a 3, más preferiblemente entre aproximadamente 1,6-2,0 y más preferiblemente entre 1,9-2,0. En una realización la proteína es un heterodímero, tal como FSH, CG, LH o TSH. En condiciones ácidas una proteína heterodímera tiende a descomponerse en sus subunidades que emigran más fácilmente mejorando por tanto la etapa de separación y detección (resolución). Los agentes ácidos adecuados para ajustar el pH pueden ser seleccionados por los expertos en la técnica. El ácido más preferido es el ácido trifluoroacético (TFA).

Típicamente, las muestras que han de ser determinadas se preparan e inyectan en la columna. Teniendo en cuenta el índice de refracción en la etapa de detección del método, se obtiene un cromatograma que contiene un pico del poloxámero así como al menos un pico más de la(s) proteína(s) y el(los) excipiente(s). La determinación del pico permite la cuantificación del poloxámero presente en la muestra analizada. La cuantificación se obtiene con referencia a una curva patrón preparada con los poloxámeros (véanse los Ejemplos).

EJEMPLOS

La presente invención se ilustrará ahora por medio de los ejemplos.

EJEMPLO 1 (véase Figura 1)

La finalidad de este Ejemplo era analizar la concentración del Poloxámero 188 en una muestra de la formulación líquida de hCG comercializada Ovitrelle™ después de 18 meses de conservación a la temperatura ambiente. De esta forma, se determinó la estabilidad de la formulación líquida respecto al Poloxámero 188. La concentración del Poloxámero 188 en el momento de la preparación era aproximadamente 100 mcg/ml. El protocolo para la cuantificación del Poloxámero 188 en Ovitrelle™ era el siguiente.

El Ovitrelle™ inyectable líquido contenía los siguientes ingredientes:

Coriogonadotropina alfa, manitol, L-metionina, Poloxámero 188, ácido fosfórico, NaOH y agua.

1. Equipo y Materiales

HPLC ALLIANCE mod:269
Detector por RI mod. 2414
Programa informático para Empower

Proveedor

Waters
Waters
Waters

	Ordenador personal	IBM (o equiv.)
	Poloxámero 188 - Lutrol F68 cod. 010293-1	BASF
	Ácido trifluoroacético (TFA) cod. 9470 (10x1 mL)	J.T.Baker
	Columna analítica TSKgel G3000 PWxl cod. 08021	TOSOH
5	D(-)Manitol cod. 1.05983	MERCK
	L-Metionina cod. 1.05707	MERCK
	Ácido orto-fosfórico al 85% cod. 1.00573	MERCK
	Hidróxido de sodio al 50% cod. 7067	J.T. Baker
	Etanol de calidad gradiente cod. 1.11727	MERCK
10	Formulación líquida de hCG para jeringas Ovitrelle, 250 mcg	SERONO

2. Procedimiento

2.1 Eluyente A (H₂O/TFA al 0,5%)

A 950 mL de agua purificada, en una probeta de 1 litro, se añadieron 5 mL de ácido trifluoroacético (TFA) y se completaron con agitación hasta 1000 mL. El pH del eluyente estaba entre 1,7 y 1,9.

2.2 Eluyente B (Etanol al 20%)

A 750 mL de agua purificada, en una probeta de 1 litro, se añadieron 200 mL de etanol y se completaron con agitación hasta 1000 mL.

2.3 Solución de lavado para dispositivo de muestreo automático (Metanol al 10%)

A 850 mL de agua purificada, en una probeta de 1 litro, se añadieron 100 mL de metanol y se completaron con agitación hasta 1000 mL.

2.4 Disolvente de lavado de los cierres (Metanol al 5%)

A 900 mL de agua purificada, en una probeta de 1 litro, se añadieron 50 mL de metanol y se completaron con agitación hasta 1000 mL.

2.5 Solución de dilución de la curva patrón (formulación líquida sin Poloxámero 188)

A 850 mL de agua purificada, en una probeta de 1 litro, se añadieron 54,6 g de D(-)-manitol, 0,98 g de ácido ortofosfórico y al 85% y 200 mcg de L-metionina. La solución se llevó a pH 7,0 por adición gota a gota de hidróxido de sodio al 50% y se completó hasta 1 ml. La solución se filtró por un filtro de 0,45 µm.

Como alternativa, se puede usar agua como solución de dilución de la curva patrón.

2.6 Solución concentrada para la curva patrón

200 mg de Poloxámero 188 se disolvieron en 80 mL de agua purificada, en una probeta de 100 mL, y se completaron hasta 100 ml. Se preparó la curva patrón basándose en la concentración esperada en las muestras que se van a analizar. En este Ejemplo, se esperaba que hubiera una concentración de Poloxámero 188 de aproximadamente 100 mcg/mL en el Ovitrelle™ líquido, por tanto la curva patrón estaba en el intervalo de 50-160 mcg/mL.

3 Preparación de las muestras

Blanco

Se inyectaron 0,05 mL de solución de dilución para la curva patrón.

Muestras

Se analizaron todas las muestras sin tratamiento previo y se inyectaron 0,05 mL.

4. Condiciones operativas

4.1. Ajuste de los instrumentos

Se conectaron los siguientes conductos a las tuberías de la HPLC:

Conducto A: Eluyente A (H₂O/TFA al 0,5%)
Conducto B: Eluyente B (Etanol al 20%)

Se llenaron los conductos A y B, se purgó el sistema y se lavó a un caudal de 2 mL/min durante 3 minutos. Se conecta el desgasificador integrado, si está presente.

Antes del análisis se cambió a modo de purga la válvula del solenoide del detector por IR del flujo durante al menos 30 minutos con el conducto A. Se realizó la purga de la célula de flujo para hacer pasar la fase móvil recién preparada al lado de referencia de la célula.

Conexión de la columna a los instrumentos y establecimiento de los siguientes parámetros

- | | | | |
|----|---|---|---------------------------------|
| 5 | • | Temperatura del detector por IR: | 30°C |
| | • | Temperatura de la columna: | +20 ± 5°C |
| | • | Caudal de la columna: | 0,5 mL/min |
| | • | Caudal de helio: | 20 mL/min (en caso en el que el |
| | | desgasificador no esté incorporado) | |
| 10 | • | Temperatura del dispositivo de muestreo automático: | +4°C |
| | • | Bucle del dispositivo de muestreo automático: | 200 mcL |
| | • | Tamaño de la jeringa: | 250 mcL |
| | • | Duración del análisis: | 40 min |
| | • | Separación entre inyecciones: | 5 min |

15 4.2 Equilibrio de la columna

La columna se barrió con eluyente A, para equilibrar la columna. Se completó el equilibrio cuando la línea base era estable.

4.3 Columna de conservación

- 20 Después de completar el análisis, la columna se lavó con al menos 30 mL de agua purificada seguido de 30 mL de etanol al 20%.

4.4 Determinación de la concentración de Poloxámero 188 en las muestras de Ovitrelle

El modelo utilizado para calcular la concentración de Poloxámero 188 en las muestras de Ovitrelle era la regresión lineal.

$$Y=a+bx$$

- 25 en donde

Y = Área total del Poloxámero 188

a = Valor de la ordenada en el origen

b = Valor de la pendiente

x = Concentración del Poloxámero 188 en µg/mL inyectado.

- 30 La muestra se integró como se muestra en la Fig. 1.

Se calcularon la ordenada en el origen (a) y la pendiente (b) de la curva patrón, la regresión lineal se calculó mediante el programa informático Statgraphics plus.

Para calcular la concentración del Poloxámero 188 se aplicó la siguiente fórmula.

$$C_{\text{Poloxámero 188}} = \frac{Y-a}{b} \times FD$$

(FD = factor de dilución) Ecuación 1

- 35 La solución de la ecuación 1 proporciona la concentración del Poloxámero 188 en cada una de las muestras de Ovitrelle expresada en µg/mL.

La concentración de Poloxámero encontrada en las muestras de este Ejemplo (véase la Figura 1) era aproximadamente 94 mcg/mL.

40 EJEMPLO 2

La finalidad de este Ejemplo era analizar la concentración del Poloxámero 188 en una muestra de la formulación líquida de hFSH comercializada Gonal-F RFF Pen™ después de 18 meses de conservación a temperatura ambiente. Así, se pudo determinar la estabilidad de la formulación líquida con relación al Poloxámero 188. La concentración del Poloxámero 188 en el momento de la preparación era aproximadamente 100 mcg/mL. El protocolo para la cuantificación del Poloxámero 188 en Gonal-F RFF Pen™ fue idéntico al mostrado en el Ejemplo 1 para Ovitrelle, con la excepción de que el caudal de la columna era 0,75 mL/min.

El poloxámero podía separarse de la hFSH y cuantificarse por separado.

EJEMPLO 3

La finalidad de este Ejemplo era analizar la concentración del Poloxámero 188 en una muestra de la formulación líquida de hGH comercializada Serostim™. El protocolo fue idéntico al del Ejemplo 2.

El poloxámero podía separarse de la hGH y cuantificarse por separado.

5

EJEMPLO 4

La finalidad de este Ejemplo era analizar la concentración del Poloxámero 188 en una muestra de una formulación líquida de hIFN-beta. El protocolo fue idéntico al del Ejemplo 2.

El poloxámero podía separarse de la hIFN-beta y cuantificarse por separado.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la determinación cuantitativa de un poloxámero en una muestra líquida de proteínas que comprende las etapas de someter dicha muestra a:
 - a) una etapa de separación utilizando una columna de cromatografía de exclusión por tamaño molecular;
 - b) una etapa de elución con una fase móvil; y
 - 5 c) opcionalmente una etapa de detección para el poloxámero,en el que la proteína tiene una masa molecular entre 5-70 kDa, preferiblemente entre 20-70 kDa y en donde el pH de la fase móvil utilizada para la etapa de elución se ajusta por debajo de 3.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el poloxámero es Polóxamero 188.
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la proteína es una proteína heterodímera.
- 10 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la proteína es una gonadotropina seleccionada de FSH, LH, hCG y TSH.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la proteína que se va a analizar es interferón beta o la hormona del crecimiento (GH).
- 15 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la muestra es una composición farmacéutica acuosa que contiene FSH, LH, hCG, TSH, GH o interferón beta.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la fase móvil es un disolvente acuoso en particular un disolvente tamponado.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el pH de la fase móvil se ajusta a aproximadamente 1,9-2,0
- 20 9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la etapa de detección del poloxámero implica analizar el índice de refracción.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la columna de exclusión por tamaño molecular es una columna de SE-HPLC rellena de un polímero basado en una matriz que contiene perlas.
- 25 11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que las perlas de la matriz tienen un tamaño de partículas de 10 o 17 μm .
12. El método de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en el que las perlas de la matriz tienen un tamaño de poros de aproximadamente 200 Å.

Figura 1

